

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 21 juin 2018
Par M Quilbé Alexandre**

IMMUNOTHÉRAPIE DANS LE CANCER DU PANCRÉAS :
Evaluation *in vitro* et *in vivo* d'une nouvelle immunothérapie anti-galectine-9
dans un modèle de cancer pancréatique

Membres du jury :

Président :

Professeur Delphine ALLORGE,
Professeur des Universités, Faculté de
Pharmacie, Lille, Praticien Hospitalier, CHRU,
Lille

Directeur de Thèse :

Professeur Philippe CHAVATTE,
Professeur des Universités, Faculté de
Pharmacie, Lille

Assesseurs :

Professeur Nadira DELHEM, Professeur
des Universités, Faculté de Sciences et
Technologies, Lille

Professeur Philippe CARDOT
Professeur des Universités, Limoges, Faculté
de Pharmacie, Limoges

Docteur Michèle VASSEUR
Pharmacien Praticien Hospitalier, CHRU, Lille

Docteur Isabelle Dagenat,
Pharmacien Praticien Hospitalier, CH
Compiègne-Noyon



Faculté de Pharmacie
de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie

Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mes parents,
A mon frère,
A mes amis,
A Julie,

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Madame le Professeur Nadira DELHEM,

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude. Merci, pour l'espace de liberté et de responsabilité que vous nous offrez dans le laboratoire. Merci, pour le temps considérable que vous nous donnez. Merci, pour votre bienveillance et votre enthousiasme. Merci de nous offrir votre expérience et votre aide. Merci, pour tout ce que vous faites pour me faire progresser. Merci, pour votre enthousiasme et votre investissement quotidien

Monsieur le Professeur Philippe CHAVATTE,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci pour votre implication et vos conseils. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Philippe CARDOT,

Merci d'avoir accepté de venir assister et juger la thèse d'un de vos anciens étudiants. Vous avez été pour moi un Professeur emblématique et je suis très honoré par votre présence dans mon jury. Je tiens à vous remercier profondément pour la bienveillance dont vous avez toujours fait preuve. Merci, de votre implication personnelle et pour votre grande humanité. Merci, pour votre vivacité et la qualité de vos enseignements et de vos partiels... Merci, pour ce que vous m'avez apporté, je continue de suivre vos conseils.

Madame le Professeur Delphine ALLORGE,

Je vous suis très reconnaissant de l'intérêt que vous portez à ma thèse. Je vous remercie pour la réelle attention que vous portez à chacun de vos internes. Merci, pour votre bienveillance. Merci pour votre investissement à défendre le DES IPR. Votre présence témoigne de cet intérêt et je vous en remercie.

Madame le Docteur Michèle VASSEUR,

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je vous suis reconnaissant de l'intérêt que vous donnez à ce travail. J'espère que vous l'apprécierez

Madame le Docteur Isabelle DAGRENAT,

Je suis heureux et honoré de votre présence dans mon jury. Merci, pour la confiance que vous m'avez accordée pendant ce semestre Compiégnois. Merci, pour le temps consacré, pour votre bienveillance et pour vos conseils. Merci, pour tout Isabelle, vous êtes pour moi un modèle.

Aux collaborateurs,

Je tiens à remercier le **Pr Isabelle Van Seuningen** et le **Dr Nicolas Jonckheere** ainsi que leurs équipes avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger et de travailler. Merci pour vos conseils et vos encouragements.

Belinda. Merci pour ton investissement dans ce projet. Merci pour tous tes conseils et pour ta gentillesse. Travailler avec toi est un réel plaisir et je pense que nous allons avoir de nombreuses choses à faire. Merci

Aux membres de l'Unité,

Je remercie le **Professeur Yvan De Launoit**, directeur de l'unité mixte de recherche CNRS-8161 qui m'a offert l'opportunité d'intégrer son unité. Merci de me permettre de poursuivre ma thèse dans cette atmosphère de recherche et avec des chercheurs d'exceptions.

Nadira, pour nous permettre de travailler sur des sujets passionnants. Merci également pour vos conseils précis et délicatement distribués qui donne toujours l'impression qu'ils viennent de nous-mêmes. Merci, pour votre patience et la confiance que vous m'accordez. Merci pour votre investissement.

Olivier. Merci, pour tout ce que tu m'apportes, pour ton attention et ta gentillesse. Merci, de m'avoir aidé lorsque j'en avais besoin. Merci pour ton investissement. Merci pour ta patience notamment lorsque tu subis les assauts de mes multiples attaques à la pissette ou lorsque je condamne ta porte avec toutes les chaises du laboratoires...Merci Momo, mais il te reste encore deux ans à tenir.

Rami. Merci pour le temps que tu m'as consacré et pour ton investissement. Merci pour l'aide que tu m'as apporté, pour tous tes bons conseils et ta grande gentillesse. Je te souhaite le meilleur pour tes projets.

Sarah, Celine et Clara toujours ensemble... Merci les filles pour votre bonne humeur. **Sarah**, c'est moi qui pique tes bonbons, tes stylos et ta pince (désolé je ne sais toujours pas où elle est). **Celine et Clara**, oui, l'azote liquide et la carboglace c'est dangereux mais c'est aussi très drôle. Merci pour être toujours là quand on a besoin. **Celine** un grand merci pour toute ton aide. Vous êtes top les filles ! GBDLC

Clémentine merci pour toute l'aide et la fraîcheur que tu apportes à ce laboratoire. Promis je vais ranger mes affaires et arrêter de dire que c'est Abi. Merci biloute.

Chantal, même si tu ne travailles plus avec nous, je te remercie de m'avoir accompagné lors de mon arrivée dans le laboratoire. Maintenant que tu t'occupes de la sécurité, je sais que tu m'as à l'œil et le bon. Merci

Marco, merci pour ta bonne humeur et pour garder le secret de la formation azote liquide. Surtout, j'espère que nous allons pouvoir refaire beaucoup de « qPCR » et de « WB ».

Godelive, moi je vais te dire un truc, merci gogo, et tu sais que je sais !

Abhishek thank you for supporting me in the office, you only know ! You are always present when needed, even if you also suffer from water attack and wet chairs. Thank you buddy, you're the one ! यहां रहने के लिए धन्यवाद

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	8
SOMMAIRE.....	11
INDEX DES FIGURES.....	12
INDEX DES TABLES.....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
AVANT-PROPOS.....	14
INTRODUCTION.....	15
I. La réponse immunitaire.....	15
A. L'immunité innée.....	15
B. L'immunité adaptative.....	16
C. Immunité antitumorale.....	17
D. Échappement tumoral au système immunitaire.....	25
II. Immunothérapie.....	31
A. Immunothérapie passive.....	33
B. Immunothérapie active.....	37
III. Adénocarcinome du pancréas.....	51
A. Le pancréas.....	51
B. L'adénocarcinome du pancréas.....	52
IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER DU PANCREAS.....	59
I. Mécanismes d'échappement immunitaire dans l'adénocarcinome du pancréas.....	59
II. Immunothérapie et cancer du pancréas.....	61
A. Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire.....	61
B. Vaccination thérapeutique.....	63
C. Les cellules CAR T.....	64
III. La galectine-9 : Nouveau point de contrôle immunitaire.....	69
PROPOSITION D'UNE NOUVELLE STRATEGIE D'IMMUNOTHERAPIE.....	70
I. OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	72
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	73
III. RÉSULTATS.....	81
A. Expression génique et protéique de la Galectine 9.....	81
B. Evaluation de la prévalence des lymphocytes T régulateurs périphériques et infiltrants dans le modèle KRAS ^{G12D}	83
C. Evaluation de l'expression de la galectine 9 dans les lymphocytes T régulateurs murins de souris C57Bl6.....	84
D. Evaluation de la capacité du 1G3 à neutraliser la suppression de la galectine 9 recombinante murine sur les Tconv murins.....	85
E. Evaluation de la capacité du 1G3 à neutraliser la suppression des Treg murins sur les Tconv autologues.....	85
F. Evaluation de l'expression de la galectine 9 dans les lignées humaines de cancer pancréatique.....	87
DISCUSSION GENERALE.....	89
APRÈS-PROPOS.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	104

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS ACTEURS DE L'IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE IMPLIQUES DANS L'ELIMINATION DES CELLULES CANCEREUSES (MITTAL ET AL. 2014)T	24
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES TUMEURS ET MECANISMES PERMETTANT L'ONCOGENESE « THE NEXT GENERATION OF HALLMARKS OF CANCER »(HANAHAN & ROBERT A. WEINBERG 2011).....	25
FIGURE 3 : ROLE DE PD-1 ET DE CTLA-4 DANS LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE (RIBAS 2015).....	29
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS MECANISMES IMPLIQUES DANS L'ECHAPPEMENT DES CELLULES TUMORALES AU SI (MITTAL ET AL. 2014)	30
FIGURE 5 : CYCLE IMMUNITE CANCER (D'APRES CHEN & MELLMAN 2013)	33
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT CLINIQUE DES ANTICORPS ANTI-CTLA-4, ANTI-PD-1 ET ANTI-PD-L1 DE LA PREMIERE ADMINISTRATION A L'APPROBATION DE LA FDA (RIBAS & WOLCHOK 2018)..	42
FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CIBLES POTENTIELS DANS LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE (MAHONEY ET AL. 2015)	43
FIGURE 8 : REGULATION DE L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T ET NK PAR LA VOIE TIGIT/CD155 (ANDERSON ET AL. 2016)	45
FIGURE 9 : IMPACT IMMUNOLOGIQUE DES INHIBITEURS DE CHECKPOINT (D'APRES ANDERSON ET AL. 2016).....	46
FIGURE 10 : TAUX DE MUTATIONS SOMATIQUES PAR CANCER (D'APRES (ALEXANDROV ET AL. 2013B).....	48
FIGURE 11 : PHENOTYPES IMMUNITAIRES DES TUMEURS (CHEN & MELLMAN 2017)	50
FIGURE 12 : SEQUENCE DES ALTERATIONS GENETIQUES AU COURS DE L'EVOLUTION DES PANINS (D'APRES HINGORANI ET AL. 2003)	56
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REONSE IMMUNITAIRE DANS L'ADK (III ET AL. 2017)	60
FIGURE 14 : STATUT CLINIQUE DES IMMUNOTHERAPIES DANS LE CANCER DU PANCREAS (MORRISON ET AL. 2018).....	65
FIGURE 15 : EXPRESSION DES TRANSCRITS DE GAL-9 DANS LES ADENOCARCINOMES PANCREATIQUES HUMAIN ET DANS LE PANCREAS DES SOURIS KRASG12D VS CONTROLES.	81
FIGURE 16 : EXPRESSION DE LA GAL-9 DANS LE PANCREAS DES SOURIS KRASG12D VS KRAS WT.....	82
FIGURE 17 : PREVALENCE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS DANS LES SOURIS KRAS ^{G12D} VS KRAS WT.	83
FIGURE 18 : EXPRESSION PROTEIQUE DE LA GAL-9 DANS LES LYMPHOCYTES T CONV ET TREG MURINS.....	84
FIGURE 19 : L'ANTICORPS ANTI-GAL9 INHIBE L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LA rGAL-9 MURINE.....	85
FIGURE 20 : TEST DE SUPPRESSION PAR MLR. EFFETS DE L'ANTICORPS ANTI-GAL9 SUR L'EFFET SUPPRESSIF DES TREG.....	86
FIGURE 21 : EXPRESSION DE LA GAL-9 DANS LES 4 LIGNEES DE CANCER PANCREATIQUE HUMAIN	88
FIGURE 22 : MECANISMES DES IMMUNOTHERAPIES DANS L'ADKP (MORRISON ET AL. 2018).....	95

INDEX DES TABLES

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES DIFFERENTS ANTIGENES TUMORAUX (D'APRES A.QUILBE)	22
TABLEAU 2 : EXEMPLES D'ANTICORPS MONOCLONAUX ACTUELLEMENT UTILISES EN CLINIQUE (D'APRES WATIER 2017)	34
TABLEAU 3 : RISQUE DE DEVELOPPER UN ADKP EN FONCTION DE LA PREDISPOSITION GENETIQUE (D'APRES LEVY 2018).....	53
TABLEAU 4 : CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES ADKP (D'APRES (WADDELL ET AL. 2015)	54
TABLEAU 5 : LISTE DES PRINCIPAUX ANTIGENES SUREXPRIMES DANS L'ADKP (D'APRES A. QUILBE)	63
TABLEAU 6 : LISTE DES PRINCIPAUX ESSAIS CLINIQUES D'IMMUNOTHERAPIES DANS L'ADKP DONT LES RESULTATS ONT ETE PUBLIES (ADAPTE DE KUNK ET AL. 2016; THIND ET AL. 2017; MA ET AL. 2016)	68
TABLEAU 7 : LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR WESTERN BLOT.	77
TABLEAU 8 : AMORCES UTILISEES POUR LA Q-PCR	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity	MLR: Mixed Leucocytes Reaction
ADKP: Adénocarcinome du Pancréas	MMP: Matrix Metalloproteinases
ATP: Adenosine Triphosphate	MSI : Microsatellites Instables
BCR: B-Cell Receptor	NK: Natural Killer
BCR-ABL: Breakpoint Cluster Region Abelson	NLR : Nod-Like Receptors
CAM: Cystadénome Mucineux	NOS : Nitrique Oxyde Synthase
CEPS : Comité Économique des Produits de Santé	nTreg: Lymphocytes T régulateurs naturel
CESE : Le Conseil Économique, Social et Environnemental	PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern
CISS : Collectif Interassociatif Sur la Santé	PanIN: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
CLR : C-type Lectin	PAP : Phosphatase Acide Prostatique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cell
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	PBS: Phosphate Buffered Saline
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique	PD-L1: Programmed Death-Ligand 1
CT : Commission de la Transparence	PD1: Programmed cell Death 1
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated antigen 4	PDAC: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
DAMP: Danger Associated Molecular Pattern	PRR: Pattern Recognition Receptor)
DC : Cellule Dendritique	PSA: Prostatic acid Phosphatase
EBV : Epstein-Barr Virus	PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen
FOXP3: Forkhead box P3	PVDF: Polyfluorure de Vinylidène
G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor	QALY: Quality-Adjusted Life Year
Gal-9: Galectine 9	rGal-9 : Galectine 9 recombinante
GITR: Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein	RI : Réponse Immune
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	RLR: Retinoic acid-inductible gene-I Like-Receptors
HMGB1: High-Mobility Group Box 1	ROS : Reactive Oxygen Species
HPV: Human Papilloma Virus	SI : Système Immunitaire
HSP: Heat Shock Proteins	TAN : Tumor-Associated Neutrophils
HSP: Heat Shock Proteins	TATE : Tumour-Associated Tissue Eosinophilia
ICI: Immune Checkpoint Inhibiteur	Tconv : Lymphocytes T conventionnels
ICOS: Inducible T-cell Costimulatory	TCR : T-Cell Receptor
IDO: Indoleamine 2, 3 Dioxygenase	Teff : Lymphocytes T effecteurs
IL: Interleukin	TfH: Lymphocytes T folliculaires
INFγ: Interferon γ	TGF-β: Transforming Growth Factor β
iNOS : Inductible Nitric Oxide Synthase	Th1: Lymphocytes T helper 1
iTreg : Lymphocytes T régulateurs induits	Th2: Lymphocytes T helper 2
Kyn : N-formylkynurénine	TIGIT: T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains
LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene-3	TIM-3: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
LEEM : Les Entreprises du Médicament	TIPMP: Tumeurs Intra canalaires Papillaires et Mucineuses du Pancréas
LPS : Lipopolysaccharide	TLR: Toll-Like Receptor
M1 : Macrophage de type 1	TME: Tumor Microenvironment
M2 : Macrophages de type 2	TNFα: Tumor Necrosis Factor α
MAGE: Melanoma Associated Antigen	TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells	Treg: Lymphocyte T régulateur
	Trp : Tryptophane
	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

AVANT-PROPOS

« Celui qui n'évolue pas disparaît », ce célèbre aphorisme de Charles Darwin peut résumer le rôle du système immunitaire (SI). Ainsi notre SI est le résultat de millions d'années de co-évolution entre notre organisme et une multitude d'agents pathogènes. Sans entrer dans les détails des grands préceptes de l'Immunologie, on peut définir le SI comme un mécanisme de défense visant à répondre à un danger (micro-organismes, cellules cancéreuses, polluants...). Ce système est capable d'identifier ce qui est dangereux ou non et déclencher ou non une réponse immunitaire. Le SI permet au final de maintenir l'intégrité biologique et d'assurer la reproduction.

Dans cette thèse, je vais dans un premier temps poser les grands fondements de l'immunologie et plus particulièrement de l'immunité anti-tumorale. Cette première partie nous conduira à une seconde partie consacrée à la description des stratégies d'immunothérapies. Nous verrons comment et pourquoi nous tentons aujourd'hui d'utiliser le SI pour lutter contre le cancer. Pour reprendre les propos du Pr Joseph Gligorov « l'immunologie est à la médecine ce que la philosophie est à la science, il aura fallu du temps pour comprendre d'abord que ce qui paraît simple est en fait compliqué, puis ensuite imaginer que cette complexité puisse se simplifier lorsqu'il s'agit d'applications cliniques ».

Dans une troisième partie de mon manuscrit, je décrirai plus précisément les stratégies d'immunothérapie envisagées pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas (ADKP).

Et, enfin dans une dernière partie, je vous présenterai un travail original d'évaluation dans l'ADKP d'une stratégie d'immunothérapie ciblant les lymphocytes T régulateurs qui sont des cellules jouant un rôle important dans l'immunorégulation du SI (Brevet *WO2015185875*).

INTRODUCTION

I. La réponse immunitaire

A. L'immunité innée

En cas d'agression par un agent pathogène ou une cellule du soi transformée, la première ligne de défense est l'activation de l'immunité innée. Celle-ci fait intervenir à la fois les natural killers (NK), les monocytes/macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques (DC). Son activation est indispensable à l'induction et à l'orientation de la réponse immune adaptative (dite spécifique).

Bien que, les acteurs de l'immunité innée s'activent en quelques minutes ils sont capables de discriminer précisément le Soi du Non Soi. En effet, des motifs moléculaires, présents sur les pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) sont reconnus par les acteurs de l'immunité innée qui disposent de récepteurs spécifiques des PAMPs, les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Il y a 4 grandes familles de PRR en fonction de leur localisation et de leur fonction. On distingue, les TLRs (Toll-Like Receptors), les NLRs (Nod-Like Receptors), les CLR (C-type Lectin) et les RLRs (Retinoic acid-inductible gene-1 Like-Receptors). Les PAMPs sont quant à eux partagés par de nombreuses espèces. C'est pourquoi un récepteur pour un PAMPs suffit à reconnaître un très vaste ensemble d'agents pathogènes. Par exemple, un récepteur pour le lipopolysaccharide (LPS) peut reconnaître toutes les bactéries Gram négatif (Lewandowski et al. 2015; Burmester & Pezzuto 2008).

Pour activer complètement la réponse innée, la reconnaissance des DAMPs (motifs moléculaires associés aux dégâts) doit compléter celle des PAMPs, c'est « la théorie du danger ». Ces DAMPs sont des molécules associées à des cellules âgées, abimées ou mortes. Ils comprennent notamment les protéines de choc thermique (HSP), les protéines associées à la chromatine comme HGMB1 (HighMobility Group Box 1), les β -défensines, l'acide urique et l'ATP (Zitvogel & Kroemer 2017). Cette théorie explique notamment la tolérance de notre organisme face à certaines bactéries dites « commensales » et qui n'induisent pas de dégâts cellulaires. Ainsi, la perception des signaux induits à la fois par les PAMPs et les DAMPs est indispensable pour une activation complète de l'immunité innée. La reconnaissance des PAMPs et des DAMPs déclenche la maturation des cellules immunitaires innées, la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α) et de médiateurs de l'inflammation comme l'histamine (Espinosa 2012). La reconnaissance de ces signaux par les phagocytes (les monocytes/macrophages, les granulocytes neutrophiles et les DC) déclenche l'ingestion et la digestion des pathogènes au sein de phagolysosomes, riches notamment en radicaux oxygénés et azotés (ROS) etc. Ces antigènes digérés sont alors découpés en peptides par le protéasome ou par la voie endosomale puis présentés respectivement *via* le CMH I et II aux acteurs de l'immunité adaptative (Lotteau 1995). Bien que considérée comme non spécifique, la reconnaissance des motifs antigéniques

conservés permet d'instaurer un premier degré de spécificité. L'activation des cellules dendritiques par les PAMP stimule leur migration du site de l'infection vers les ganglions lymphatiques. Elles acquièrent alors la capacité à présenter les antigènes et à activer directement les acteurs de l'immunité adaptative.

B. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative n'est présente que chez les vertébrés à mâchoire et constitue le deuxième volet de la réponse immune (RI). Elle est plus longue à se mettre en place et s'enclenche pendant l'activation de la réponse innée. Au final elle engendre une réponse très spécifique et durable par la mise en place d'une mémoire immunologique.

Pour cela le système adaptatif dispose de deux répertoires de récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig), le BCR (B Cell Receptor) pour les lymphocytes B et le TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T (LT). A la différence des PRRs, chaque lymphocyte exprime un récepteur différent. La diversité de ce répertoire est immense (10^{12} à 10^{15} récepteurs) et permet théoriquement au BCR/TCR de reconnaître n'importe quel antigène (Lewandowski et al. 2015). Ce répertoire est généré de façon aléatoire suite à des recombinaisons somatiques des gènes codant les immunoglobulines et leurs systèmes de régulations. La reconnaissance des antigènes se fait soit directement pour les lymphocytes B (LB) soit *via* le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) pour les lymphocytes T. Cette activation n'est complète que si la reconnaissance de l'antigène s'accompagne de signaux de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) fournis par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (DC, monocytes/macrophages et LB). La reconnaissance de l'antigène par le BCR ou TCR (sélection clonale) entraîne alors la multiplication (expansion clonale) et l'activation du lymphocyte. Suite à la reconnaissance d'un antigène par le BCR (présentation directe ou reconnaissance d'Ag portés par les CPA), le lymphocyte B s'active, prolifère et se différencie soit en plasmocyte, cellule sécrétrice d'anticorps solubles, soit en lymphocytes B mémoire. Les anticorps circulants caractérisent la réponse à médiation humorale (Lebien & Tedder 2008; Berek et al. 1991).

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes *via* le TCR s'ils sont « apprêtés » et « associés » au CMH. Le CMH est formé par des chaînes polypeptidiques qui forment un espace dans lequel les peptides viennent se fixer pour être « présentés ». Le CMH de classe I est exprimé par la majorité des cellules nucléées de l'organisme alors que l'expression du CMH de classe II est « principalement » mais pas exclusivement restreinte aux CPA. Les antigènes endogènes sont dégradés en peptides par le protéasome puis assemblés aux molécules du CMH I pour être présentés aux lymphocytes T CD8+, alors que les antigènes exogènes sont internalisés, dégradés puis associés au CMH II pour être présentés aux lymphocytes T CD4. Une fois activés, les lymphocytes T assurent la réponse à « médiation cellulaire » et possèdent à la fois des propriétés effectrices et coordinatrices de la réponse immune. Alors que les lymphocytes T CD4+ sont les principaux coordinateurs de la réponse

immune (T helper : Th), les lymphocytes T CD8+ sont les principaux effecteurs (Teff). On distingue principalement 5 sous-types de LT CD4+ qui polarisent la réponse immune : les Th1, Th2, Th17, T régulateur (Treg) et Tfh (folliculaires) (Pepper & Jenkins 2011; Smith-Garvin et al. 2009; . Brièvement, les lymphocytes Th1 et Th17 favorisent l'activation des lymphocytes T CD8+ et l'inflammation. Les lymphocytes Th2 et Tfh favorisent les réponses humorales par les lymphocytes B. Enfin les lymphocytes Treg vont réguler la réponse immune et empêcher une hyperactivation *via* différents mécanismes immunosuppresseurs. Les réponses cellulaires cytotoxiques sont principalement médiées par les lymphocytes T CD8 + cytotoxiques qui induisent la mort des cellules par différents mécanismes (la voie perforine-granzyme, la voie Fas-FasLigand) déclenchant ainsi l'apoptose des cellules cibles (Zitvogel & Kroemer 2017; Zhou et al. 2009; Zhu & Paul 2010). Il ne faut cependant pas négliger la proportion de lymphocytes T CD4+ cytotoxiques dont le rôle et la prévalence est de mieux en mieux décrite (Moralès et al. 2012; Delhem et al. 1998) en particulier dans les infections virales et les cancers viro-induits.

Par ailleurs, les composants humoraux et cellulaires de l'immunité adaptative coopèrent avec les composants de l'immunité innée pour éliminer une infection ou une cellule tumorale. Par exemple la fixation des anticorps sur les pathogènes facilite la phagocytose et la lyse par ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) et CDC (Cytotoxicité Dépendante du Complément).

En conclusion, l'immunité innée et adaptative a pour fonction de maintenir l'intégrité de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes et vis-à-vis des cellules du soi « transformées ». En effet, alors que dans les conditions physiologiques, un équilibre est maintenu entre le renouvellement et la mort cellulaire, parfois certaines cellules du Soi ne répondent plus aux mécanismes de régulation et certains clones cellulaires vont alors proliférer de façon anarchique. Ces cellules acquièrent de nouvelles propriétés qu'elles pourront transmettre, c'est l'oncogenèse. L'une des fonctions du système immunitaire est d'éliminer ces cellules dites « transformées ». On parle d'immunité anti-tumorale.

C. Immunité antitumorale

On reconnaît au SI un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des tumeurs, c'est la théorie de l'immunosurveillance. La première publication relative à l'immunosurveillance date de 1909 dans laquelle Paul Ehrlich (Ehrlich 1909) décrit une association entre le système immunitaire et l'oncogenèse. Elle repose sur différentes observations dont celles de William Cooley en 1891, qui avait retrouvé une corrélation entre la régression de sarcomes osseux et la survenue de surinfection post-opératoire par un streptocoque pathogène (Coley 1893). La première démonstration claire d'une capacité spécifique à stimuler une réponse immunitaire a été faite par Gross en 1943 après l'immunisation intradermique de souris contre un sarcome (Gross 1943), suivie de Foley en

1953 (Foley 1953) *via* l'induction de tumeurs par le 3-méthylcholanthrène (MCA).

En 1970, Burnet émet l'hypothèse que les néo-antigènes des cellules tumorales induisent une réaction immunologique contre le cancer et conceptualise ensuite la théorie de la surveillance immunitaire (Burnet 1971). Cependant, plusieurs résultats contradictoires obtenus sur la croissance tumorale dans divers modèles murins immunodéprimés (thymectomie, souris Nude) (Stutman 1974; Stutman 1979; Outzen & Custer 1975; Miller et al. 1963) ont contribué à remettre en question cette théorie pendant 20 ans. C'est finalement la découverte d'un système immunitaire inné fonctionnel chez ces animaux et la description des antigènes tumoraux qui ont contribué au retour de cette théorie au début des années 90 (Bruggen et al. 1991; Boon et al. 2006). Il est intéressant de remarquer que l'existence même d'une immunité antitumorale n'était toujours pas considérée en 2000 sur les « hallmarks » du cancer et qu'il a fallu attendre 2011 pour qu'elle y soit ajoutée (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Robert A Weinberg 2011)

1. Les acteurs de l'immunité innée dans le contrôle tumoral.

▪ Les cellules NK

Les cellules NK sont des effecteurs majeurs de la réponse innée antitumorale. Cette population lymphoïde aux fonctions majoritairement cytotoxiques représente 5 à 10 % de la population des lymphocytes circulants. Les études épidémiologiques ont corrélé une augmentation du risque de cancer à une faible activité des NK dans le sang périphérique. À l'inverse, une infiltration tumorale par les NK est un facteur pronostique favorable dans les tumeurs solides

Des signaux d'activation et/ou d'inhibition contrôlent l'état d'activation des cellules NK, sans nécessité de stimulation antigénique. Elles expriment un large répertoire de récepteurs activateurs (CD16, CD2, NKG2D, NKR-P1, DNAM-1, LAG-3, NCR etc.) et inhibiteurs (KIR, LAIR1, p75/AIRM1) qui leur permettent de détecter les cellules cibles, tout en épargnant les cellules normales. Par exemple, la reconnaissance du CMH I d'une cellule saine par le récepteur KIR inhibe l'activité cytotoxique des NK. À l'inverse, sur une cellule tumorale, l'absence de CMH I et l'expression de protéine de stress comme MICA et MICB, lèvent l'inhibition induite par KIR et favorisent alors leurs fonctions cytotoxiques *via* la stimulation du récepteur activateur NKG2D (Lewandowski et al. 2015)(Schleinitz et al. 2002). Leurs fonctions effectrices reposent à la fois sur des propriétés de cytotoxicité et sur la production de cytokines/chimiokines. Une fois, engagées, les NK induisent la lyse des cibles selon deux grands processus :

- Lyse sécrétoire : Libération de granules lytiques contenant entre autre la perforine, protéine formant des pores dans la membrane cellulaire et le granzyme B, protéine induisant l'apoptose par activation des caspases nucléaires.
- Lyse non sécrétoire : Induction directe de l'apoptose si les cellules tumorales

expriment des récepteurs à l'apoptose (ex :CD95) ou lyse par ADCC après reconnaissance de la partie Fc des immunoglobulines par le récepteur CD16.

Elles ont aussi des fonctions de coopération cellulaire *via* la sécrétion de cytokines (IFN γ , TNF α , TGF β , IL-1 β , IL-10, IL-3, IL-5, IL-8 et IL-13) (Reefman et al. 2010) et de chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES). Le TNF α (tumor necrosis factor) encore appelé cachexine ou cachectine, exerce une action apoptotique directe sur les cellules tumorales (Alter et al. 2004; Biron et al. 1999; Vivier et al. 2008; Bradley 2008). Ensemble l'IFN γ (Interféron-gamma) et le TNF α possèdent un effet anti tumoral direct. Ils (i) potentialisent l'activité cytotoxique d'autres cellules immunitaires effectrices (macrophages, NK, lymphocytes T CD8+), (ii) induisent l'expression du CMH de classes I et II et (iii) stimulent la présentation antigénique (Vivier et al. 2008).

- Le système du complément

Pour rappel, le système du complément est un ensemble de plus de 30 protéines synthétisées dans le foie. Il peut être activé selon trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Après activation il induit la lyse de la cellule cible *via* la formation d'un complexe d'attaque membranaire. Il stimule également l'inflammation, la lyse et l'opsonisation des cellules cibles par les NK et les macrophages (CDC). Le rôle du complément dans la surveillance immunitaire anticancéreuse n'a pas été clairement démontré. Les principales explications concernant le rôle du complément dans l'élimination des cellules tumorales suggèrent une activation de la voie classique (C1q) par la reconnaissance du fragment Fc des anticorps présents sur les cellules tumorales. Ainsi ce système ne serait efficace qu'en présence d'une réponse immunitaire à médiation humorale (voie adaptative) (Lewandowski et al. 2015).

- Le système granulo-monocytaire

On distingue la lignée monocytaire qui engendre notamment les macrophages, les cellules dendritiques, et la lignée granulo-cytaire qui engendre la famille des polynucléaires (les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles).

- **Les polynucléaires**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH), sous l'action de facteurs de transcription et de cytokines vont se différencier en progéniteurs myéloïdes (PMC) pluripotents. Sous l'influence des cytokines (IL-3, IL-5) et de facteurs de croissances (GM-CSF : Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor et G-CSF : Granulocytes Colony Stimulating Factor) les PMC s'orienteront vers des précurseurs éosinophiles, neutrophiles, ou basophiles (Lewandowski et al. 2015). Les rôles des neutrophiles et des éosinophiles dans l'immunité antitumorale sont bien décrits mais il semblerait que celui des basophiles soit plus restreint. Au niveau tumorale et péri-tumorale l'infiltration des

neutrophiles, TAN (tumor-associated neutrophils), et des éosinophiles, TATE (Tumor-Associated Tissue Eosinophilia), est souvent associée à un pronostic favorable (Granot et al. 2011; Musiani et al. 1996; Prizment et al. 2016; Sakkal et al. 2016; Gatault et al. 2012). On retrouve à la surface des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles des récepteurs aux chimiokines (CXCR1, CXCR2) et aux signaux de dangers, DAMPs, produits par les cellules tumorales (IL-8, IL-33, CXCL1, CXCL2, CXCL7, acide urique, ATP, HMGB1, etc) (Mantovani et al. 2011). Ces signaux induisent la migration (chimioattraction) et l'activation en réponse au gradient de facteurs sécrétés par les cellules tumorales. D'autres facteurs produits par les cellules tumorales (GM-CSF, G-CSF), les NK (IFN γ), et les lymphocytes T maintiennent la domiciliation et l'activation des polynucléaires sur le site tumoral (Chakravarti et al. 2007).

Les neutrophiles et éosinophiles ont un rôle direct dans la mort de cellules cancéreuses en utilisant des mécanismes dits « contact dépendants » impliquant la liaison Fas/FasL, la libération d'espèces réactives de l'oxygène (O $_2^-$, H $_2$ O $_2$), de protéases, de perforines, du TNF α et de TRAIL (Babior 1984)(Weiss et al. 1981). Comme les NK, ils possèdent également un récepteur pour la partie de Fc des anticorps, leur permettant d'éliminer les cellules tumorales par ADCC. Ils favorisent également la cytotoxicité des cellules immunitaires (NK, macrophages, LTs) en libérant dans le microenvironnement de puissantes cytokines immunostimulantes (IL-2, IL-4, IL-18). Enfin les neutrophiles peuvent éliminer les cellules tumorales par phagocytose et présenter les antigènes tumoraux *via* le CMH I aux lymphocytes T naïfs CD8+, faisant ainsi le pont avec l'immunité adaptative (Cassatella 1995; Mantovani et al. 2011; Lewandowski et al. 2015; Burmester & Pezzuto 2008; Driss et al. 2010; Sakkal et al. 2016; Gatault et al. 2012; Prizment et al. 2016).

➤ **Les macrophages**

Leur activation dépend de leur état de différenciation et de maturation, mais aussi de facteurs extérieurs : cytokines et stimuli inflammatoires. Les macrophages sont activés par différents facteurs dont l'IFN γ , l'IL-4, le TNF ou encore le GM-CSF. Les macrophages reconnaissent les cellules tumorales de façon non spécifique et les éliminent en sécrétant des molécules cytotoxiques ou par la phagocytose. La lyse directe se fait par la libération d'enzyme (lysozyme, protéases, RNase), d'espèces nitrées et réactives de l'oxygènes, de cytokines cytotoxiques (TNF α) et de radicaux libres. On retrouve à leur surface des récepteurs (i) pour le fragment Fc des immunoglobulines (ADCC), (ii) pour le mannose et (iii) pour le complément (CDC). Ils permettent entre autres aux macrophages d'adhérer à la membrane des cellules tumorales et facilitent la phagocytose. Comme chez les neutrophiles les antigènes tumoraux sont dégradés en petits peptides, puis associés aux molécules du CMH ou déversés dans le milieu extracellulaire par exocytose, permettant le recrutement et l'activation des cellules effectrices. Enfin leur capacité à présenter les antigènes et activer les LT en font des cellules auxiliaires très importantes pour la génération d'une réponse immune adaptative efficace (Mantovani et al. 2017; Lewandowski et al. 2015).

➤ Les cellules dendritiques

Leur rôle est de faire le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. Contrairement aux macrophages et aux neutrophiles, la présentation d'antigènes aux LT naïfs est leur principale fonction. On parle de cellule présentatrice d'antigène professionnelle. Suite à l'internalisation et la dégradation du pathogène, la DC présente un peptide antigénique *via* les CMHI, on parle « d'apprêtement antigénique ». Ce processus induit la maturation des DC et s'accompagne d'une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD83, CD86) et des molécules d'adhésion comme DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin). Les DC matures produisent également des cytokines inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IFN γ , facilitant la mise en place d'une réponse adaptative (Veglia & Gabrilovich 2017).

2. Les acteurs de l'immunité adaptative dans le contrôle tumoral

▪ Antigènes tumoraux et immunité adaptative

La présence de lymphocytes T activés capables d'éliminer la tumeur comme ils peuvent éliminer une bactérie ou une cellule infectée n'a aujourd'hui rien de surprenant. Pourtant, ce qui paraît actuellement évident est dépendant d'un concept primordial de l'onco-immunologie : la présence d'antigènes tumoraux. Effectivement l'activation de l'immunité adaptative nécessite la reconnaissance du « non Soi ». Ainsi, ce qui peut paraître évident pour une bactérie ne l'est pas forcément pour une cellule tumorale, qui est à l'origine une cellule du « Soi ».

Historiquement on reconnaît au groupe de Thierry Boon de l'Institut Ludwig à Bruxelles, la découverte en 1991 des premiers antigènes tumoraux. En effet, comme l'explique le Pr Pierre Van Der Bruggen, l'un des premiers à avoir identifié des antigènes tumoraux (van der Bruggen et al. 1991): « *Personne ne savait, jusqu'il y a une vingtaine d'années, s'il existait des antigènes spécifiques sur les tumeurs humaines et donc si les lymphocytes T humains pouvaient distinguer les cellules tumorales des cellules normales* ». Ils ont co-cultivé des biopsies de tumeurs primaires en présence des lymphocytes périphériques du même patient. Les lymphocytes reconnaissant des antigènes tumoraux ont alors proliféré et se sont différenciés en lymphocytes T cytotoxiques (LTc). L'équipe de T.Boon a alors utilisé les clones de LTc pour sélectionner des sous-populations de cellules tumorales dont les génomes ont été comparés. C'est ainsi que les gènes codant pour ces antigènes dits « de tumeur » ont été identifiés, en l'occurrence les antigènes du groupe MAGE (melanoma-associated antigen) dans le mélanome.

Aujourd'hui, les antigènes associés aux tumeurs (TAA) sont classés en cinq catégories en fonction de leur profil d'expression et de leur origine (**Tableau 1**).

Famille d'antigène	Caractéristiques d'expression		Exemples
Antigènes de type « cancer-testis »	Antigènes exprimés dans de nombreux cancer : Mélanome, sein, poumon, myélome, vessie etc. Ces antigènes sont également retrouvés dans les cellules germinales (mais non présenté : absence de CMH sur les cellules germinales)		MAGE-A1 : Mélanome NY-ESOS1 : Mélanome, cancer de l'ovaire, myélome etc.
Antigènes de différenciation	Antigènes exprimés par les cellules tumorales et les cellules saines issues d'un même tissu		MART1, gp100, Melan A tyrosinase : Mélanome PSA, PAP, PSMA : Prostate
Antigènes surexprimés	Antigènes exprimés ou surexprimés suite à des mutations (translocations chromosomiques, délétions)	Présents dans les cellules saines	HER-2/neu : cancer du sein p53 : Cancer de la vessie, pancréas télomérase : 90 % des cancers
Antigènes codés par des gènes mutés		Absents des cellules saines	BCR-ABL : Leucémie myéloïde chronique K-ras : colôn, pancréas
Antigènes tumoraux issus de protéines virales	Antigènes produits par les cellules tumorales infectées par des microorganismes oncogènes (majoritairement des virus)		EBV : carcinome du Nasopharynx HBV, HCV : Cancer hépatique HPV : Cancer du col de l'utérus

Tableau 1 : Classification des différents antigènes tumoraux (D'après A.Quilbe)

Suite à l'activation de la réponse innée on retrouve dans la circulation et au niveau tumoral, des lysats, des fragments de corps apoptotiques de cellules transformées. Les DC vont capter, apprêter et présenter directement aux lymphocytes les peptides issus d'antigènes tumoraux. Les cellules dendritiques vont alors activer directement les lymphocytes en exprimant à la fois les peptides tumoraux et des molécules de co-stimulation. Cette activation directe permet d'engendrer une réponse cellulaire cytotoxique et humorale protectrice. L'activation lymphocytaire est un processus qui nécessite trois signaux. D'abord, la reconnaissance du complexe antigène/CMH par le complexe TCR/CD3 (signal 1), puis un signal de co-stimulation par l'interaction CD28-CD80/86 respectivement sur le LT et la DC (signal 2). Enfin, un stimulus cytokinique composé d'IL-4, IL-2 et IL-12 (signal 3) va permettre la prolifération des LT en favorisant notamment la sécrétion d'IL-2 et de TNF α . En outre, le signal de co-stimulation émis suite à l'interaction entre le CD40 Ligand

et son récepteur permet aussi de renforcer l'activation des LT et des DC ainsi que leur survie.

- Réponse humorale

Bien que la réponse humorale soit très importante dans le cas d'infection (virale, bactérienne, fongique) on ne connaît pas encore bien son impact au niveau tumoral. Néanmoins, il est montré que les lymphocytes B sont capables de produire des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux (p53, Erb-B2, Muc-1 etc.) et que ceux-ci conduisent à la destruction de ces cellules par ADCC. Malgré le succès des anticorps thérapeutiques en oncologie il reste difficile de déterminer dans quelle mesure cela affecte la prolifération des cellules tumorales (Hannani et al. 2014; Reuschenbach et al. 2009).

- Réponse cellulaire

Cette réponse est aujourd'hui décrite comme la voie majeure de l'immunité anti-tumorale. La réponse Th1 est couramment décrite comme la plus efficace pour l'élimination des cellules tumorales. Elle est caractérisée par la production d'IFN γ , de TNF α et d'IL-2 et oriente vers une activation de la réponse cellulaire cytotoxique envers les cellules tumorales (LTC et cellules NK). La sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et de TGF- β stimule la prolifération et l'activation des lymphocytes B et oriente vers une réponse humorale (type Th2). A l'inverse l'absence d'IL-4, une faible production d'IL-2 et une forte production d'IL-10 et de TGF- β (Transforming Growth Factor beta) signent une réponse régulatrice potentiellement pro-tumorale (Liu et al. 2012; Zhu & Paul 2010). A noter qu'une réponse régulatrice peut, en limitant l'inflammation, parfois être associée à un bon pronostic, essentiellement dans les stades précoces de la maladie (Ladoire et al. 2011; Badoual 2006; Carreras et al. 2006). Les processus qui induisent l'orientation vers une réponse Th1, Th2 ou régulatrice ne sont pas complètement compris à ce jour. On sait en revanche que la nature des cytokines, des différents signaux de co-stimulation et la nature de la liaison du peptide avec le CMH interviennent dans cette différenciation et sont majeurs dans l'orientation d'une réponse anti-tumorale.

Les lymphocytes cytotoxiques (LTC) représentent 20 à 30 % des lymphocytes T. Ils sont aujourd'hui décrits comme des acteurs majeurs dans l'élimination des cellules tumorales. Après activation et reconnaissance des Ag tumoraux *via* le CMH I ou II, les LTC induisent directement la lyse des cellules tumorales en libérant le contenu de leurs granules cytotoxiques riche en perforine et granzyme B. Elles peuvent également induire l'apoptose des cellules tumorales en sécrétant des sérine-estérases, de l'INF- γ , le TNF- α et le TGF- β et engagent leur ligand Fas. Par ailleurs les lymphocytes T helper après activation, libèrent l'IL-2 et expriment la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25), permettant ainsi à cette cytokine d'agir de manière autocrine pour activer leur prolifération et leur survie (Golstein & Griffiths 2018).

En conclusion, la théorie de l'immunosurveillance consiste en l'élimination des cellules tumorales à la fois par les cellules de l'immunité innée et adaptative (**Figure 1**).

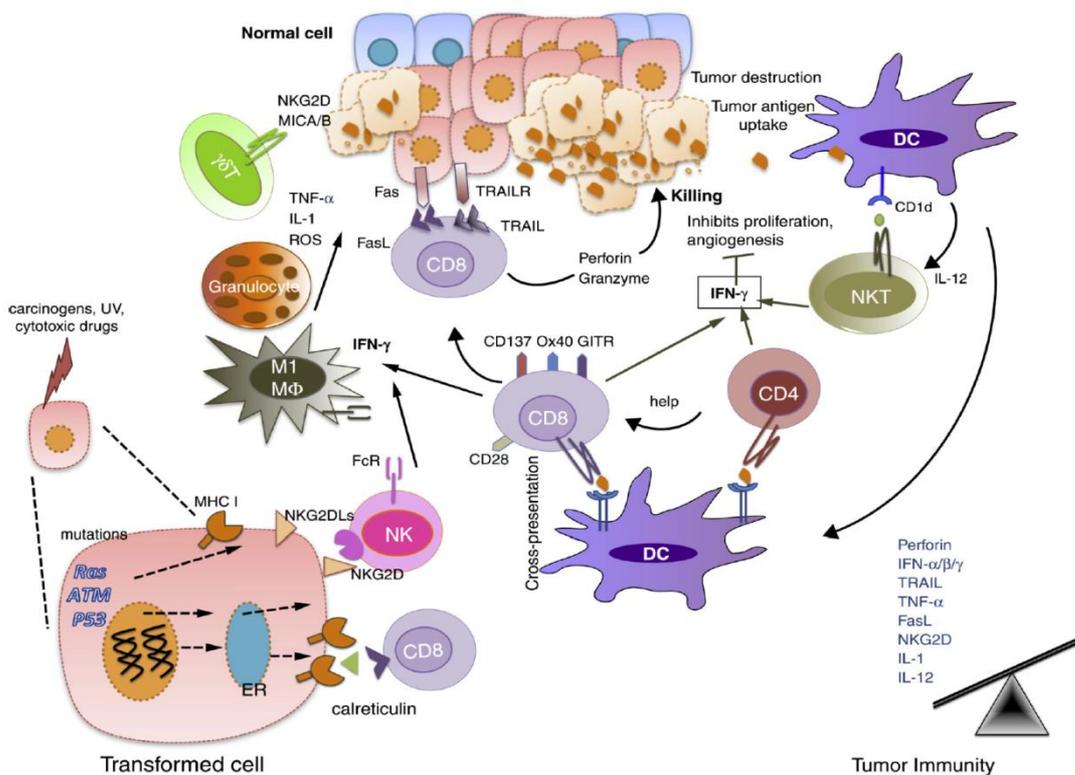


Figure 1 : Représentation schématique des différents acteurs de l'immunité innée et adaptative impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses (Mittal et al. 2014).

Plus récemment, cette théorie de l'immunosurveillance émise par Paul Ehrlich a été revisitée par la théorie de l'immunoédition des cancers (Dunn et al. 2002)(Schreiber et al. 2011) (théorie des 3E) proposée par Robert Schreiber. Cette théorie stipule que SI peut dans un premier temps conduire à l'Élimination de la tumeur et selon cette même théorie, une sélection progressive de clones résistants va se mettre en place suite à la pression du SI. Il s'en suit alors un second état dit d'Équilibre où le SI maîtrise la prolifération des cellules tumorales sans pour autant les éradiquer. Finalement, des clones tumoraux plus agressifs et résistants à la réponse immunitaire vont émerger, c'est la phase dite d'Échappement tumoral.

D. Échappement tumoral au système immunitaire

Les cellules tumorales ayant échappé à la phase d'élimination rentrent dans une phase d'équilibre avec le SI. C'est précisément à ce stade que le SI va exercer une pression de sélection permettant aux clones tumoraux les moins immunogènes de se maintenir. La pression constante du système immunitaire façonne la tumeur en conduisant celle-ci à accumuler des modifications génétiques et épigénétiques, jusqu'au moment où émerge un clone résistant. Une étude a montré chez la souris que suite à l'injection de faibles doses d'un carcinogène (3-methylcholanthrene), il était possible de détecter des cellules tumorales sans pour autant constater de masse tumorale (Koebel et al. 2007). Par la suite il a été montré chez ces souris que la neutralisation des lymphocytes T et de l'INF- γ provoquent l'apparition d'une tumeur au point d'injection. Ces résultats montrent le rôle majeur des lymphocytes T dans l'élimination des cellules tumorales et montrent également l'équilibre entre la prolifération des cellules tumorales et leur élimination par le SI. Chez l'homme ce stade est très difficile à étudier et peu de données sont disponibles.

Il est cependant probable qu'elle se déroule sur de nombreuses années voire durant toute la vie de l'hôte (Dunn et al. 2002; Zitvogel et al. 1998). A partir d'un certain stade il y a une rupture de l'équilibre et le système immunitaire ne contrôle plus la prolifération des cellules tumorales, on parle alors « d'immunosubversion », c'est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses (**Figure 2**). Il existe différents mécanismes par lesquelles les cellules tumorales parviennent à échapper au SI. Ces mécanismes d'échappement sont très étudiés et servent de base aux développements des stratégies d'immunothérapies.

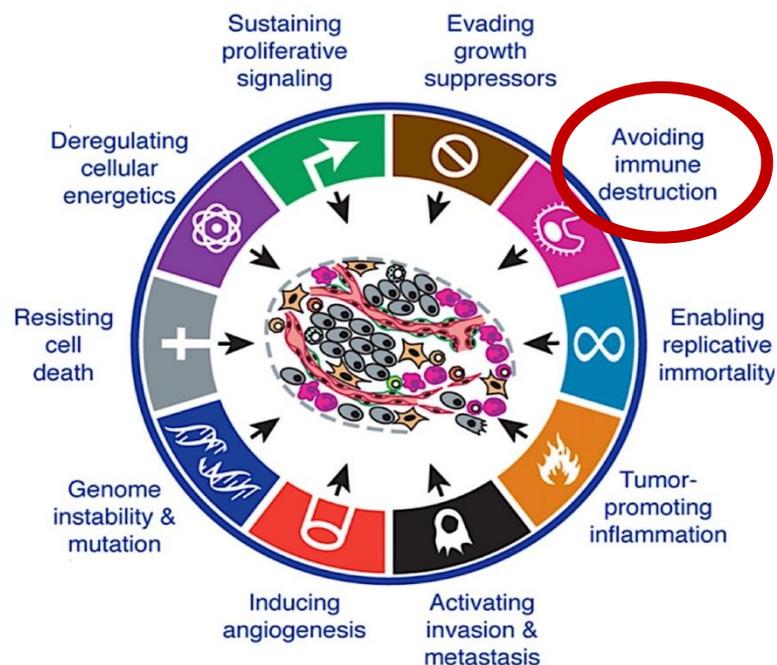


Figure 2 : Représentation schématique des principales caractéristiques des tumeurs et mécanismes permettant l'oncogenèse « The next generation of Hallmarks of cancer » (Hanahan & Robert A. Weinberg 2011)

1. Au niveau du microenvironnement tumoral

▪ Sécrétion d'Exosomes

Brièvement, les exosomes sont des nanovésicules de 30 à 150 nm de diamètre qui sont principalement sécrétés par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales (Kharaziha et al. 2012). Ils jouent un rôle de médiateurs intercellulaires en transmettant les molécules qu'ils portent. Ils peuvent transférer des ARNm ou microARN (Valadi et al. 2007), des molécules CMHI ou des antigènes. Ces nanovésicules ont été décrites comme étant impliquées dans la progression tumorale de plusieurs cancers tels que l'hépatocarcinome, le cancer de l'ovaire ou le carcinome du nasopharynx (Mrizak et al. 2015). On sait par exemple qu'ils sont capables d'internaliser et transporter des facteurs apoptotiques vers les cellules effectrices mais aussi d'induire l'expansion des cellules tolérogènes.

▪ Réaction desmoplastique

Les cellules tumorales sont capables d'induire un stroma dense essentiellement constitué de fibre de collagène, on parle de réaction desmoplastique. Ce stroma constitue une véritable barrière physique et chimique pour les lymphocytes T. Bien qu'il ait été montré que les lymphocytes peuvent se déplacer à travers le collagène, cette matrice est un réservoir de facteurs apoptotiques (FasL) et immunosuppresseurs (IL 10, TGF, IDO) (Sainio 2013) qui neutralisent la RI.

▪ Induction de cellules régulatrices de la réponse immune

Au niveau local, les cellules tumorales sécrètent un certain nombre de cytokines et facteurs immunosuppresseurs tels que l'IL-10, le TGF- β , le VEGF, IDO, PD-L1. Ces derniers induisent l'anergie des LTs et polarisent vers la réponse immune régulatrice. L'immunosuppression est renforcée par la présence, au niveau infiltrant et péri-tumorale, d'une forte proportion de leucocytes immunosuppresseurs : M2, DC tolérogènes, MDSCs (cellules suppressives dérivées des myéloïdes) et des Treg. Ils peuvent exprimer des molécules immuno-régulatrices telles que l'arginase, l'iNOS et l'IDO et sécréter à leur tour des cytokines immunosuppresseurs (IL-10 et TGF- β) qui peuvent inhiber la prolifération des LT et induire leur apoptose. Ces sous-populations immunosuppresseurs sont le plus souvent associées à un mauvais pronostic dans beaucoup de cancers. Les lymphocytes Treg et leur rôle dans l'immuno-évasion est particulièrement bien décrit dans la littérature.

Il existe plusieurs populations de Treg, mais là plus étudiée et là mieux caractérisée est celle des lymphocytes T CD4+ régulateurs (Gershon et Kondo, 1970) (Sakaguchi et al., 1995). Parmi ces CD4 régulateurs, deux populations prédominent, (i) les lymphocytes T régulateurs dits « naturels » nTreg et (ii) les T régulateurs dits « induits », iTreg (Abbas et al. 1996; Abbas et al. 2013). Les nTreg sont spécifiques des antigènes du soi et sont générés dans le thymus. Ils sont caractérisés par une surexpression constitutive du CD25 (Chaîne α

du récepteur à l'IL-2) et par l'expression concomitante d'un ensemble de marqueurs membranaires que sont CTLA4, LAG-3, GITR ainsi que du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3) (Campbell & Koch 2011). Enfin, ces cellules sont également caractérisées par le faible niveau d'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (CD127)(Yu et al. 2012). Les iTreg quant à eux, résultent soit de (i) l'activation d'un lymphocyte T en l'absence d'une exposition à un antigène et en présence de cytokines immunosuppressives, soit de (ii) la conversion d'une cellule T naïve en présence de certains facteurs comme la cyclooxygénase 2 (COX2),IDO, l'IL-10 ou le TGF β . Bien qu'il n'existe aucun marqueur qui leur soit spécifique, on peut caractériser les iTreg par la co-expression des molécules LAG 3, CD18, CD49b sur des lymphocytes T CD4 fortement producteurs d'IL-10 (Groux et al. 1997; Gagliani et al. 2013; Carpentier et al. 2009). De manière générale les propriétés immunosuppressives des Treg passent par quatre grandes voies (Shevach 2009; Schmidt et al. 2012). Une des premières voies consiste en la sécrétion de grandes quantités de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- β , et l'IL-35. Un autre mécanisme de suppression passe par la perturbation directe ou indirecte du métabolisme cellulaire des T effecteurs (Teff) par (i) la déprivation en IL-2 *via* le CD25, (ii) la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par des ectoenzymes (CD39 et CD73) mais aussi *via* une activation des cellules dendritiques tolérogènes qui elles-mêmes produiront l'enzyme IDO qui favorise une déprivation en tryptophane. De plus des mécanismes dits « contact-dépendants » ont été mis en évidence. Les Treg sont en effet capables de lyser directement les cellules effectrices *via* la sécrétion de granules préformés contenant notamment des perforines et des granzymes A et B. Une autre grande voie des mécanismes « contact-dépendant » fait intervenir des molécules de co-inhibitions, également connues sous le nom de point contrôle immunitaire ou « immune check point » tels que CTLA-4, PD-1 et LAG-3, à même de bloquer la maturation et les fonctions des cellules dendritiques et d'induire l'anergie des Teff. Récemment, un autre mécanisme de suppression direct a été mis en évidence passant par la sécrétion de la Gal-9 (Brevet WO2015185875).

2. Au niveau de la cellule tumorale

▪ Echappement aux signaux d'apoptose

L'une des stratégies d'échappement consiste à développer des mécanismes de résistance aux signaux de mort : Fas L et TRAIL présents sur les effecteurs cytotoxiques (Lymphocytes T et NK). Ainsi, on retrouve (i) une augmentation des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, FLIP) (ii) des protéines inhibitrices de l'apoptose comme PI-9/SPI-6 (iii) une perte de l'expression du récepteur Fas et enfin (iv) une expression importante de récepteurs leurres pour FasL et TRAIL (Lewandowski et al. 2015).

▪ Diminution de l'immunogénicité des tumeurs

Comme précisé précédemment, la présentation antigénique est indispensable à l'activation des lymphocytes T. Pour être reconnus par un lymphocyte T, les antigènes sont d'abord dégradés en peptides. Ensuite, ces peptides sont acheminés par le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) dans le réticulum endoplasmique (RE) puis ancrés dans le CMH avant d'être présenté aux LT. La diminution de l'immunogénicité passe notamment par :

- La perte ou l'altération de l'expression du CMH I : mutations sur les séquences codantes du CMH, altération de la β 2 micro-globuline (Paul 1990).
- La modulation antigénique : Arrêt de la synthèse ou de l'expression de l'antigène tumoral.
- L'altération de l'expression et de l'apprêtement des antigènes tumoraux sur le CMH : altération des sous unités du protéasomes comme LMP-2, LMP-7, LMP-10, ERAP ; altération des transporteurs peptidiques comme TAP-1 et TAP-2 (Lou et al. 2008; Seliger et al. 1997).

Malgré l'expression des antigènes tumoraux, les cellules tumorales restent faiblement immunogènes et ne présentent à leur surface qu'une faible densité de peptides antigéniques (Alexandrov et al. 2013). De plus, l'absence de molécules de co-stimulation sur les cellules tumorales empêche une reconnaissance efficace par le TCR et conduit à l'anergie des lymphocytes. On retrouve également la présence de facteurs solubles des récepteurs NKG2D/ MICA et MICB, expliquant en quoi la perte d'expression du CMH I ne sensibilise pas la tumeur à une attaque par les cellules NK (De Andrade et al. 2018).

L'inflammation est essentielle pour la mise en place de la réponse adaptative par les cellules dendritiques. La faible densité de peptides, la présence relative de DAMPs et d'inflammation, l'absence de signaux de co-stimulation induisent d'une part l'anergie des lymphocytes T mais orientent également le système immunitaire vers la tolérance. Dans ce cas, les cellules dendritiques vont acquérir un phénotype dit « tolérogène » et stimuler l'induction et la prolifération des Treg, inhibant la réponse immune.

- Induction de l'anergie des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes est un processus dynamique dans lequel l'activation (signaux 1 et 2) s'accompagne progressivement de l'expression de co-récepteurs inhibiteurs, CTLA-4 et PD-1 indispensables à la régulation physiologique de la réponse immune. Leur stimulation par des membres de la famille B7, CD80 et CD86 pour CTLA-4, PD-L1 (B7-H1, CD274) et PD-L2 (B7-DC, CD273) pour PD-1 entraîne une diminution de la prolifération et de la fonction effectrice des LT (Ribas 2015) su (**Figure 3**).

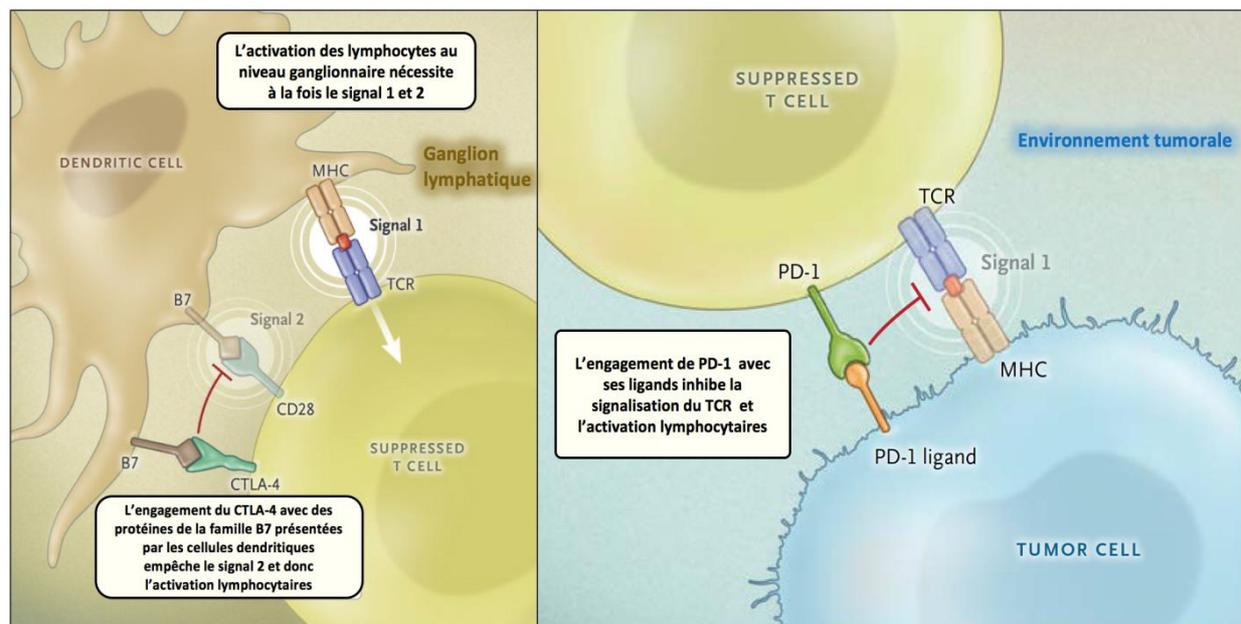


Figure 3 : Rôle de PD-1 et de CTLA-4 dans la synapse immunologique (Ribas 2015)

Une surexpression de ces protéines d'inhibition est retrouvée dans de nombreuses tumeurs (cancer cutané, pulmonaire, ovarien, colo-rectal, nasopharyngé etc.), détournant ainsi les mécanismes physiologiques d'anergie des LT (Zitvogel & Kroemer 2017).

Plus récemment, il a été montré qu'une enzyme semble jouer un rôle crucial dans l'immunosuppression, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette enzyme fréquemment exprimée par les tumeurs catabolise le tryptophane en kynurénine. L'absence de tryptophane, un acide aminé (aa) essentiel au LTc, et la présence kynurénine induisent l'anergie des LT effecteurs et la prolifération des Treg (Munn & Mellor 2016). Les cellules tumorales peuvent également induire l'apoptose des LTc *via* l'expression de FasL, TRAIL, et RCAS1 (Receptor-binding cancer antigen 1) (Lewandowski et al. 2015) (**Figure 4**).

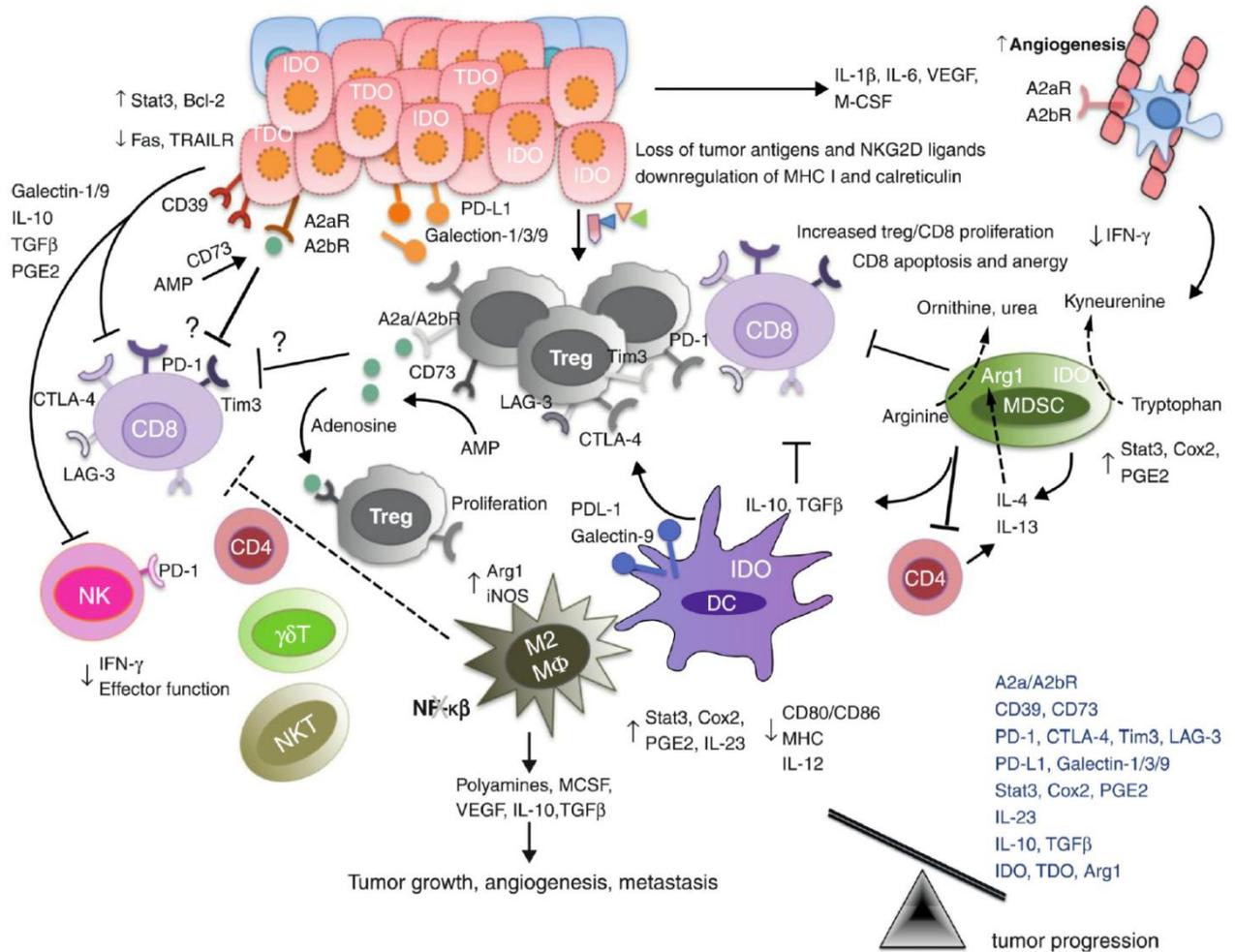


Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans l'échappement des cellules tumorales au SI (Mittal et al. 2014)

Très rapidement la description des divers mécanismes d'Élimination, et d'Échappements ont conduit aux premières stratégies de manipulation du SI pour traiter le cancer (Immunothérapie). La meilleure compréhension de la synapse immunitaire a bouleversé l'approche thérapeutique du cancer. Ces dernières années, le développement récent de stratégies visant à lever l'anergie des lymphocytes T a bouleversé la prise en charge thérapeutique du cancer. Les résultats spectaculaires obtenus avec les anti-PD1, anti-PD-L1 et anti CTLA-4 sont à l'origine du regain récent d'intérêt pour l'immunothérapie dans le cancer.

II. Immunothérapie

L'immunothérapie est aujourd'hui en passe de devenir un « standard » dans le traitement du cancer. L'immunothérapie est un terme qui regroupe l'ensemble des stratégies thérapeutiques dont l'objectif est (i) d'initier ou stimuler la réponse immune (ii) neutraliser les signaux inhibiteurs (iii) remplacer la réponse immunitaire envers les cellules tumorales sans affecter les cellules normales. Historiquement, on doit la naissance de l'immunothérapie anti-tumorale à William B. Cooley, lorsque celui observa une régression de sarcomes osseux suite à des surinfections post-opératoires par *Streptococcus pyogènes*. Cette observation le conduisit à traiter des patients en leur injectant directement des préparations à base de streptocoques atténués. Cette stratégie, bien qu'aujourd'hui presque abandonnée, est sur le plan conceptuel l'acte fondateur de l'immunothérapie.

Dans l'histoire récente de l'immunothérapie, on peut attribuer à E. Donnall Thomas (USA, New York) en 1957 mais aussi Georges Mathé et Jean-Louis Amiel (France, Villejuif, Institut Gustave Roussy) en 1964, la première immunothérapie efficace des cancers. Ils ont, en effet, réalisé les premières greffes de moelle chez des patients atteints de leucémies et de lymphomes (Thomas et al. 1957; Mathé & Amiel 1964). Cette stratégie est basée sur l'injection de moelle osseuse d'un individu sain à un patient leucémique dont les cellules hématopoïétiques sont détruites. Les cellules souches hématopoïétiques greffées s'éduquent alors vis-à-vis d'antigènes portés par les cellules leucémiques et les détruisent. Ils utilisèrent alors le terme « d'immunothérapie adoptive » ou « thérapie cellulaire par transfert adoptif » pour définir cette stratégie. Plus tard, des stratégies de stimulation du SI à l'aide d'agents infectieux ont été utilisées, mais, la grande toxicité de ces traitements et les résultats trop hétérogènes n'ont pas permis à ces stratégies de s'imposer (Amiel 1967). « Seule la BCG thérapie » est aujourd'hui couramment utilisée dans le cancer de la vessie. À défaut d'avoir pu s'imposer ces stratégies ont en revanche ouvert la porte à l'immunothérapie active.

Dans les années 1980, des stratégies d'immunothérapie active non spécifiques utilisant des cytokines activatrices comme l'IFN α ou l'IL-2 ont conduit à des fortes régressions dans quelques cas de mélanomes et dans le cancer du rein métastatique. Ces stratégies sont aujourd'hui abandonnées en raison de leur très forte toxicité et des réponses trop hétérogènes obtenues. La découverte dans les années 1990 des antigènes tumoraux a conduit au développement d'approches spécifiques avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux (immunothérapie passive spécifique) dirigés contre la cellule tumorale ou son microenvironnement (anti-ErbB2 : Trastuzumab). D'autres approches comme la vaccination thérapeutique (immunothérapie active spécifique) sont toujours en développement et un seul vaccin (Sipuleucel T®) dispose d'une AMM dans le cancer de la prostate. D'autre part, la découverte de ces antigènes a également relancé les stratégies d'immunothérapies adoptives, en apportant directement des lymphocytes T amplifiés *ex vivo*, éduqués vis-à-vis

des antigènes puis réinjectés. Enfin, l'amélioration de la compréhension des mécanismes d'activation et de régulation a conduit au développement d'anticorps permettant de lever l'anergie du SI en ciblant spécifiquement les points de contrôle du SI. L'effet spectaculaire de ces derniers traitements est à l'origine du regain récent de popularité du terme « immunothérapie » en oncologie. On peut classer les différentes stratégies d'immunothérapie en trois grandes catégories (Watier 2014) :

- a- L'immunothérapie passive spécifique/adoptive : Cette stratégie consiste à cibler un seul motif antigénique via l'injection d'anticorps monoclonaux développés en laboratoire (anti-ErbB2 : Trastuzumab) ou par transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui reconnaissent un antigène particulier.

- b- L'immunothérapie active spécifique : L'objectif est de stimuler le système immunitaire de façon ciblée par vaccination comme avec le Sipuleucel T® pour le cancer de la prostate.

- c- L'immunothérapie active non spécifique : C'est elle qui est à l'origine du regain récent de popularité du terme immunothérapie en oncologie. Il s'agit ici d'injecter un anticorps ciblant le système immunitaire (« Immune checkpoint inhibitors » : ICI) et déterminant une immunité active anti tumorale par désinhibition des lymphocytes effecteurs (anti-CTLA4 ; anti-PD-1 ; anti-PD-L1).

L'objectif de l'immunothérapie anti-tumorale est de réactiver la réponse cytotoxique contre les cellules tumorales. D'après le cycle « immunité cancer » de Daniel Chen et Ira Mellman, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques nécessite 7 étapes qui doivent être « initiées » et « autorisées » pour conduire à une réponse anti tumorale efficace (Figure 5) (Chen & Mellman 2013). Chacune de ces 7 étapes est régulée par une balance de signaux activateurs et inhibiteurs.

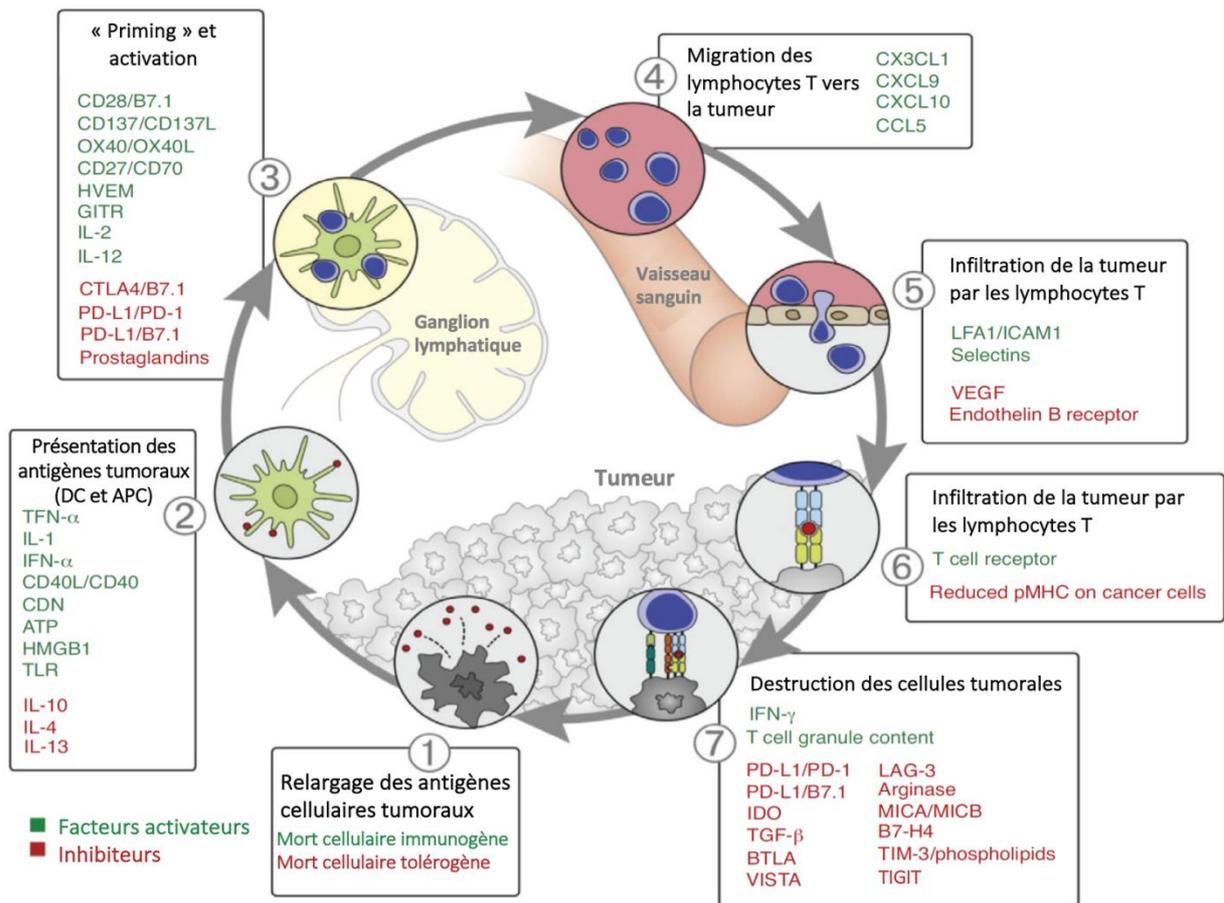


Figure 5 : Cycle immunité cancer (D'après Chen & Mellman 2013)

Les stratégies récentes d'immunothérapies ciblent ces signaux pour restaurer la RI. Nous décrivons dans cette partie les principales stratégies d'immunothérapie passive et active. L'objectif n'est pas d'énumérer la liste des traitements d'immunothérapie mais plutôt de comprendre comment les ICI peuvent potentialiser l'arsenal thérapeutique futur mais aussi celui actuellement établi dans le traitement du cancer. Nous décrivons dans un premier temps les stratégies d'immunothérapie passive et de transfert adoptif. Dans une deuxième partie nous décrivons les stratégies de vaccinations ensuite les différentes stratégies de blocage des points contrôle immunitaire et de vaccination.

A. Immunothérapie passive

1. Immunothérapie passive par injection d'anticorps monoclonaux

En 1975 Georges Köhler et César Milstein décrivent la production des anticorps monoclonaux et reçurent en 1984 le prix Nobel pour ce travail (Köhler & Milstein 1975). Aujourd'hui, les techniques de productions ont été optimisées et les anticorps adaptés spécifiquement aux besoins. En médecine les anticorps ont pris une place majeure et sont utilisés aussi bien en curatif qu'en diagnostic. En immunothérapie anti-tumorale, ces anticorps ont été développés pour cibler spécifiquement des antigènes tumoraux ou moduler

le microenvironnement. Initialement conçus comme des « sérothérapies passives » ils ont été utilisés pour (i) bloquer l'activation et/ou la prolifération des cellules (ii) induire l'apoptose et (iii) interférer avec les capacités d'adhérence des cellules tumorales (**Tableau 2**).

Cible	Fonction	Dénomination	Isotype et cible
Cible tumorale	Anticorps cytolytiques	MabThera® rituximab	IgG1 Anti-CD20
		Poteligeo®, mogamulizumab	IgG1 Anti-CCR4
		Gazivaro®, obinutuzumab,	IgG1 Anti-CD20
	Anticorps antagonistes	Herceptin®, trastuzumab	IgG1 Anti-HER2
		Erbix®, céstuximab,	IgG1 Anti- EGFR
		Vectibix®, panitumumab,	IgG2 Anti-EGFR
		Perjeta®, pertuzumab	IgG1 Anti-HER2
	Anticorps immunoconjugués	Zevalin®, ibritumomab tiuxétan	IgG1Anti-CD20
		Adcetris®, brentuximab védotin,	IgG1 Anti-CD30
		Kadcyla®, trastuzumab emtansine,	IgG1 Anti-HER2
Cible microenvironnementale	Anticorps neutralisants	Avastin®, bévacizumab	IgG1 Anti-VEGF
		Xgeva®, dénosumab,	IgG2 Anti-RANKL
		Zaltrap®, aflibercept	Fc d'IgG1 fusionné à récepteur du VEGF
	Anticorps antagonistes	Cyamza®, ramucirumab	IgG1 Anti-VEGFR2
	Anticorps bispécifiques	Removab®, catumaxomab,	Anti- EpCAM : Anti-CD3
		Blincyto®, blinatumomab,	Anti-CD19 :Anti -CD3

Tableau 2 : Exemples d'anticorps monoclonaux actuellement utilisés en clinique (D'après Watier 2017)

Une fois injectés et fixés sur leur cible ces anticorps vont : bloquer ou activer un récepteur, induire la mort cellulaire par ADCC (cellules NK, DC, macrophages, neutrophiles) ou activer le complément. Des efforts importants d'ingénierie ont été déployés pour améliorer les fonctions effectrices de ces anticorps en manipulant notamment la région Fc (humanisation de la portion FC, IgG1 versus IgG4), en les couplant à des drogues (brentuximab védotin) ou en les rendant bispécifiques (blinatumomab) pour permettre par exemple le recrutement des lymphocytes T (Blincyto®, blinatumomab). Initialement murin, les premiers patients se sont immunisés en produisant des anticorps contre les anti anticorps murins (AHAM) injectés. Ces anticorps ont été observés dans 80 à 90 % des cas et réduisaient très significativement l'efficacité thérapeutique. Le développement d'anticorps chimériques, moins immunogènes, a permis de limiter l'induction AHAM. Par la suite de nombreux brevets ont été déposés pour développer des anticorps humanisés encore moins

immunogènes puis totalement humains « fully human ». Il est important de noter que de nombreux brevets ont été déposés sur le développement de ces anticorps sans réel fondement clinique (Watier 2014).

Bien que ces anticorps aient des effets anti tumoraux directs et rapides, il est maintenant très clairement montré qu'ils induisent également une réponse adaptative spécifique et que le terme « immunothérapie passive » n'est pas complètement adapté. Il a été montré que l'utilisation de l'Anticorps anti-HER2, dans un modèle murin immunocompétent, conduit au développement de lymphocytes T CD8 spécifiques et d'une mémoire immunitaire dirigée contre les cellules tumorales (Park et al. 2010). De même l'utilisation de cet anticorps ne permet pas d'inhiber la progression tumorale dans un modèle murin déficient en LTCD8+.

Dans une autre étude il a été montré que le transfert de lymphocytes T CD4+ provenant de souris traitées par anti-CD20 chez une autre souris, dans laquelle on injecte des cellules tumorales, permettait d'assurer une protection antitumorale, indiquant ainsi l'existence d'une mémoire immunitaire (Eissler et al. 2012; Abès et al. 2010). Enfin plus récemment il a été montré que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) une protéine impliqué dans l'angiogenèse module également l'expression et la densité de molécules de co- inhibitrices comme PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 (Voron et al. 2015; Fukumura et al. 2018). L'utilisation des anti-VEGF permet donc d'une part d'inhiber l'angiogenèse (immunothérapie passive) mais aussi de réduire la proportion de LT CD8+ intratumoraux co-exprimant trois ou quatre molécules de co-inhibitrices (immunothérapie active).

2. La thérapie cellulaire par transfert adoptif : Immunothérapie adoptive

La thérapie cellulaire adoptive (ACT : Adoptive Cell Transfer) est une forme d'immunothérapie passive qui consiste à préparer des lymphocytes T autologues amplifiés *ex vivo* puis à les réinjecter aux patients. On distingue aujourd'hui trois approches de thérapie adoptive. La première stratégie, TILs ACT (Adoptive Cell Transfer of Tumor-infiltrating lymphocytes), consiste à isoler et amplifier les lymphocytes T à partir d'une pièce tumorale. Les deux autres stratégies reposent sur l'amplification de lymphocytes T périphériques autologues génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique ("CAR T-cells") ou un TCR génétiquement modifié. Il a été montré qu'une chimiothérapie de conditionnement lympho-déplétive (cyclophosphamide +/- fludarabine) avant la réinjection des LT permet d'améliorer l'efficacité de la procédure. Ce conditionnement permet notamment d'éliminer les Treg qui constituent un frein à l'implantation de ce nouveau « pool » de cellules effectrices (Le Bris & Béné 2016; June et al. 2018; Borg 2017).

L'intérêt majeur de la stratégie TILs ACT est que les TILs présentent une très grande diversité antigénique et sont donc plus susceptibles de reconnaître les cellules tumorales. L'équipe de Rosenberg a utilisé avec succès cette stratégie en 2011 dans le mélanome avec des taux de réponses globales de 49, 52 et 72 % en fonction du régime de conditionnement (Rosenberg et al. 2011). D'autres essais ont été conduits dans différentes néoplasies comme le carcinome ovarien, le cancer du col de l'utérus et les tumeurs gastro-intestinales avec des résultats moins spectaculaires. L'équipe de Rosenberg a également développé avec succès des LT modifiés génétiquement pour reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux surexprimés dans le mélanome, MART-1 et NY-ESO-1. Les résultats du premier essai en 2006 dans le mélanome ont montré 40 % de réponse (Morgan et al. 2006) mais malgré des résultats intéressants la stratégie par transfert adoptif de TILs présente un certain nombre de limites. Le principal frein à cette stratégie est la restriction des lymphocytes T au CMH dans lequel le peptide antigénique est présenté. Ainsi une perte d'expression du CMH par la cellule tumorale ne conduira pas à l'activation des LTs. Par ailleurs en raison de la spécificité du CMH pour les antigènes protéiques, les antigènes tumoraux d'origine lipidique ou glucidique sont naturellement exclus. Le deuxième frein est la perte des molécules de co-stimulation associées à une forte expression des molécules d'anergie comme PD-1. La surexpression de ces molécules d'anergie explique notamment la diminution du potentiel cytotoxique des LT injectés. Compte tenu de la toxicité de la chimiothérapie de conditionnement et de la durée relativement longue d'amplification des TILs (5-6 semaines), il est nécessaire de sélectionner les patients dont la maladie ne progresse pas rapidement. Enfin, le nombre de TILs obtenus après l'amplification est aléatoire et ne permet pas toujours de traiter les patients (10 % des cas) (Borg 2017).

Pour toutes ces raisons d'autres stratégies de thérapie cellulaire ont été développées. Les CAR-T-cell, sont des cellules périphériques génétiquement modifiées pour exprimer un TCR chimérique non restreint par le CMH. Il en existe quatre générations mais ceux utilisés aujourd'hui co-expriment en plus du TCR chimérique, différentes unités de co-stimulation couplant au choix CD28, 4-1BB, ICOS et OX40 permettant ainsi de maintenir leur prolifération et leur survie jusqu'à 2 ans après la réinjection (June et al. 2018; Hartmann et al. 2017).

Évaluée dans les hémopathies malignes, l'utilisation des CART a conduit à des taux de réponse complète chez 70 à 90 % chez les patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques (Lee et al. 2015; Maude et al. 2014). Les CAR-T sont évalués dans de nombreuses tumeurs solides (neuroblastome, carcinome à cellules rénales, glioblastome multiforme, cancer du pancréas, sarcome, mélanome métastatique), mais les premiers résultats ne sont pas aussi spectaculaires que ceux obtenus dans les hémopathies malignes (June et al. 2018; Hartmann et al. 2017). Par ailleurs, l'administration de CAR-T s'accompagne dans 40 % des cas d'un syndrome inflammatoire systémique jusqu'à 10 jours après la réinjection. Ce syndrome de libération cytokinique (libération massive l'IL-6, l'IL-10, ou l'IFN) parfois mortel, nécessite l'administration de tocilizumab (Anti-IL-6) qui permet la régression du syndrome en 1 à 3 jours. Enfin 11% des patients présentent une toxicité neurologique grave non corrigée par le tocilizumab (Bonifant et al. 2016).

Dans le futur afin d'améliorer l'efficacité de ces thérapies adoptives, il sera nécessaire de (i) mieux comprendre l'importance du ratio CD8+/CD4+ dans le pool de lymphocytes réinjecté (ii) la circulation et le devenir de ces cellules dans l'organisme (infiltration tumorale, migration ganglionnaire, prolifération etc.). Il semblerait que l'un des obstacles majeurs à l'efficacité des CAR-T dans les tumeurs solides soit l'immunosuppression locale. Les combinaisons thérapeutiques avec d'autres immunothérapies neutralisant l'immunosuppression sont des pistes très prometteuses. C'est notamment le cas avec les anti-PD1 et les anti-CTLA4 qui ciblent des points de contrôles immunitaires et lèvent l'immunosuppression.

B. Immunothérapie active

1. Vaccination

Avec la découverte des antigènes tumoraux par l'équipe de T Boon en 1991, l'idée de vacciner les patients n'est pas nouvelle. En infectiologie, la vaccination est particulièrement efficace, à titre d'exemple le vaccin DT Polio ® permet d'éviter entre 2 et 3 millions de morts chaque année selon l'OMS. Cependant, la plupart des vaccins efficaces utilisés en infectiologie sont des « vaccins prophylactiques » et sont administrés avant l'infection. A l'exception des vaccins « prophylactiques » déterminants une immunité contre les oncovirus, en cancérologie les vaccins doivent être « thérapeutiques » et sont administrés pendant la progression tumorale.

L'objectif primaire n'est donc pas seulement d'induire une mémoire immunitaire, mais aussi de restaurer une réponse cytotoxique spécifiquement dirigée contre la tumeur. Actuellement de nombreuses stratégies sont en cours d'évaluation avec des peptides tumoraux purifiés, seuls ou en association, introduits ou non dans un vecteur viral, avec différents adjuvants. Quelques résultats intéressants ont été obtenus dans le mélanome mais, globalement, la majorité de ces essais se révèlent d'un intérêt clinique limité.

Les DC ayant une place centrale dans l'activation de la réponse immune, elles constituent une option thérapeutique particulièrement intéressante. Le principe est d'extraire à partir du sang du patient les précurseurs DC et d'induire la maturation et la prolifération de ces DC *ex vivo* en présence de cellules tumorales ou d'un ou plusieurs antigènes tumoraux avant de les réinjecter. La stratégie de vaccination par cellules dendritiques dérivées de monocytes n'a montré qu'une efficacité relative dans différents cancers comme le mélanome métastatique, le neuroblastome, le sarcome et le lymphome (Pecher et al. 2002; Hsu et al. 1996; Weden et al. 2011; Oshita et al. 2012; Baeyens et al. 2014; Krishnadas et al. 2015; Wilgenhof et al. 2011). Le sipuleucel T est le seul vaccin de ce type à avoir l'AMM et n'offre qu'un bénéfice très modeste de 4 mois. Dans le cas du spileucel T, les précurseurs monocytaires du patient sont isolés puis amplifiés *ex vivo* en présence de GM-CSF et de l'antigène tumoral associé aux tumeurs prostatiques, PAP, avant d'être réinjectés. L'obstacle majeur est le fort taux de mortalité parmi les DC et le fait que les DC arrivent difficilement à rejoindre les aires ganglionnaires après injection (Blanc et al. 2017). Ces stratégies de vaccination sont également très lourdes (culture *ex vivo*) et coûteuses, à titre d'exemple la cure de 3 injections de spileucel T ® coûte 75 000 euros. Enfin, on considère que l'autre obstacle majeur à la vaccination à des stades avancés est l'immunosuppression locale qui bloque l'action des lymphocytes. L'association avec des ICI améliore l'efficacité de ces stratégies de vaccination comme en témoignent les bénéfices cliniques de l'association Spileucel T et inhibiteur d'IDO (Jha et al. 2017).

2. Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) actuellement utilisés en clinique

▪ La voie du CTLA-4 :

Le CTLA-4 a été identifié par Pierre Golstein en 1985. Il a alors été montré que son expression est déclenchée au moment de l'activation du LT. Comme nous l'avons décrit précédemment, lorsque le lymphocyte T engage son TCR avec un antigène présenté par une CPA (signal 1), il nécessite la co-stimulation du récepteur CD28 avec des protéines de la famille B7, CD80/86 (signal 2) pour s'activer. A ce stade et pour éviter une hyperactivation excessive, des mécanismes physiologiques de contrôle de la réponse immune s'enclenchent, on retrouve alors à la surface des LT l'expression de molécules d'inhibition comme le CTLA-4 (CD152) (Lewandowski et al. 2015; Pardoll 2012). Le CTLA-4 apparaît donc précocement (stade 3 du cycle immunité cancer) à la surface des LT au niveau des organes lymphoïdes (Chen & Mellman 2013). Il se retrouve alors au niveau de la membrane

plasmique et rentre en compétition avec la fonction de co-stimulation de CD28. En effet il se lie avec une affinité beaucoup plus élevée que le CD28 aux membres de la famille B7 et exclut physiquement le CD28 de la synapse immunologique. L'engagement du CTLA-4 avec des membres de la famille B7 induit l'arrêt du cycle et des fonctions effectrices des lymphocytes T *via* l'inhibition de la signalisation proximale du TCR. Alors que l'activation des lymphocytes T effecteurs est nécessaire pour induire l'expression du CTLA-4, celui-ci est constitutivement exprimé par les Treg et l'on sait maintenant que son expression est essentielle à leurs fonctions suppressives. C'est en 1996 que l'équipe de J. Allison démontra que l'utilisation d'anticorps ciblant le CTLA-4 induisait la régression de tumeurs immunogéniques dans un modèle murin. Il a été montré, pour d'autres tumeurs moins immunogéniques, la nécessité de renforcer la réponse immune en neutralisant les Treg ou en stimulant l'immunité par la vaccination, l'ajout de cytokine ou l'association à d'autres inhibiteurs de ICI. Il est maintenant montré que l'efficacité des anti-CTLA-4 passe également par la neutralisation du CTLA-4 dans les Treg et leur élimination par des mécanismes d'ADCC (Grob et al. 2017; Olive & Golstein 2017).

Chez l'homme deux anti-CTLA4 entièrement humains, l'ipilimumab et le tremelimumab sont entrés en essai clinique chez des patients atteints d'un cancer avancé en 2000. Mais, c'est finalement un essai de phase III en 2011 dans le mélanome métastatique qui a conduit à l'enregistrement auprès de la FDA du premier anti-CTLA4, l'ipilimumab (Robert et al. 2011). L'ipilimumab (3 cycles espacés de 21 jours à la dose de 3 mg/kg) a alors été associé à la dacarbazine (traitement de référence) puis comparé à la dacarbazine seule. 20 % des patients traités avec l'ipilimumab ont montré des taux de survie spectaculaires malgré des taux objectifs de réponse très faibles (10 à 15 %). Ce profil de réponse suggère ainsi un contrôle immunologique de la tumeur sans pour autant conduire à son élimination. Le profil d'activité et de toxicité est apparu comme très différent de ceux des protocoles classiques de chimiothérapies conduisant ainsi les cliniciens à revoir leurs critères d'évaluation (irRECIST vs RECIST). En effet la réponse à l'ipilimumab s'observe tardivement jusqu'à 9 mois après la première cure et s'accompagne parfois de « pseudo-progression ». Cette « pseudo-progression » se caractérise soit (i) par une augmentation de la taille des lésions, (ii) par l'apparition de nouvelles lésions ou, plus inédit encore, par (iii) des réponses dites « dissociées » avec apparition de nouvelles lésions mais accompagnées de régression sur les autres. On sait maintenant que ces « pseudo-progressions » sont, entre autres, liées à la restauration de la réponse immune et à l'afflux massif de cellules immunitaire provoquant des phénomènes d'œdèmes et nécroses tumorales. De façon intéressante, le tremelimumab fait toujours l'objet d'études cliniques car il n'a pas montré son efficacité dans le mélanome, et d'autres anticorps anti-CTLA-4 ont récemment fait l'objet d'essais cliniques (NCT02694822). Devancée par de nouvelles immunothérapies, l'utilisation thérapeutique de

l'ipilimumab est aujourd'hui limitée aux mélanomes dans laquelle il n'a l'AMM qu'en deuxième ou troisième intention.

En terme de toxicité, on rapporte des effets secondaires auto-immuns chez 90 % des patients traités. Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés sont les suivants : diarrhée, rash, prurit, fatigue, nausées, vomissement, diminution de l'appétit et douleur abdominale. Les effets secondaires sévères (de grade 3 ou 4) sont présents chez 10 à 40 % des patients, affectant le tube digestif, le foie, la peau et le système endocrinien. Ces effets secondaires sévères sont principalement des hépatites auto-immunes (8%), des hypophysites (4 %), des colites auto-immunes (8%). Ils résultent principalement d'une inflammation tissulaire spécifique liée à une l'hyperréactivité du système immunitaire après démasquage des lymphocytes T autoréactifs et à la déplétion de populations T régulatrices. Ils sont pris en charge par corticoïdes ou anti-TNF. En cas de persistance il est nécessaire d'interrompre le traitement (10 % des cas). Finalement, le pronostic vital est mis en jeu dans 0,5 à 1 % des cas (insuffisance hépatique fatale, de nécrolyse épidermique toxique, syndrome de Guillain-Barré, perforation gastro intestinale) (Grob et al. 2017; Olive & Golstein 2017; Ribas & Wolchok 2018).

Cette toxicité auto-immune peut-être notamment liée au fait que le CTL-4 intervient précocement dans l'activation lymphocytaire. Alors que l'utilisation d'immunothérapies agissant plus tardivement pendant le cycle de l'activation lymphocytaire limite les effets secondaires auto-immuns comme cela est rapporté avec les anti-PD-1.

- La voie du PD-1 :

Tasuku Honjo dans les années 1990, décrit la voie PD-1 et son ligand PD-L1 comme une voie physiologique de contrôle de la réponse immune. L'expression de PD-1 est particulièrement élevée sur les lymphocytes T CD4 + et les lymphocytes T auxiliaires folliculaires, mais on le retrouve également sur un grand nombre de cellules immunitaires comme les Treg, les lymphocytes B, les NK, les monocytes et les DC. On lui connaît deux ligands appartenant à la famille B7 : PD-L1 (B7-H1, CD274) et PD-L2 (B7-DC, CD273). PD-L1 est exprimé entre autres sur les cellules T et B, les cellules dendritiques (DC), les macrophages, et les cellules souches mésenchymateuses et les cellules tumorales alors que l'expression de PD-L2 est plus restreinte aux CPA (macrophages et cellules dendritiques) (Zou & Chen 2008). Après activation on a retrouvé une expression de PD-L1 dans les tissus non lymphoïdes en particulier les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les hépatocytes, les astrocytes et dans de nombreux cancers (mélanome, cancer pulmonaire, cancer du sein et de l'ovaire, adénocarcinome du pancréas et de l'œsophage, tumeurs rénales et vésicales). L'engagement de PD-1 avec ses ligands PD-L1, PD-L2 entraîne le recrutement de la tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) responsable de

la déphosphorylation des corécepteurs proximaux du TCR (CD3 ϵ et CD28) et de ses molécules de signalisation (ZAP-70, ERK et JNK)(Zitvogel & Kroemer 2017). Physiologiquement l'engagement de PD-1 conduit à une diminution de la libération des cytokines et des chimiokines, une diminution de la cytotoxicité et une diminution de la survie cellulaire. L'expression de PD-L1 et PD-L2 est principalement induite par l'IFN γ mais aussi par d'autres acteurs de l'inflammation comme le TNF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 et IL-21. L'inflammation induite par l'activation des lymphocytes stimule l'expression de PD-L1 et PD-L2 dans les tissus permettant ainsi d'éviter une activation excessive des lymphocytes T. Il a été montré que la voie PD-1/PD-L1 permet de réguler la réactivité du TCR en conditions physiologiques (inflammation) et pathologiques (processus tumorigénèse) (Olive & Golstein 2017; Ribas & Wolchok 2018). Plus précisément la voie PD-1/PD-L1 interviendrait lors de niveaux excessifs d'activation du TCR pour un faible seuil de co-stimulation du CD28. A la différence du CTLA-4 qui régule l'activation précoce des lymphocytes T naïfs au niveau des organes lymphoïdes, PD-1 intervient durant la phase effectrice dans les mécanismes de tolérance périphérique lors d'inflammations chroniques ou du développement tumorale (Pardoll 2012). Le rôle périphérique de PD-1 est très bien illustré avec les modèles murins *knock-out* pour le CTLA-4 ou PD-1. Alors que les souris génétiquement invalidées pour le gène de CTLA-4 meurent rapidement d'une prolifération lymphocytaire massive, les souris génétiquement invalidés pour PD-1 survivent malgré des taux plus élevés de lymphocytes T et B et une prédisposition à l'auto-immunité.

Il existe actuellement 2 anticorps anti-PD-1, le nivolumab (Opdivo®) et le pembrolizumab (Keytruda®) et 3 anti-PDL1 l'atezolizumab (Tecentriq®), le durvalumab (Imfinzi®) et l'avelumab (Bavencio®) approuvés par la FDA dans 11 indications de cancer. Le premier anti-PD-1 (nivolumab) a été administré en 2006 dans un essai de phase 1 à des patients atteints de mélanomes, de cancers rénaux, et de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)(Ribas & Wolchok 2018). Les résultats spectaculaires obtenus et la toxicité modérée de cette nouvelle stratégie a accéléré les essais cliniques et le développement d'autres anti-PD-1 et anti-PDL-1. En 2011, le plus grand essai de phase 1 jamais conduit en oncologie a évalué, chez 1235 patients atteints de mélanome métastatique ou de CBNPC, un nouvel anti-PD-1, le pembrolizumab (Garon et al. 2015; Ribas et al. 2016). Les deux anti-PD-1, nivolumab et pembrolizumab, ont obtenus leurs premières autorisations par la FDA en 2014 et en 2015 pour le traitement des patients atteints de mélanome réfractaire ou de CBNPC avancé (**Figure 6**). En 2016, le premier anti-PD-L1, l'atezolizumab a été approuvé pour les cancers urothéliaux suivi de l'avelumab en 2017 pour le carcinome à cellules de Merkel.

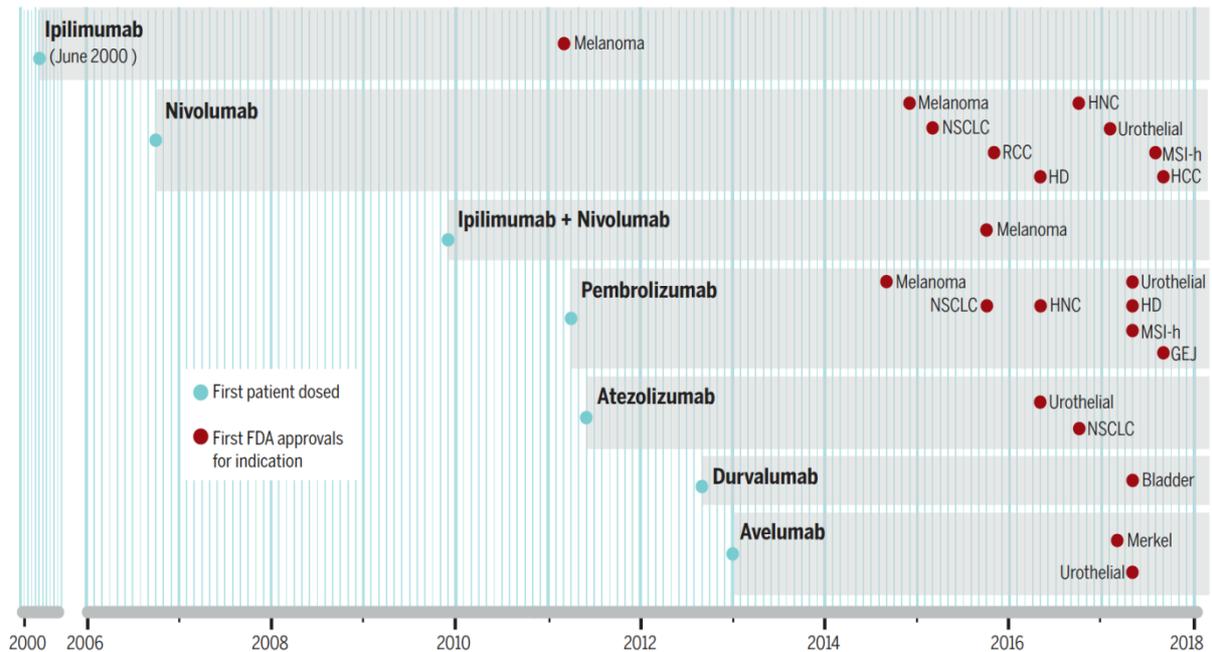


Figure 6 : Représentation schématique du développement clinique des anticorps anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1 de la première administration à l'approbation de la FDA (Ribas & Wolchok 2018). La partie grise représente la période de développement clinique de chacun de ces anticorps, à partir de la première administration jusqu'à l'approbation réglementaire (cercles rouges) dans différentes indications. HNC, (cancer de la tête et du cou) ; RCC (carcinome rénal) ; MSI-h, (cancer à instabilité microsatellitaire) ; HD, (maladie de Hodgkin) ; HCC, (carcinome hépatocellulaire) ; GEJ, (cancer de la jonction œsophagienne). Point bleu : Début des essais cliniques ; Point rouge : Approbation par la FDA.

Le blocage de la voie PD-1 conduit à de très bonnes réponses objectives (diminution de la taille de la tumeur), dans la maladie de Hodgkin (87 %), le mélanome desmoplastique (70%), les cancers MSI (53%) et le carcinome à cellules de Merkel (56 %). Des réponses intermédiaires ont été obtenues dans les autres indications comme le mélanome (35 à 40 %) et le CBNPC (20 %) (Ribas & Wolchok 2018). Par ailleurs le blocage de la voie PD-1 est associé à une toxicité plus faible que le blocage de la voie du CTLA-4. Ces toxicités nécessitent une intervention médicale dans 10 à 15 % des cas et ne nécessitent que très rarement l'interruption du traitement (2 à 5 %). Les effets indésirables les plus fréquents retrouvés chez 50 à 70 % des patients sont : la fatigue, la diarrhée et les éruptions cutanées. On retrouve assez fréquemment des endocrinopathies liées à l'infiltration des glandes thyroïdiennes (10 à 15 %), surrénaliennes (1 à 3 %), pancréatique (1%) par les lymphocytes T. En général ces troubles ne sont pas réversibles et nécessitent un traitement de substitution à vie. Les toxicités sévères de grade 3-4 sont rapportées chez 5 -10 % des patients. De façon beaucoup plus rare des toxicités inflammatoires graves des organes viscéraux (1%) peuvent mettre en jeu le pronostic vital. Elles peuvent toucher tous les organes, y compris le cerveau (encéphalopathie), les méninges (méningite), les poumons (pneumonie), le coeur (myocardite), le tractus gastro-intestinal (oesophagite, colite, hépatite), et rénale (néphrite), mais aussi les muscles (myosite) et les articulations (arthrite). Comme

pour l'ipilimumab, elles sont prises en charge par corticoïdes ou anti-TNF (Ribas & Wolchok 2018; Zitvogel & Kroemer 2017).

Les résultats spectaculaires obtenus par l'intervention sur la voie PD-1 et CTLA-4 ont ouvert la voie à d'autres immunothérapies. En effet, la synapse immunologique est composée de nombreux points de contrôle qui permettent une régulation chronologique et biologique de la réponse immune (**Figure 7**).

3. D'autres ICI en cours de développement

Malgré des résultats spectaculaires un pourcentage élevé de patients ne répond pas à l'immunothérapie, y compris dans le mélanome. De nombreux essais cliniques (phase I/IIa) évaluent différentes combinaisons ciblant d'autres molécules de co-inhibitrices. La grande majorité des voies représentées sur la **Figure 7** sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais de phase I ou II. De façon assez inhabituelle pour des essais de phase 1, les anti- LAG-3, anti-TIGIT, anti-TIM-3 et anti-IDO sont actuellement évalués seuls ou en association dans de très grande cohorte et ont le potentiel pour arriver très rapidement en clinique.

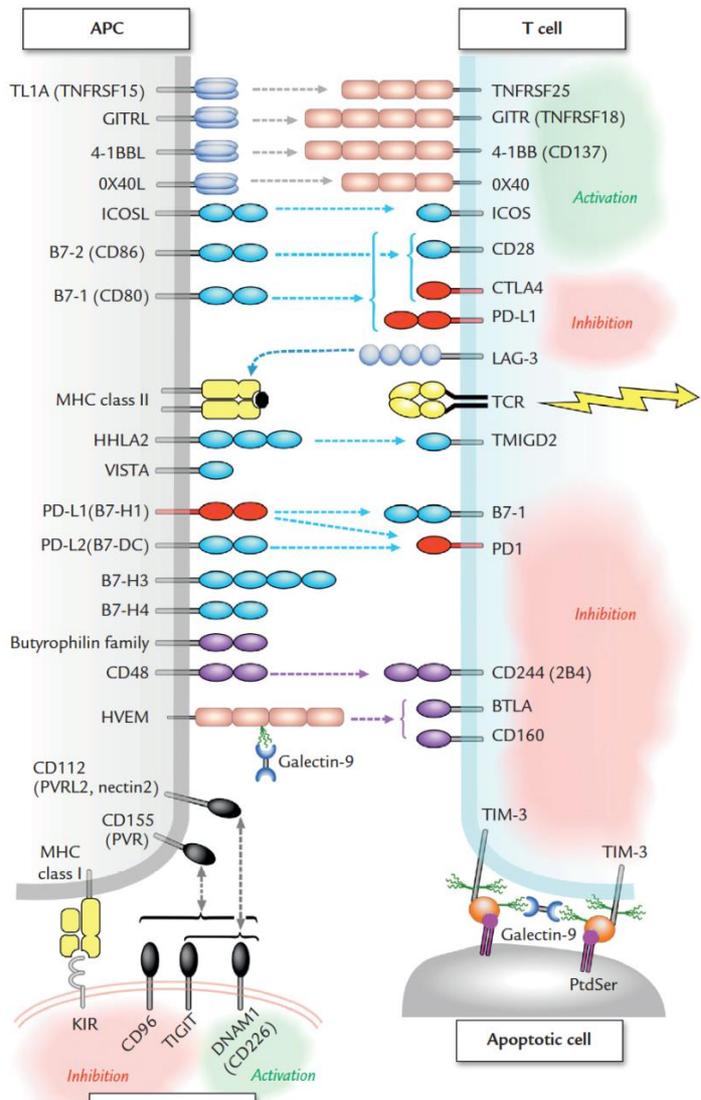


Figure 7 : Représentation schématique des cibles potentielles dans la synapse immunologique (Mahoney et al. 2015)

- La voie LAG-3 :

Le récepteur LAG-3 a été identifié en 1990 sur les lymphocytes T CD4+ et T CD8+. On sait aujourd'hui qu'il est principalement exprimé par les T CD4+ ayant des fonctions régulatrices comme les nTreg, les iTreg, et les Tr1 (Treg sécréteurs d'IL-10)(Anderson et al. 2016). On le retrouve également sur les lymphocytes T CD8+ et les NK tumoraux. LAG-3 se lie au CMH II ainsi qu'à la LSECtin. Cette protéine est une lectine de surface appartenant à la famille DC-

SIGN, retrouvée dans le foie et de nombreuses tumeurs. L'engagement de LAG-3 avec ses ligands induit l'inhibition des cellules T effectrices et potentialise l'effet suppressif des Treg. Chez l'homme, les T CD8+ co-exprimant LAG-3 et PD-1 sont plus anergiques que les T CD8+ exprimant seulement PD-1. En revanche l'expression de LAG-3 sur les Treg est associée à un phénotype très suppressif et a été corrélée à un mauvais pronostic. La neutralisation de Lag-3 et PD-1 permet de restaurer la production de cytokines et la prolifération des lymphocytes T CD8+. Chez l'homme des essais cliniques ont été réalisés avec une forme soluble de LAG 3 (IMP321). L'idée a été d'utiliser l'IMP321 pour sa capacité à se lier fortement au MHC de classe II exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes. L'engagement de IMP321 avec le CMH II conduit à la maturation puis à la migration des cellules présentatrices d'antigènes vers les ganglions lymphatiques pour induire une réponse immunitaire. L'IMP321 a été évalué seul ou en association avec des peptides antigéniques dans le cancer rénal, le mélanome (métastatiques ou non), le cancer pancréatique et le cancer de la prostate et du sein. Il est bien toléré et son utilisation a amélioré significativement la survie des patients avec notamment 50 % de réponse dans le cancer du sein. D'autres études sont encore nécessaires pour avoir une meilleure compréhension de son mécanisme d'action et son utilisation en clinique. Une autre stratégie consiste à cibler directement LAG-3 avec un anticorps monoclonal, seul ou en association avec un anti-PD-1. On retrouve sur ClinialTrial.gov (avril 2018), 15 essais de phase I impliquant un anticorps anti-LAG-3 et le laboratoire BMS évalue actuellement son anti-LAG-3 chez presque 2000 patients dans 6 essais de phase (ClinialTrial.gov 2018).

- La voie TIM-3 :

Le récepteur TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-3) a été identifié en 2002 sur les cellules Th1 et TCD8+ sécrétant de l'IFN- γ . Il est très fortement exprimé sur les T CD8 + et sur les nTreg infiltrant les tumeurs. On a également décrit son expression sur les cellules de l'immunité innée (NK, monocytes /macrophages circulants). Son engagement avec ses ligands induit un arrêt de la prolifération, une baisse de la production de cytokines et l'apoptose des Teff. Son principal ligand est la galectine 9, mais on en connaît 3 autres : Ceacam-1, high mobility group protein B1 (HMGB-1), et la phosphatidyl serine. La liaison Tim-3/galectine 9 induit l'apoptose des lymphocytes Th1 et entraîne l'expansion des MDSC, des Treg et des M2. Il a été montré une co-expression et une synergie entre TIM-3 et PD-1 sur les sites inflammatoires. De façon très intéressante les LTCD8+ Tim-3+ PD-1+ (double positif) sont bien plus anergiques que les LT CD8+ Tim-3- PD-1 + (simple positif). Ces deux récepteurs agissent de façon non redondante comme régulateurs négatifs de la réponse des lymphocytes T. Ensemble, ces observations indiquent que l'engagement de Tim-3 inhibe le système immunitaire adaptatif de façon indirecte *via* la promotion des populations régulatrices (MDSC, Treg, M2) et de façon directe en entraînant l'apoptose des effecteurs (Th1)(Anderson et al. 2016; Du et al. 2017). L'utilisation d'un Anticorps bloquant Tim-3 a

conduit au rejet des tumeurs dans de nombreux modèles murins. Chez l'homme plusieurs essais sont en cours. Néanmoins, il est important de noter que le blocage thérapeutique de Tim-3 affectera plusieurs cibles comprenant, les lymphocytes T CD4 +, les cellules T CD8 +, les cellules FoxP3 + Treg, cellules NK, les DC et les MDSCs et que, dans toutes ces cellules Tim-3, agit pour inhiber la réponse immunitaire et promouvoir la tolérance. Plusieurs essais de Phase I-Ib/II (NCT02817633, NCT02608268, NCT03066648, NCT03099109) sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité des anti TIM-3 seuls ou en association avec des anti-PD-1/PD-L1.

▪ La voie TIGIT :

Plus récemment TIGIT a été caractérisée comme un récepteur inhibiteur, s'exprimant principalement sur les lymphocytes T NK, Treg, TCD8+/CD4+ ainsi que sur un sous-ensemble de LT folliculaire helper (Tfh). TIGIT se lie à deux ligands, CD155 (PVR) et CD112 (PVRL2, nectine-2), exprimés sur les CPA et les cellules tumorales. L'engagement de TIGIT

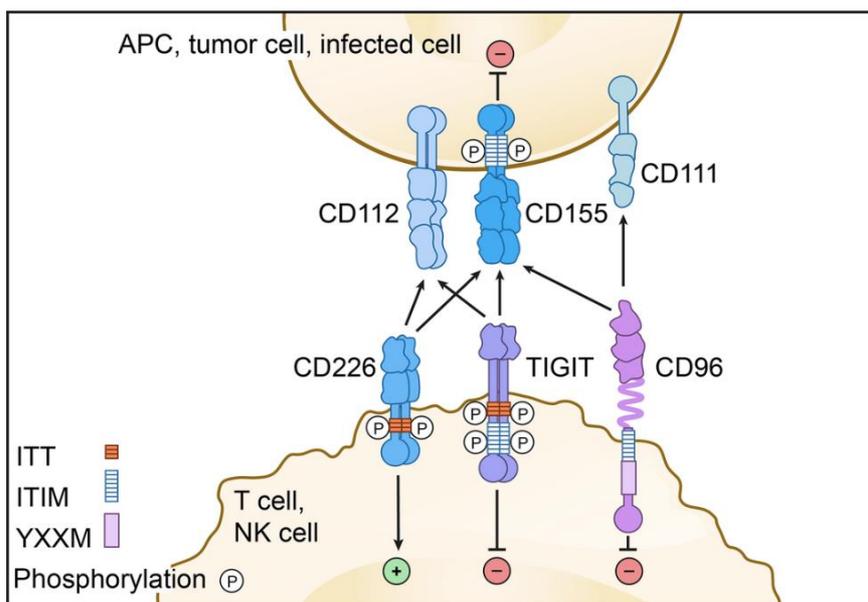


Figure 8 : Régulation de l'activation des Lymphocytes T et NK par la voie TIGIT/CD155 (Anderson et al. 2016)

avec CD155 induit une inhibition des lymphocytes T et des NK. Cette voie signalisation est assez proche de celle du CTLA-4/CD28, puisque TIGIT agit comme un compétiteur vis-à-vis de CD226 et CD96 qui ont également CD155 comme ligand (**Figure 8**).

TIGIT exerce ses effets immunosuppresseurs en augmentant la production d'IL-10 par les DC, inhibant ainsi la prolifération et la fonction des lymphocytes T CD4 +. Chez les NK et les TCD8+ l'engagement de TIGIT conduit à une forte réduction de la cytotoxicité et à une baisse très importante de la sécrétion de cytokines (notamment l'IFN-γ). Il a été démontré que TIGIT exerce également ses effets immunosuppresseurs en recrutant des phosphatases SHP pour inhiber la signalisation proximale du TCR supprimant ainsi la prolifération et la production de cytokines. Chez les Treg, l'expression de TIGIT caractérise une population hautement activée qui inhibe sélectivement la réponse Th1 et Th17 et induit une réponse Th2 en stimulant la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10.

Contrairement au CTLA-4 l'expression lymphocytaire de TIGIT est très faible au

niveau circulant et lymphoïde mais très forte au niveau tumoral suggérant son rôle dans la régulation périphérique de la réponse immune. Dans les tumeurs murines les TILs CD8+ TIGIT+ qui co-expriment PD-1, Tim-3, et LAG-3, présentent le phénotype le plus dysfonctionnel parmi l'ensemble des lymphocytes T CD8+. Chez l'homme, l'utilisation d'anticorps anti-TIGIT et anti-PD-1 a permis de restaurer la prolifération et la sécrétion de cytokines par des TILs de mélanome (Chauvin et al. 2015). De façon très intéressante les voies de signalisation entre TIM-3, PD-1, TIGIT ne semblent pas redondantes et montrent *in vitro* des effets synergiques, ouvrant ainsi la voie aux combinaisons. Plusieurs anti-TIGIT font l'objet d'essais cliniques seuls ou en association avec des anti-PD-1/PD-L1 (NCT02794571, NCT02913313, NCT03119428).

L'équipe de V. Kucheroo a hiérarchisé et prédit le profil de toxicité (**Figure 9 A**) de ces immunothérapies en se basant sur le phénotype des souris « Knock out » (KO) pour les molécules co-inhibitrices et en considérant le stade auquel elles interviennent dans l'activation lymphocytaire.

D'intenses recherches sont actuellement en cours pour déterminer le profil immunitaire dans les tumeurs avant et pendant le traitement. L'objectif est de pouvoir administrer la meilleure combinaison en fonction de l'infiltrat tumoral. Ainsi un patient avec une prédominance de MDSC pourrait être orienté vers une stratégie combinant un anti-Tim-3 alors qu'un patient présentant un déséquilibre de la balance Th1/Th2 serait plutôt orienté vers une stratégie utilisant un anti-TIGIT (**Figure 9 B**).

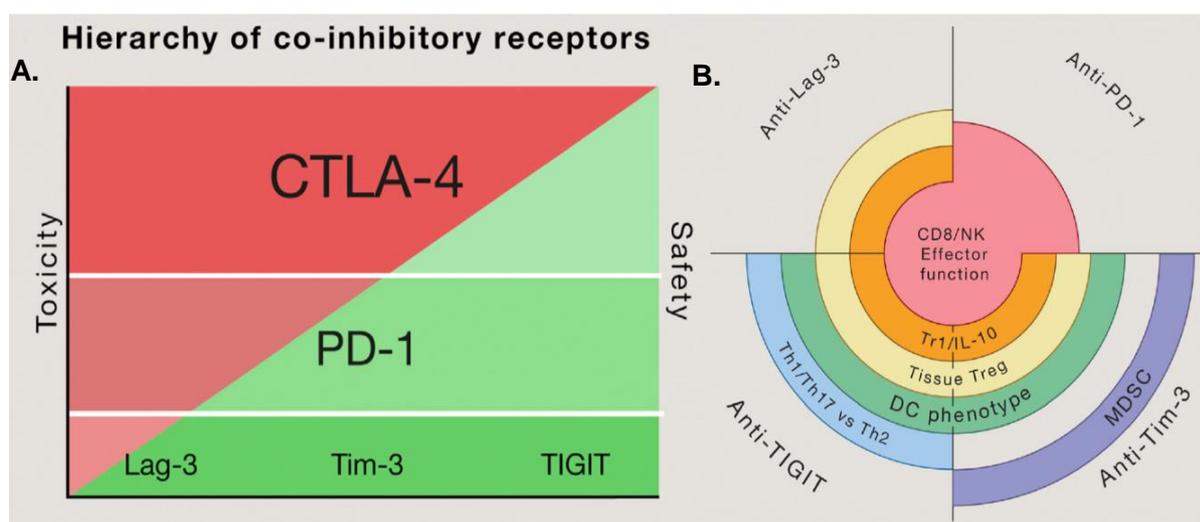


Figure 9 : Impact immunologique des inhibiteurs de checkpoint (D'après Anderson et al. 2016)

A. Les molécules de co-inhibitrices sont classés de haut en bas en fonction de leur impact sur le maintien de l'auto-tolérance. L'impact a été estimé à partir des observations faites dans différents modèles murins *know out* ou après l'injection d'anticorps thérapeutiques. La modulation thérapeutique des molécules de co- inhibitrices de la partie haute (PD-1, CTLA-4) devrait être associée à une toxicité auto-immune plus importante que la modulation des molécules de co- inhibitrices de la partie basse (Lag-3, Tim-3, TIGIT). Ces derniers devraient donc présenter un meilleur profil d'innocuité en clinique. **B.** Représentation schématique montrant les effets des blocages PD-1, Lag-3, Tim-3 et TIGIT sur la réponse immunitaire. Bien que la neutralisation de ces *immune checkpoint* ait un effet sur la fonction effectrice des cellules T CD8 + et des NK, l'impact de la neutralisation de la voie PD-1/PD-L1 est proportionnellement plus importante que celui du blocage de la voie Lag-3, Tim-3 ou TIGIT seul. La neutralisation de la voie Lag-3, Tim-3 et TIGIT affectera préférentiellement les Treg du tissu tumoral et les cellules Tr1 productrices d'IL-10. Le blocage de Tim-3 et de TIGIT affecteront en outre les DC. Enfin la neutralisation de Tim-3 et de TIGIT permettra de cibler respectivement les MDSC et de faire pencher la balance en faveur de l'immunité de type Th1/17. Ainsi, le blocage des différents *immune checkpoint* peuvent être combinés pour obtenir des effets distincts sur la réponse immunitaire.

- Le système enzymatique IDO :

Comme nous l'avons dit précédemment, il a été montré que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) est une enzyme qui joue un rôle crucial dans l'immunosuppression. L'IDO est une enzyme cytosolique intracellulaire qui régule la dégradation du tryptophane (Trp) en N-formylkynurénine (Kyn). Il existe deux types d'enzymes IDO, IDO1 et IDO2, les deux convertissent le Trp en Kyn. IDO2 est plus faiblement exprimé et bien qu'elle n'atteigne que 3 à 5% de l'activité enzymatique d'IDO1 elle joue un rôle important dans l'inflammation et la régulation des taux d'IL-4, -6 et -21 (Prendergast et al. 2017). L'appauvrissement en Trp et la production de kyn conduit à l'anergie des lymphocytes T et des NK mais favorise la prolifération et l'activité des Treg et des MDSC. Physiologiquement, le rôle immunosuppresseur d'IDO a d'abord été mis en évidence au niveau de la barrière placentaire de la femme enceinte où sa très forte expression empêche l'activation des LT et le rejet du fœtus par le SI. Son expression a été retrouvée après activation chez les CPA, les fibroblastes, les macrophages et les DC. Il a été montré qu'IDO est largement produit dans un contexte inflammatoire en réponse à l'FN γ . Dans un contexte physiopathologique, une dérégulation de l'activité d'IDO a été montrée dans certaines infections (HIV), dans l'obésité, dans le rejet des transplantations, dans l'auto-immunité, dans l'athérosclérose et le développement tumorale.

La surexpression d'IDO dans de nombreux cancers (cancers pulmonaires, gastro-intestinaux, gynécologiques, pancréatiques) a été corrélée à des taux de survie beaucoup plus faible et à une infiltration massive en lymphocytes Treg (Zitvogel & Kroemer 2017; Munn & Mellor 2016; Prendergast et al. 2017). Devant le potentiel thérapeutique d'IDO, de nombreuses industries pharmaceutiques (NewLink, Incyte, BMS, Pfizer, Merck, Roche) ont développé leur propre inhibiteur. Tous les inhibiteurs d'IDO (Indoximod ; l'epacadostat ; le Navoximod ; BMS-986205) évalués en phase I ont montré un très bon profil de tolérance. Des résultats prometteurs ont été rapportés dans les essais cliniques de phase Ib où l'indoximod était associé à la chimiothérapie chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë et d'adénocarcinome pancréatique. Dans une étude de phase II portant sur 169 patients atteints d'un cancer du sein métastatique traités par taxotère, l'administration concomitante d'indoximod n'a pas produit de différence statistiquement significative sur le taux de survie globale. En revanche dans un autre essai de phase II, l'indoximod a permis de doubler le taux de survie des patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique traités par le sipuleucel-T (Provenge). Les résultats obtenus en phase II (NCT02178722) avec l'epacadostat était très prometteurs, à titre d'exemple dans le mélanome, l'association pembrolizumab/epacadostat a augmenté le taux de réponse au pembrolizumab de 32% à 56% et un contrôle de la maladie similaires à ceux produits par la combinaison approuvée d'anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4, mais sans les effets secondaires auto-immuns de haut grade de la combinaison de ces anticorps. L'epacadostat est celui dont le développement clinique est le plus avancé avec actuellement 8 essais de phase III en cours (juin 2018)

recensé sur <https://clinicaltrials.gov> . Il est évalué seul ou en association avec des anticorps PD1 (nivolumab, pemnrolizumab) dans le mélanome, le cancer de la tête et du cou et les cancers du poumon, du rein regroupant au total presque 5400 patients. Malheureusement les données très récentes des essais de phase III font état de l'échec de l'association pembrolizumab/epacadostat dans le mélanome (Roy Baynes 2018)(Garber 2018).

4. Facteurs de réponse à l'immunothérapie

Alors que les ICI arrivent en dernier dans l'histoire de l'immunothérapie anti-tumorale, ils bouleversent complètement la façon de comprendre et de traiter le cancer. Si aujourd'hui l'immunothérapie par ICI semble devenir le standard du traitement anticancéreux c'est également parce que cette levée d'immunosuppression potentialise la vaccination, la thérapie adoptive et plus indirectement l'immunothérapie passive. Pour le moment, les résultats les plus spectaculaires obtenus avec ICI concernent le mélanome, le cancer du poumon, du rein, de la vessie, le cancer "tête et cou", de même que la maladie de Hodgkin. L'efficacité des ICI est beaucoup plus limitée pour les cancers de la prostate, du sein et du côlon (sauf dans environ 5 % des cas) et du pancréas. De façon intéressante même pour les types de cancers sensibles, l'immunothérapie ne fonctionne que pour 15 à 50 % des patients. Il est donc important d'identifier les patients ne répondant pas à l'immunothérapie pour comprendre les raisons de cette résistance.

- L'importance de la charge mutationnelle :

De façon intéressante, lorsque l'on compare le taux de mutations somatiques (**Figure 10**) à l'efficacité des immunothérapies, on s'aperçoit que les tumeurs présentant naturellement le plus de mutations somatiques sont plus susceptibles de répondre à l'immunothérapie (Alexandrov et al. 2013a; Branca 2016). Cela peut s'expliquer en partie par

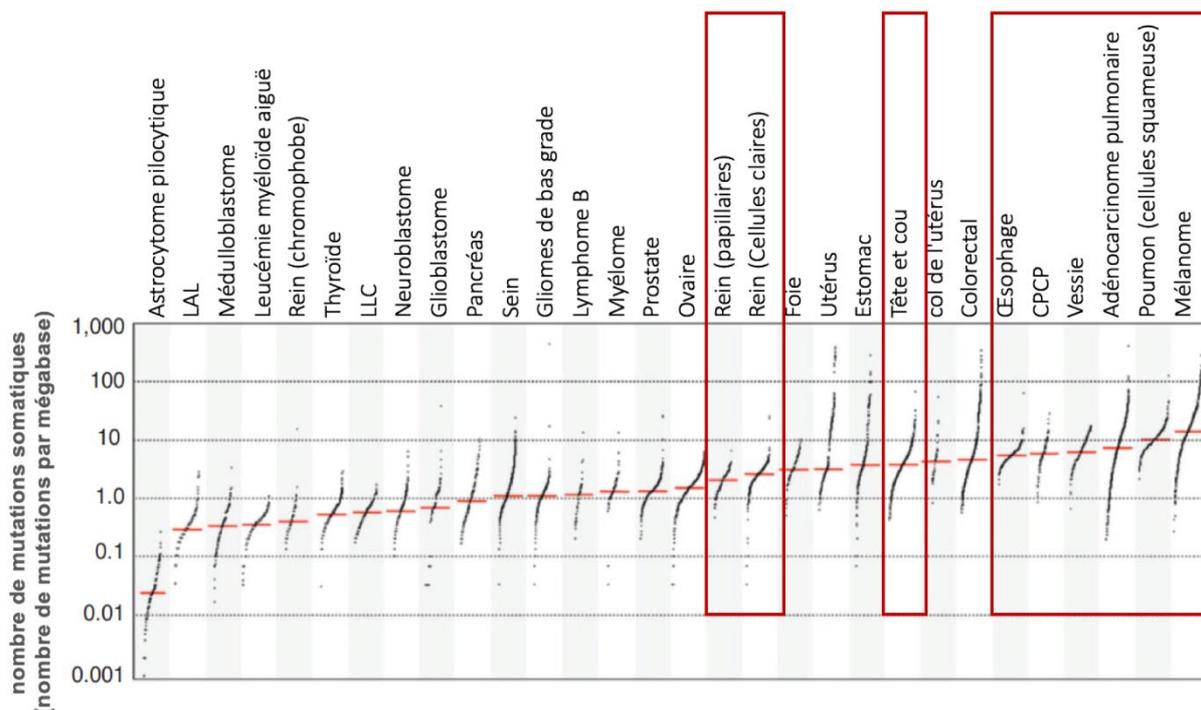


Figure 10 : Taux de mutations somatiques par cancer (D'après (Alexandrov et al. 2013b)). Chaque point représente un échantillon alors que les lignes horizontales rouges représentent le nombre médian de mutation. L'axe vertical (log) montre le nombre de mutations par mégabase (Branca 2016; Alexandrov et al. 2013b). Les principales indications sont encadrées en rouge.

le fait que ces tumeurs expriment plus de néo-antigènes susceptibles d'induire une réponse immunitaire.

Depuis 2017, la FDA a autorisé la prescription du nivolumab et du pembrolizumab dans le traitement de tous types de cancers à instabilités micro satellitaires (MSI). Ces MSI induisent un défaut de réparation et des mésappariements de l'ADN, conduisant à une fréquence élevée d'insertions et / ou de délétions pouvant générer de nouvelles protéines ou séquences peptidiques (les néoantigènes). Cette classe d'agents a ainsi été la première à recevoir l'approbation de la FDA sur la base d'une caractéristique génétique par opposition au site d'origine du cancer (Le, Uram, et al. 2015; Le, Durham, et al. 2017). Par ailleurs, il semble que les cancers induits par l'environnement soient plus susceptibles de répondre à l'immunothérapie. Ainsi dans le mélanome desmoplasique, un sous-type rare de mélanome présentant une forte charge mutationnelle induite par la lumière ultraviolette, les taux de réponse sont maintenant de 50 à 90%. Des taux de réponse relativement élevés ont été observés dans les cancers induits par les cancérogènes comme la cigarette, dans le CBNPC, le cancer de la tête et du cou, gastroœsophagien, de la vessie et de l'urothélium, avec des taux de réponse de l'ordre de 15 à 25% (Ribas & Wolchok 2018)(Campbell et al. 2017).

▪ Le phénotype immunitaire :

D'un point de vue immunologique on peut classer les tumeurs en trois grandes catégories orientant l'efficacité de la réponse aux immunothérapies (Figure 11) :

(i) Phénotype dit de « désert immunitaire » (*immune desert phenotype*) :

Ce phénotype est caractérisé par l'absence quasi-totale de LT soit dans le parenchyme soit dans le stroma. Il n'y a pas ou peu d'inflammation. Les tumeurs ne sont pas immunogènes (absence de présentation, de néoantigènes, de signaux de dangers, etc.) et ne permettent pas la génération d'une réponse immune. Ces tumeurs répondent rarement aux traitements par anti-PD-L1 / PD-1.

(ii) Phénotype dit « d'exclusion immunitaire » (*immune excluded phenotype*) :

Dans ce contexte il existe une réaction immunitaire au niveau du parenchyme mais il n'y a pas d'infiltration tumorale par les LT. La présence de barrières physiques (stroma) ou chimiques (chimiokines) neutralise la pénétration et l'infiltration des LT. Après l'utilisation d'anti-PD-L1 / PD-1, les LT présentent des signes d'activation et de prolifération mais pas d'infiltration, et les réponses cliniques sont peu fréquentes. La migration des LT à travers le stroma tumoral est l'étape limitante du cycle cancer-immunité pour ce phénotype.

(iii) Phénotype dit « d'inflammation-immunitaire » (*immuno inflamed phenotype*) :

Ce phénotype est caractérisé par la présence de LT CD4+, CD8+, de cellules myéloïdes et de cellules monocytaires (MDSC, M1/M2). On retrouve conjointement la présence de cellules tumorales et immunitaires. L'analyse de ces tumeurs révèle une forte expression des points de contrôles immunitaires (PD-L1, CTLA-4) et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1,

IL-6). Ce profil suggère la présence d'une réponse immunitaire antitumorale sous-jacente mais probablement inhibée par des mécanismes d'immunosuppressions. Les meilleures réponses cliniques aux anti-PD-1/PD-L1 surviennent dans ce type de tumeurs.

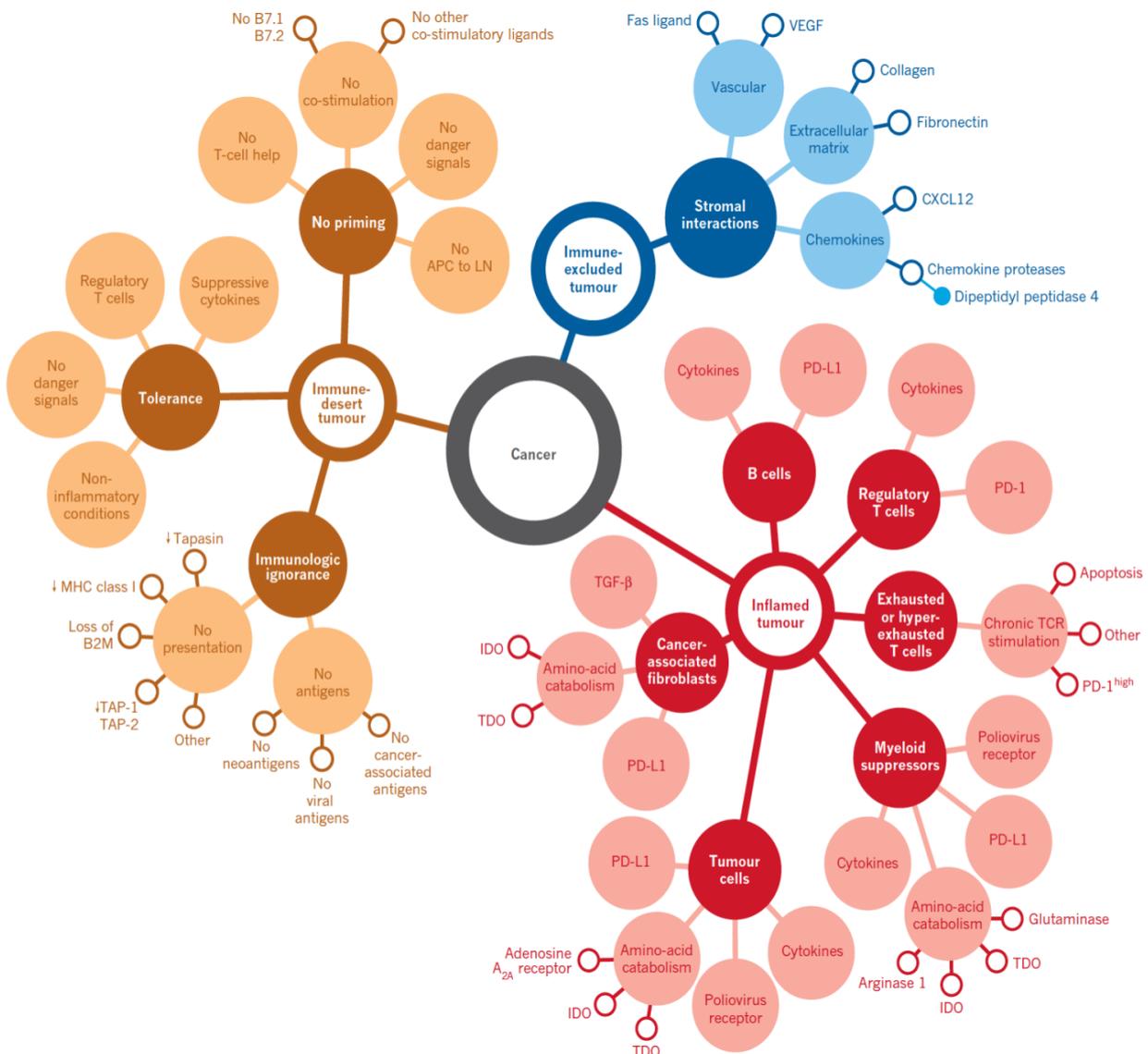


Figure 11 : Phénotypes immunitaires des tumeurs (Chen & Mellman 2017)

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons plus particulièrement à l'efficacité des immunothérapies dans l'adénocarcinome du pancréas (ADKP ou PDAC). À ce jour, l'ADKP est une maladie dévastatrice pour laquelle le taux d'incidence s'approche du taux de mortalité. Ainsi, le taux de survie à 5 ans a progressé de 3 % à 7 % en 45 ans (Siegel et al. 2016).

III. Adénocarcinome du pancréas

A. Le pancréas

1. Anatomie

Le pancréas est un organe situé en profondeur dans l'abdomen derrière l'estomac et va du duodénum à la rate, traversant horizontalement la cavité abdominale. Il mesure en moyenne 15 à 20 cm de long, 3 cm de haut, et a un poids inférieur à 100 g. On distingue quatre parties dans le pancréas : la tête, l'isthme, le corps et la queue. La tête du pancréas se trouve à droite de l'abdomen dans la courbe du duodénum. L'isthme et le corps sont irréguliers et allongés et vont en se rétrécissant vers la queue, qui forme une pointe effilée de la partie gauche du pancréas près de la rate.

2. Fonction

Le pancréas est une glande amphicrine (endocrine et exocrine) : endocrine par les îlots de Langerhans (synthèse d'insuline et de glucagon essentiellement), exocrine par le reste de la glande (synthèse de suc pancréatique).

- Pancréas endocrine

Les cellules endocrines représentent 1 à 2 % du pancréas et secrètent les hormones pancréatiques dans la circulation sanguine. Ces hormones sont utilisées notamment pour réguler la glycémie dans le sang et dans les tissus, en particulier dans le foie et les muscles. Ces cellules forment des amas de 200-300 µm appelé îlots de Langerhans. Ils sont composés de cellules α (30%), β (60 %), δ (10 %) et F qui secrètent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

- Pancréas exocrine

Ce sont les cellules exocrines du pancréas qui produisent et transportent le suc pancréatique qui sera expulsé dans le système digestif. Ce suc est sécrété dans le duodénum et participe à la digestion des aliments. Le pancréas en produit entre 1 et 1,5 L par jour et contient principalement des électrolytes et des enzymes protéolytiques (trypsinogène, pro-élastase, pro-carboxypeptidase A et B etc.), lipolytiques (lipase, phospholipase etc.), amylolytique (alpha-amylase) et nucléasiques (désoxyribonucléase, ribonucléase). Ce suc a deux fonctions principales, la neutralisation de l'acidité gastrique et l'apport des enzymes majeures de la digestion. La bile produite par le foie entre dans la tête du pancréas par la voie biliaire principale et se joint au canal pancréatique pour former l'ampoule de Vater qui aboutit au duodénum. La bile et les sucs pancréatiques se retrouvent ainsi dans l'intestin avec les aliments.

B. L'adénocarcinome du pancréas

1. Epidémiologie

Le cancer du pancréas exocrine ou adénocarcinome canalaire pancréatique (ADKP ou PDAC) représente 90 % des formes de ce cancer. Ainsi, tout au long de ce manuscrit nous ne parlerons que de la forme majoritaire. A titre informatif, les 10 % restants sont constitués par de nombreux types histologiques beaucoup plus rares comme les ampullomes, les cystadénomes, les tumeurs endocrines, les tumeurs intracanales (papillaires ou mucineuses) qui nécessitent des prises en charge spécifiques (HAS 2010; Rebours 2009).

▪ Statistiques

Dans le monde, le cancer du pancréas est la huitième cause de décès par cancer chez les hommes (138 100 décès par an) et la neuvième chez les femmes (127 900 décès par an). L'incidence la plus élevée est signalée chez les Maoris en Nouvelle-Zélande, les Hawaïens natifs et les populations afro-américaines, tandis que les personnes vivant en Inde et au Nigéria ont l'incidence la plus faible. En France l'incidence estimée pour 2017 était de 14 200 cas avec un ratio hommes/femmes de 1,48. Le pic d'incidence se trouve entre 70 et 80 ans, et le risque de voir se développer un cancer du pancréas est faible jusqu'à 50 ans (5 % des cas). Son incidence a doublé en France ces dix dernières années, il est maintenant le 3^{ème} cancer digestif après le cancer colorectal. On estime qu'il va devenir la 2^{ème} cause de mortalité par cancer en France d'ici 2030 (Buscail & Bournet 2017; Malvezzi et al. 2018).

▪ Facteurs de risque

Plusieurs facteurs environnementaux et génétiques prédisposent au développement du cancer du pancréas. La plupart des facteurs environnementaux sont considérés comme modifiables et ce sont eux qui expliquent l'explosion de la fréquence de la tumeur. Parmi ces facteurs on retrouve le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, un régime riche en graisse et en viande, un régime pauvre en légumes et folates et le diabète de type 2. On estime ainsi que 20 % des cancers du pancréas sont dus à la consommation (passive et active) de tabac et 10 % à l'obésité. Une relation entre diabète de type 2 et ADKP a clairement été démontrée mais il est difficile de distinguer si la survenue d'une néoplasie pancréatique est la cause ou bien la conséquence du diabète. Dans tous les cas la survenue d'un déséquilibre brutal chez un diabétique de type 2 équilibré doit faire évoquer le développement d'un ADKP (Lévy 2018; Kleeff et al. 2016; Malka et al. 2002).

Les facteurs génétiques sont très fréquemment retrouvés (**Tableau 3**). Ainsi 5 à 10 % des personnes atteintes de cancer du pancréas ont un proche apparenté au premier degré également atteint, on parle alors ADKP familiaux (CaPaFa). Le risque de développer un cancer du pancréas est 9 fois supérieur à la moyenne générale lorsqu'un membre du

premier degré est déjà atteint. Ce risque est d'autant plus grand que le cancer est survenu avant 50 ans.

Plusieurs mutations ont pu être identifiées et associées à une augmentation du risque de cancer du pancréas. La mutation de l'oncogène K-ras est présente dans 90 % des cancers du pancréas et entraîne une dérégulation de la prolifération cellulaire. Une mutation germinale des gènes suppresseurs de tumeurs, BRCA2, BRACA1 ou CDKN2A/p16 est associée à un risque de cancer pancréatique de l'ordre de 5 à 17 % et ce d'autant plus qu'il y a eu un cancer du pancréas dans la famille. D'autres altérations concernant les gènes PRSS, STK11/LKB1, CFTR, APC, TP 53 et les gènes du système MMR (Mismatch Repair) sont associées à une forte augmentation du risque de cancers. En général ces dernières mutations sont retrouvées dans d'autres pathologies et le développement d'un cancer du pancréas est secondaire. Ainsi, les altérations de CFTR conduisent à la mucoviscidose, les altérations du système MMR au syndrome de Lynch et les altérations de PRSS sont responsables de pancréatites chroniques pour lesquelles le risque cumulé de développement d'un ADKP est de 40 à 50%.

Syndrome	Gène(s)	Risque relatif	Risque d'ADKP à 70 ans (%)	% parmi les CaPaFa
2 apparentés au premier degré atteint d'ADKP	Inconnu	5 - 7	5 - 12	80 - 85
≥ 3 apparentés au premier degré atteint d'ADKP	Inconnu	32	40	
Cancers héréditaires du sein et de l'ovaire	BRCA1	2 - 4	3 - 4	1 - 5
	BRCA2	2 - 10	4 - 5	5 - 20
	PALB2 FANC-C/G	2 - 6	4 - 5	1 - 3
Pancréatite héréditaire	PRSS1	50 - 80	40 - 55	1 - 4
Mélanomes multiples héréditaires (FAMMM)	P16/CDKN2A	10 - 25	5 - 25	2 - 3
Peutz-Jeghers	LKB1/STK11	100 - 130	30 - 40	1 - 3
Lynch	hMLH1 hMSH2 hMSH6 PMS1/2	4 - 8	3 - 5	1 - 3

Tableau 3 : Risque de développer un ADKP en fonction de la prédisposition génétique (d'après Lévy 2018)

2. Oncogenèse et lésions précancéreuses

▪ Oncogenèse

Le nombre moyen de mutations somatiques observées dans le cancer du pancréas est relativement faible comparativement à d'autres cancers comme le cancer du sein ou le cancer colorectal (Jones et al. 2008). Pourtant l'accumulation progressive de mutations dans les gènes Kras (90%), CDKN2A/p16 (80%), TP53 (70%), SMAD4 (31%) désorganisent rapidement la machinerie cellulaire et l'anatomie du tissu pancréatique. Plusieurs classifications basées sur l'analyse du génome ou des transcrits ont été établies pour tenter de distinguer les différentes sous populations d'ADKP (Lévy 2018; Kleeff et al. 2016). En 2015 une équipe australienne a étudié le génome entier et les réarrangements chromosomiques chez plus 100 patients atteints d'ADKP (Waddell et al. 2015). Cette étude a permis d'établir une classification des différents ADKP en fonction du sous type moléculaire (**Tableau 4**).

Type moléculaire	Fréquence	Spécificités
Type 1 : stable	20 %	≤50 variations structurelles aneuploïdie → Défauts dans le cycle cellulaire/mitose.
Type 2 : localement réarrangé	50 %	Evénement focal significatif sur un ou deux chromosomes.
Type 3 : dispersé	35 %	Dégâts chromosomiques non aléatoires < 200 variations structurelles
Type 4 : instable	15 %	> 200 variations structurelles Défaut de réparation de l'ADN

Tableau 4 : Classification moléculaire des ADKP (D'après (Waddell et al. 2015))

Plus récemment le TCGA (The Cancer Genoma Atlas) a publié en 2017 une analyse « multi-omique » (génomique, transcriptomique et protéomique) de 150 ADKP (Raphael et al. 2017). Cette étude a confirmé la fréquence importante de mutations dans les gènes KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4 mais aussi RNF43, ARID1A, TGFβR2, GNAS, et PBRM1. Il a également été constaté que 60% des cancers étudiés qui ne portaient pas de mutation KRAS avaient une mutation dans un gène codant un membre différent de la même voie de signalisation RAS-MAPK. Par ailleurs, cette étude a permis d'identifier une nouvelle altération génomique qui favorise le cancer du pancréas, RREB1, qui code également un membre de la voie RAS-MAPK. Ces mutations altèrent directement les voies métaboliques associées au processus de cancérisation. Les principales voies altérées par ces mutations concernent les voies d'apoptose (CASP10, CAD, HIP1), de régulation de la phase de transition G1/S (CDKN2A/B, TP53), Hedgehog, RAS (KRAS, MAP2K4), TGF-β (SMAD4),

Wnt/Notch (RNF43, AXIN1/2, GATA6) et les voies de réparations de l'ADN (BRCA1/2, TERT, PALB2). Progressivement ces altérations conduisent à la formation de lésions précancéreuses puis au développement d'un adénocarcinome. Au final, la cellule cancéreuse pancréatique est particulièrement agressive et exprime un certain nombre de facteurs d'invasion. On retrouve de façon concomitante une surexpression des métalloprotéinases (MMP-2, MMP-3 et MMP9) qui dégradent la matrice extracellulaire et une perte d'expression de certains facteurs d'adhésion (E-cadhérine) facilitant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire et l'augmentation de la mobilité cellulaire.

Au final, les altérations des gènes Kras, CDKN2A/p16, P53, TERT induisent une prolifération excessive et une résistance à l'apoptose des cellules tumorales. L'expression concomitante des métalloprotéinases et la perte d'expression de l'E-cadhérine, de TIMP1 favorisent la migration et l'envahissement par les cellules tumorales. En parallèle la surexpression du VEGF et de l'EGFR (60 % des cas) favorise l'angiogenèse et l'autosuffisance de cellules pancréatiques.

- Lésions précancéreuses

On distingue principalement 3 types de lésions précurseurs du cancer pancréatique, (i) les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques (PanIn, Pancreatic Intraepithelial Neoplasias) (ii) les tumeurs intracanales papillaires et mucineuses (TIPMP) et (iii) les cystadénomes (séreux et mucineux)(Rebours 2009).

Les cystadénomes mucineux (CAM) sont des lésions rares et surviennent surtout chez la femme de 40-50 ans, principalement au niveau de la tête et de la queue du pancréas. Le risque d'évolution des CAM vers un cancer invasif, est élevé (6 à 36%). Les cystadénomes séreux eux présentent un risque de dégénérescence maligne quasi-nul.

Les TIPMP sont des lésions de l'épithélium excréteur des canaux du pancréas. Elles peuvent être uniques, multiples, continues ou discontinues et sont plus souvent localisées dans la tête. La transformation de l'épithélium normal par un épithélium néoplasique mucosécrétant entraîne le plus souvent une kystisation des canaux secondaires et la dilatation du canal pancréatique principal. Elles sont de quatre types : intestinal, biliopancréatique, gastrique, oncocytaire. Le risque de dégénérescence est différent selon le type de lésion, les TIPMP « intestinales » sont les plus fréquentes et sont associées à un risque de transformation maligne d'environ 35%. Globalement le risque de transformation maligne (dysplasie de haut grade ou carcinome invasif) est d'environ 15 %, cinq ans après le premier symptôme (douleurs pancréatiques, pancréatite aiguë, stéatorrhée) pour les TIPMP ne touchant que les canaux secondaires et de l'ordre de 50-60 % au même terme en cas d'atteinte du canal pancréatique principal.

Les PanIN sont des lésions papillaires microscopiques dont la physiopathologie est la mieux décrite. Elles sont classées en trois grades, 1, 2 et 3, qui reflètent la progression du

stade de lésion bénigne à celui d'adénocarcinome invasif. Les PanIN sont ainsi souvent trouvées, mais sans en être spécifiques, au cancer du pancréas (82 %), et sont également trouvées au cours de la pancréatite chronique (60 %) et dans le pancréas normal (16%). Les PanIN 1 sont communes dans le pancréas normal où elles sont considérées comme bénignes. En revanche la présence de PanIN 3 est trouvée dans 40 % des ADPK, 4 % des pancréatites chroniques et 0 % dans les pancréas normaux. Sur le plan histologique les lésions de PanIN-1 correspondent à une hyperplasie plane (PanIN-1A) ou papillaire (PanIN-1B) du revêtement canalaire avec conservation de la polarité cellulaire. Les lésions de PanIN-2 comportent une dysplasie de bas grade avec perte de la polarité cellulaire, pseudostratification et empilement des noyaux. Les lésions de PanIN-3 sont caractérisées par une perte de polarité cellulaire, une architecture cribriforme et un bourgeonnement intraluminal. Cette lésion est considérée comme « indistinguable » et donc synonyme du carcinome *in situ* (Monges & Fléjou 2010). Le développement de ces lésions est concomitant avec les dérégulations moléculaires oncogénétiques **Figure 13** (Feldmann et al. 2007).

Ainsi une méta-analyse des données publiées entre 1988 et 2003 a montré que les mutations du gène KRAS sont détectées dans respectivement 36, 44 et 87% des lésions PanIN-1, PanIN-2 et PanIN-3 (Löhr et al. 2005). Il est de même pour la perte CDKN2A/p16 qui est aussi observée avec une incidence de 30 % dans les PanIN-1A et PanIN-1B, 55 % dans les PanIN-2 et plus de 70 % dans les PanIN-3. Sur le plan chronologique, la progression jusqu'au stade PanIN-3 s'étale sur 10 à 15 ans et l'ADPK évolue en moyenne pendant 7 ans. On estime que le décès survient généralement 3 ans après les premières métastases. Le processus de carcinogénèse pancréatique est donc long puisque depuis du stade PanIN-1 au décès il s'écoule en moyenne entre 20 et 25 ans (Fokas et al. 2015).

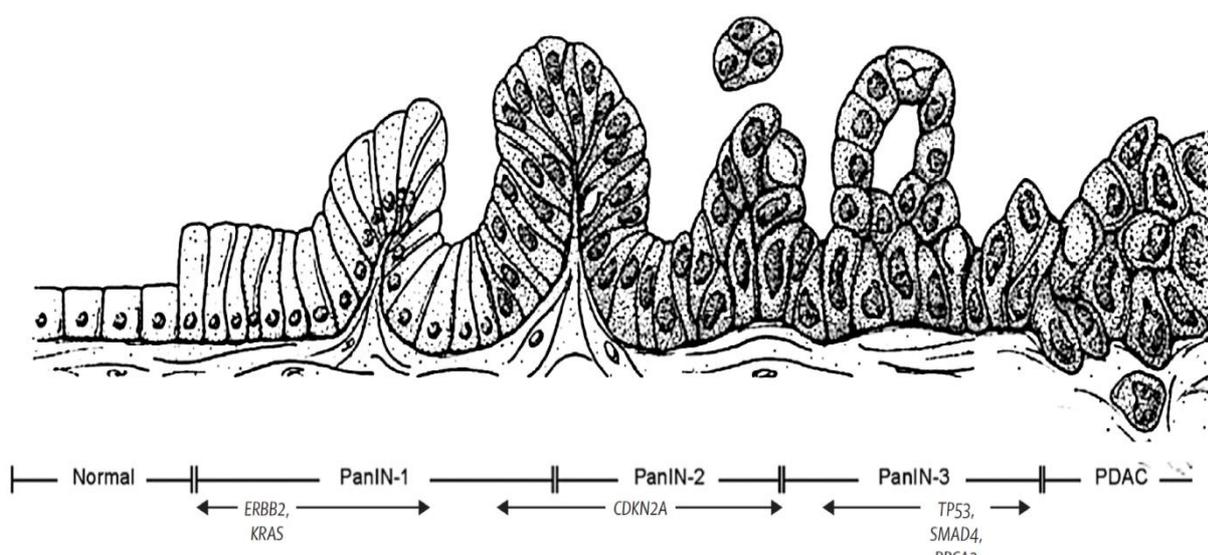


Figure 12 : Séquence des altérations génétiques au cours de l'évolution des PanINs (D'après Hingorani et al. 2003)

3. Diagnostic

L'ADKP est une maladie silencieuse, les signes cliniques sont le plus souvent non-spécifiques et le diagnostic aux stades initiaux est très difficile. Plus tard, lorsque la maladie a évolué, plusieurs symptômes apparaissent et motivent la première consultation. On retrouve le plus fréquemment des douleurs abdominales (80 %), des vomissements, une jaunisse ou ictère sans fièvre, une phlébite (25 %) et une perte de poids rapide et importante. L'examen clinique, et le bilan biologique associé à l'imagerie permettent d'orienter le diagnostic. L'examen de référence pour confirmer le diagnostic du cancer du pancréas reste l'analyse histologique du tissu après biopsie.

4. Traitement

▪ Chirurgie

La chirurgie est le seul traitement curatif du cancer du pancréas. Elle est envisagée après évaluation de la respectabilité de la tumeur et en tenant compte des éventuelles comorbidités. Du point de vue chirurgicale on distingue trois groupes : les tumeurs résécables, « borderlines » et non résécables. Les principaux critères de non-resecabilité sont la découverte d'un envahissement ganglionnaire, d'un envahissement vasculaire et la découverte de métastases et/ou d'une carcinose péritonéale. Les patients dont les tumeurs sont à la limite de la résécabilité sont le plus souvent réévalués après une chimiothérapie et/ou radiothérapie. En raison de la faible expression clinique, l'ADKP est souvent diagnostiqué à un stade avancé et l'intervention n'est réalisée que chez 20 à 30 % des malades. Elle concerne essentiellement, les tumeurs de petites tailles confinée au pancréas (moins de 2 à 2,5 cm de diamètre), sans métastase et n'envahissant pas les vaisseaux et artères. Le taux de survie à 5 ans après la chirurgie est de 15 à 20 %. Une chimiothérapie adjuvante pendant 3 mois peut être proposée, celle-ci permet de retarder les récives, d'augmenter significativement la survie globale (17 mois vs 23mois). Différents protocoles existent : 6 cycles de 5-fluorouracile (antimétabolites) et d'acide folinique ; gemcitabine seule et plus récemment l'association capécitabine + gemcitabine (Buscail & Bournet 2017).

▪ Radiothérapie

La dose habituelle est de 50 Gy en situation adjuvante et d'environ 55 Gy en situation localement évoluée. Un fractionnement de 1,8 à 2 Gy par séance, à raison de cinq séances par semaine, est recommandé. Du fait de la localisation profonde, le radiothérapeute ne peut pas toujours utiliser les fortes doses au risque de léser les tissus adjacents. La radiothérapie est également utilisée en néo-adjuvant avant la chirurgie pour faciliter l'acte chirurgical et détruire toutes les cellules cancéreuses disséminées localement. En palliatif la radiothérapie permet de diminuer les signes de jaunisse, calmer les douleurs causées par le cancer ou par des métastases osseuses.

- Chimiothérapie

La chimiothérapie est proposée lorsque la chirurgie n'est pas possible. Statiquement plus de 60 % des malades sont diagnostiqués au stade métastatique, 25 % à un stade localement avancée sans métastase et 15 % à un stade résécable chirurgicalement d'emblée ou après radio-chimiothérapie néoadjuvant. Le protocole de chimiothérapie en première intention dans le cancer du pancréas avancé est le protocole FOLFIRINOX ou l'association gemcitabine + nab-paclitaxel. On propose le protocole FOLFIRINOX chez les patients en bon état général et ayant des fonctions hépatiques normales. Ce protocole comprend : oxaliplatine (agent alkylant) 85 mg/m² ; irinotecan (Inhibiteurs de topoisomérase) 180 mg/m² ; acide folinique 400 mg/m² ; 5-fluorouracile (antimétabolites) bolus 400 mg/m² ; 5-fluorouracile en perfusion continue 2400 mg/m² à J1 puis J14. Le protocole FOLFIRINOX offre le meilleur taux de survie (11mois) mais induit de nombreux effets secondaires lourds (diarrhée, mucite, syndrome main-pied, syndrome cholinergique...). L'association gemcitabine + nab-paclitaxel est une nouvelle association validée en première ligne et en seconde ligne métastatique avec une médiane de survie globale de 8 mois. Elle présente une meilleure tolérance que le protocole FOLFIRINOX mais ne dispose pas d'un remboursement à l'heure actuelle ce qui limite son utilisation. La Gemcitabine (GEMZAR™) en monothérapie est utilisé dans les formes avancées pour les patients avec une dégradation de l'état général, en rechute (Buscail & Bournet 2017; Hammel 2017; Arslan & Yalcin 2014).

En conclusion, l'incidence a doublé en 10 ans et aucune innovation thérapeutique n'a amélioré significativement le pronostic de cette maladie. En raison de la physiopathologie de cette maladie, l'ADKP est une cible de choix pour l'utilisation et le développement des stratégies d'immunothérapie.

IMMUNOTHERAPIE DANS LE CANCER DU PANCREAS

I. Mécanismes d'échappement immunitaire dans l'adénocarcinome du pancréas

Le microenvironnement (microenvironnement tumoral : TME) de l'ADKP est considéré comme l'un des plus immunosuppresseurs. Le TME est riche en leucocytes immunosuppresseurs, comprenant des interactions complexes entre les LT, LB, les CPA, les cellules tumorales pancréatiques, les cellules myéloïdes et les éléments du stroma. A l'examen immunohistologique il est mis en évidence à la fois des caractéristiques propres au phénotype « d'inflammation-immunitaire » et « d'immuno-exclusion ».

On retrouve (i) une forte expression des points de contrôles immunitaires (PD-L1, CTLA-4), de cytokines et d'enzymes immunosuppresseurs (IL-10, arginase, IDO) (ii) une présence excessive de leucocytes immunosuppresseurs et (iii) un programme inflammatoire déterminé par l'oncogène Kras. En parallèle on retrouve également un phénotype immunitaire « d'exclusion » avec (i) une faible quantité intra tumorale de lymphocytes TCD8+ cytotoxiques (ii), la présence des cellules TCD3+ préférentiellement à la marge tumorale et (iii) le développement d'un stroma dense (40 à 80 % de la tumeur) imperméable aux LT cytotoxiques.

L'infiltrat est dominé par un pool de lymphocytes immunosuppresseurs (lymphocytes T gamma delta ($\gamma\delta$), Treg, et Breg) et un pool cellules myéloïdes immunosuppresseurs (MDSC et M2) (**Figure 13**)(Pergamo & Miller 2017; Yoshikawa et al. 2012; Habtezion 2016; Buscail et al. 2015; Kunk et al. 2016). Ces cellules sont enchâssées dans une matrice riche en collagène comprenant une forte proportion de fibroblastes, de cellules étoilées et de cellules tumorales sécrétant de nombreux facteurs immunosuppresseurs (TGF- β , IL-10, IDO). On décrit couramment la prévalence des Treg et Breg dans les lésions pré-néoplasiques, leur présence est systématiquement associée à un mauvais pronostic. Leur prévalence est d'autant plus importante que les lésions sont avancées, suggérant un rôle direct de ces lymphocytes dans l'état d'avancement des néoplasies. Plus récemment, les T $\gamma\delta$ représentant jusqu'à 40 % des TILs dans l'ADKP ont été associés à un mauvais pronostic (Mondragón et al. 2016). Cette sous-population lymphocytaire non-restreinte par le CMH se rapproche de par son fonctionnement aux acteurs de l'immunité innée. Il a été montré, récemment, leur rôle majeur dans l'inhibition de la réponse Th1 et la promotion de la réponse Th2 dans l'ADKP. Dans différents modèles murins leur inhibition a été associée à une restauration de la réponse immune anti-tumorale. Par ailleurs, le TME est riche en chimiokines (CCL2), en cytokines (IL-4, IL-13, TGF β , IL-10), en facteurs de croissance (GM-CSF), en facteurs induits par l'hypoxie (HIF-1) qui favorisent le recrutement et la maturation des monocytes circulants en MDSC et/ou en M2 (Sanford et al. 2013; Schwartz et al. 2010; Fokas et al. 2015).

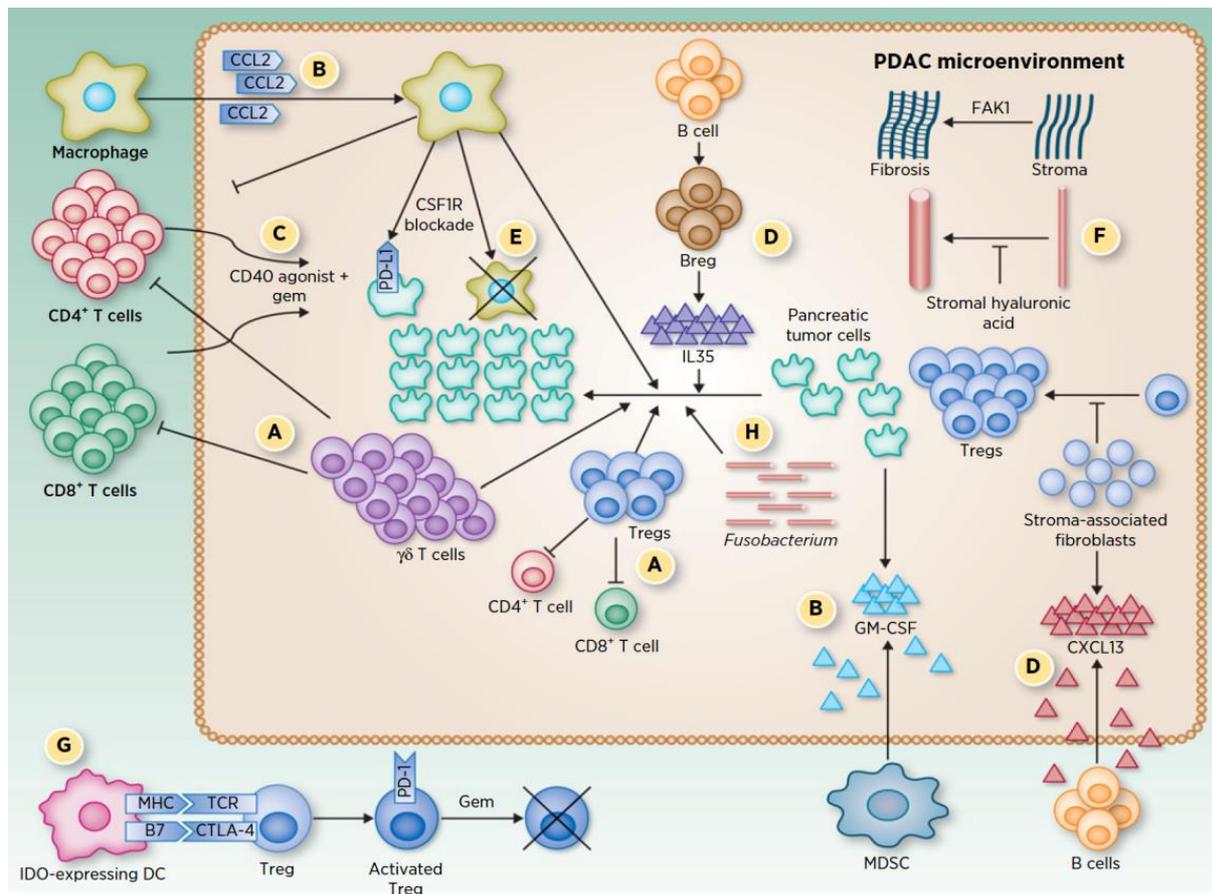


Figure 13 : Représentation schématique de la réponse immunitaire dans l'ADK (Iii et al. 2017). A, Les lymphocytes T $\gamma\delta$ bloquent la prolifération des cellules T effectrices et stimulent la croissance des cellules tumorales. B, C, E, Les MDSC et les M2 sont mobilisés dans le TME par différentes chimiokines et facteurs de croissance (GM-CSF, CCL2, HIF-1). D, Les fibroblastes tumoraux recrutent les Breg sécrétant IL-35 via la production de la chimiokine CXCL13. F, Les éléments stromaux forment une barrière physique et chimique à l'infiltration immunitaire et aux agents thérapeutiques. G, L'enzyme IDO est produite par les cellules dendritiques (DC) et tumorales et provoque l'anergie des lymphocytes T et des NK mais favorise la prolifération et l'activité des LTreg et des MDSC. H, Plus récemment il a été montré que *Fusobacterium* trouvé dans le microenvironnement de l'ADKP stimule la progression de l'ADK en inhibant la réponse immunitaire via la stimulation du récepteur inhibiteur TIGIT.

Ces derniers sécrètent de puissantes cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β), et des enzymes (arginase, iNOS) qui dégradent l'arginine, un aa essentiel au fonctionnement des LT. Les M2 et les MDSC neutralisent les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ et TCD8⁺ (réponse Th1) et polarisent vers une réponse immunitaire anti-inflammatoire tolérogène de type Th2, et régulatrice. De façon intéressante il a été montré que le programme inflammatoire déterminé par l'oncogène Kras favorisait entre autre le recrutement des MDSC dans le TME *via* la production de GM-CSF par les cellules stromales (Pylayeva-Gupta et al. 2012; Gargett et al. 2016). Par ailleurs les MDSC et les M2 sont directement impliqués dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales *via* la sécrétion de VEGF et des métalloprotéinases, MMP-7 et MMP-9 (Pollard 2004; Sica & Bronte 2007; Tartour 2012). Après résection de tumeurs une forte expression de PD-L1,

CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 a été retrouvée dans les tissus. L'expression de ces marqueurs a été systématiquement corrélée négativement avec la survie des patients après résection chirurgicale. Par ailleurs, il a été montré que la prolifération incontrôlée des cellules tumorales sous la dépendance de l'oncogène KRAS conduit à une consommation massive de glucose et de glutamine et entraîne l'accumulation excessive de lactate dans le TME. Ce lactate favorise l'émergence des populations immunosuppressives en atténuant l'activation des DC et en stimulant la polarisation de M1 en M2 (Pavlova & Thompson 2016). Ce puissant environnement immunosuppressif neutralise la réponse immune et progressivement le pourcentage de TCD8+ diminue au cours de la transformation maligne. Au final, la présence d'un infiltrat immunosuppressif et d'un stroma dense limitant la migration des cellules immunitaires et la reconnaissance antigènes tumoraux permet aux cellules cancéreuses d'échapper à la réponse immune.

II. Immunothérapie et cancer du pancréas

A. Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Les premiers essais cliniques dans l'ADKP ciblant la voie PD-1/PD-L1 et CTLA-4 ont été globalement décevants. En 2010, l'Ipilimumab a été évalué seul chez 27 patients atteints d'ADKP non résécables et métastatiques avec un seul un patient répondeur sur 27. De même malgré la surexpression de PD-L1 et PD-L2, l'utilisation d'un anticorps anti-PD-L1 a été décevante avec 0 réponse sur 14 patients. Ces résultats ont depuis été reconfirmés dans les essais de phase II.

L'échec des anti-PD-1 et dans anti-CTLA-4 dans l'ADKP est multifactoriel. On peut l'expliquer par la faible prévalence de LT PD-1+ infiltrant la tumeur (Stromnes et al. 2017) et par la faible proportion de néoépitopes (Balli et al. 2017; Alexandrov et al. 2013) qui sont des facteurs potentiels de réponse à l'immunothérapie. Plus récemment, en 2017, une étude de phase II évaluant le pembrolizumab dans tous types de cancer MSI a enrôlé 7 patients atteints d'ADKP MSI et les taux de réponse objective et de stabilité de la maladie ont été de 62% et 75%(Hu et al. 2018; Lupinacci et al. 2018; Humphris et al. 2017; Le, Durham, et al. 2017). Hormis les patients MSI (1-2% des ADKP)(Lupinacci et al. 2018), il semble que les monothérapies par anti-PD-1/PD-L1 ou anti CTLA-4 ne soit pas suffisante pour améliorer le taux de survie (**Tableau 6**). Les modèles précliniques ont montré que la vaccination est capable d'améliorer l'infiltration de la tumeur par les LT et ainsi de sensibiliser aux ICI. De façon intéressante, il a été observé qu'une petite proportion de patient présente à la fois une infiltration en LT et une forte proportion de néoépitopes, tout en étant résistant aux traitements. L'absence totale d'efficacité des ICI chez ces patients, suggère que d'autres voies d'inhibition que l'axe PD-1-PD-L1 sont impliquées et devrait faire l'objet d'essais cliniques très prochainement.

Plus récemment une autre immunothérapie ciblant le CD40 a suscité de l'intérêt. En effet le CD 40, un récepteur de la famille du TNF, est associé à un mauvais pronostic dans

l'ADKP. Ce cluster est fortement exprimé à la surface des lymphocytes B et T, des DC, des macrophages et des cellules tumorales pancréatiques. Il a été montré que l'utilisation d'un anticorps ciblant le CD40 permettait d'une part la reprogrammation des macrophages infiltrant vers un phénotype M1 et d'autre part le recrutement des TCD8+ cytotoxiques *via* les DC. La capacité de cette stratégie à induire une mémoire immunitaire et donc une réponse sur le long terme n'est aujourd'hui pas clairement établie (Byrne & Vonderheide 2016; Luheshi et al. 2016). L'utilisation clinique d'un anticorps ciblant le CD40 en association avec le traitement standard (Gemcitabine) a conduit à une augmentation moyenne de la survie globale de 1,5 mois chez 21 patients (Beatty et al. 2013). Plusieurs essais cliniques évaluent actuellement l'utilisation d'un anti-CD40 en combinaison avec la chimiothérapie et un anti-PD-1 (NCT02588443, NCT03214250). Les résultats devraient permettre de conclure sur l'efficacité de cette nouvelle stratégie d'immunothérapie ;

D'autres essais ciblant les M2 ou les MDSC ont montré des résultats intéressants en phase I. Ainsi un inhibiteur CCR2 (PF-04136309) en combinaison avec le FOLFIRINOX a montré un bénéfice clinique chez 50% des patients dans les essais de phase I (Nywening et al. 2016) et les essais de Phase II (NCT02732983) sont en cours. Les inhibiteurs de CSF-1R ont montré des résultats précliniques très prometteurs et sont en cours d'investigations avec des anti-CD40 ou des inhibiteurs de CXCR2 (Zhu et al. 2014; Verona et al. 2017; Steele et al. 2016; Kumar et al. 2017). Enfin, dans une autre étude, l'indoximod (inhibiteurs d'iDO) a été associé aux traitements standard (gemcitabine / nab-paclitaxel) chez 30 patients atteints d'ADKP avec un taux de réponse objective de 37% et 1 patients avec une réponse complète (Nathan et al. 2016).

Les résultats des premiers essais cliniques montrent que les monothérapies ont échoué à restaurer la réponse immunitaire dans l'ADKP. De nombreux essais cliniques en cours évaluent différentes stratégies combinatoires et semblent prometteuses. Des résultats intéressants ont déjà été obtenus lors de combinaison de ces immunothérapies avec des vaccins thérapeutiques.

B. Vaccination thérapeutique

La principale stratégie consiste en l'administration d'antigènes surexprimés dans l'ADKP (**Tableau 5**) associé ou non à des protéines immuno-stimulatrices (toxine diphtérique ou vecteurs poxviraux). L'autre stratégie consiste en l'injection directe de cellules tumorales irradiée.

Antigènes	Expression
Mésothéline	La mésothéline est un antigène de surface très peu exprimé dans l'organisme. En revanche on la retrouve très fortement exprimé dans le cancer du pancréas (80 %) mais aussi le mésothéliome, le cancer de l'ovaire et du poumons
Antigène carcino-embryonnaire (CEA)	L'antigène carcino-embryonnaire est une glycoprotéine peu ou pas exprimé dans l'organisme. Il est utilisé comme un marqueur non spécifique du suivi des adénocarcinomes dont le pancréas (75%) mais aussi le cancer du sein, de l'ovaire de l'utérus et de la thyroïde.
HER2	Le récepteur HER2 fait partie de la famille des récepteurs EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) Il est situé à la surface de la cellule cancéreuse. Certaines études l'ont trouvé sur 20-60% des ADKP.
MUC1	MUC1 est notamment présente dans le mucus et les sécrétions. Cette mucine est surexprimée dans environ 90% des cancers pancréatiques (mais aussi seins, ovaire, prostate, côlon) et présente des profils de glycosylations différents dans les pathologies cancéreuses
Téломérase	La téломérase est une ribonucléoprotéine qui induit la synthèse de l'ADN télomérique, permettant ainsi de maintenir la longueur des télomères et la stabilité des chromosomes La sous-unité catalytique de la téломérase appelée transcriptase inverse de la téломérase (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) est surexprimée dans plus de 90 % des cancers humains dont le cancer du pancréas
Kras	Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases et sont codées par le gène KRAS. Elles jouent un rôle important dans la transmission, vers le noyau, de signaux extracellulaires provenant de récepteurs membranaires et notamment de l'EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor).Le gène KRAS est muté dans 90-95 % des cas dans l'ADKP.

Tableau 5 : Liste des principaux antigènes surexprimés dans l'ADKP (D'après A. Quilbe)

Un vaccin peptidique ciblant les cellules exprimant une protéine Ras mutée a été évalué dans les études de phase I/II en adjuvant après résection. De bons résultats ont été obtenus avec des taux de stabilité de 25,6 mois après résection et 10,2 mois pour les 11 patients sur 34 non résectables. Dans une autre étude des résultats similaires ont été obtenus avec une médiane de survie de 28 mois pour 17 patients sur 20 traités et des taux de survie de 20 % ont été observés à 10 ans versus 0 % dans le groupe placebo. D'autres

protocoles de vaccination utilisant des peptides, associés ou non, ont conduit à des réponses immunologiques (présence d'anticorps spécifiques) mais sans apporter de bénéfices cliniques. C'est le cas des vaccinations contre l'antigène MUC-1, le CEA, la gastrine, le survivin et HSP90 ;

Le TeloVac (hTERT) un vaccin anti-téломérase composé d'un seul peptide dérivé des téломérases a échoué à montrer un bénéfice dans un grand essai de phase III malgré des résultats intéressants en phase I/II (Middleton et al. 2014). Une nouvelle approche est en cours d'évaluation dans une étude de phase I (NCT02960594). Celle consiste en une électroporation de l'ADN pour augmenter l'immunogénicité de hTERT et l'utilisation de l'IL-12 pour faciliter la réponse des cellules T.

Le GVAX est un vaccin constitué de cellules de deux lignées pancréatiques irradiées génétiquement modifiées pour sécréter le GM-CSF. Ce vaccin permet de stimuler et d'activer les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Bien qu'il soit bien toléré la réponse au GVAX seul semble modeste mais l'association avec d'autres vaccins ou immunothérapies a permis d'améliorer les taux de survie (Le, Ko, et al. 2017). Les récents essais cliniques ont tenté des approches combinatoires avec le CRS-207, un vaccin vivant atténué de *Listera monocytogenes* exprimant la mésothéline humaine qui est surexprimée dans l'ADKP. La médiane de survie globale est passée de 3,9 mois pour le GVAX seul contre 6,1 mois pour l'association GVAX/CRS-207 et 9,7 mois pour l'association GVAX/Ipilimumab (Le, Ko, et al. 2017; Le, Wang-Gillam, et al. 2015).

L'Algenpantucel L est un vaccin composé de cellules humaines entières transfectées pour exprimer l' α -galactosyl à leur surface, une protéine généralement surexprimée par les cellules pancréatiques tumorales. Malgré des résultats prometteurs en phase II, les essais de phase III n'ont pas confirmé ces résultats (NCT01072981)(Hardacre et al. 2013).

Il a été montré que la vaccination thérapeutique est plus efficace en situation adjuvante. En effet la diminution du volume tumorale et de l'immunosuppression facilite l'instauration d'une réponse immune efficace (Weden et al. 2011; Abou-Alfa et al. 2011; Toubaji et al. 2008). Il a été montré que la vaccination permet de générer une réponse immunitaire en stimulant les LT (présence d'amas lymphocytaire après vaccination). L'échec de la vaccination peut être attribué à l'immunosuppression locale. Beaucoup d'essais cliniques évaluent actuellement des stratégies combinatoires de vaccination associées à un ou plusieurs ICI. Ces stratégies combinatoires ciblent plusieurs acteurs de l'immunosuppression comme les Treg, les M2 ou les MDSC, tout en maintenant l'utilisation des anti-PD-1 (Ma et al. 2016)(Thind et al. 2017).

C. Les cellules CAR T

Plusieurs CAR T ont été développé pour cibler le CEA, HER2, la mésothéline, et MUC-1. Cette approche a montré de très bon résultats dans les modèles précliniques et les

essais de phase I sont en cours (Chmielewski et al. 2012; Posey et al. 2016; Maliar et al. 2012; DeSelm et al. 2017). Le risque d'auto-immunité est très élevé puisque l'on peut retrouver ces antigènes ailleurs dans l'organisme. Ainsi, un patient est décédé à la suite d'injection de CAR T ciblant HER2 (Morgan et al. 2010). En revanche, il semblerait que les CAR T ciblant la mésothéline soient bien tolérés (Beatty et al. 2014; Beatty et al. 2018). Par ailleurs, il est clairement montré que le TME, « épuise » les CAR T d'où le rationnel à associer les CAR T avec les ICI. Des efforts d'ingénieries très importants sont en cours pour développer des CAR T plus efficaces et moins toxiques.

Contrairement à la Chine ou aux Etats Unis, la France n'est pas à ce jour pionnière dans l'utilisation des CAR T, notamment en raison du statut « transgénique » de ces cellules (June et al. 2018) et l'arrivée de ces traitements en France pour l'ADKP devrait prendre du temps.

Therapy	Phase I	Phase II	Phase III	Approved?	Comments
Immune checkpoint blockade PD-1/PD-L1 CTLA-4				dMMR patients only	No responses outside dMMR patients; combinations under investigation
Therapeutic vaccines GVAX Algenpantucel-L hTERT peptide hTERT DNA				No	Large RCTs negative; may benefit from checkpoint blockade
Engineered T cells CAR-T				No	Signs of immunogenicity; need to optimize antigens
Agonistic immunotherapy CD40				No	Promising preclinical data; phase Ib/II under way
Myeloid immunotherapy CCR2 CSF-1R CXCR2				No	Promising combinations, especially with checkpoint blockade
Stromal modulation Hyaluronidase FAK VDR				No	Most clinically advanced; new targets emerging
Prevention vaccines				No	Proof of concept in colon cancer; PDA on the horizon

Figure 14 : Statut clinique des immunothérapies dans le cancer du pancréas (Morrison et al. 2018). Chaque ligne représente une seule classe d'immunothérapie. L'extrémité droite de chaque ligne indique le dernier essai clinique que la classe de composés a atteint. Les flèches vertes remplies indiquent les essais en cours. Les lignes rouges indiquent les essais négatifs. Flèche verte cassée indique des essais réussis dans d'autres tumeurs malignes. dMMR, mésappariement d'ADN ADKP à instabilités micro satellitaires; RCTs, essais contrôlés randomisés; PDA, adénocarcinome canalaire pancréatique.

En conclusion, les immunothérapies ont ouvert de nouvelles opportunités dans le traitement de l'ADKP. Cependant, les résultats obtenus avec ces stratégies ont été décevants, avec l'échec des monothérapies ciblant les checkpoints immunitaires (anti-CTLA4 et anti-PD-1/PD-L1) Les essais cliniques actuellement conduits devraient cependant permettre de définir des stratégies combinatoires efficaces. Très récemment et de façon intéressante nous avons assisté à un changement spectaculaire concernant le rôle probable, ou démontré, de la Gal-9 dans l'échappement à la surveillance immunitaire pour toute une série d'affections malignes, et notamment dans l'ADKP (Daley et al. 2017a; Daley et al. 2016)(Sideras et al. 2017).

Immunothérapie	Cible	N	Adjuvant	Stade	Réponse clinique	Ref
Vaccination peptidique	CEA	23	Seul	Résécable, Métastatique	37% de survie globale (OS) à 32 mois	(Geynisman et al. 2013)
	CEA + MUC1	20	Seul	Métastatique	Survie totale médiane (mOS) de 7.3 mois	(Schuetz T, 2005)
	Gastrin 17	154	Seul	Métastatique	↑ OS de 54 % vs placebo (p = 0.03)	(Gilliam et al. 2012)
	Gastrin 17	383	Seul	Métastatique	Pas de bénéfice	(Shapiro et al. 2005)
	Gastrin 17	30	Seul	Métastatique	↑ OS de 4 à 7.2 mois	(Brett et al. 2002)
	GVAX + Mesothelin	90	Cyclophosphamide	Métastatique	↑ OS de 4 à 6.2 mois	(Le et al. 2015)
	Hedgehog	59	Gemcitabine	Métastatique	mOS de 10 mois	(Jesus-Acosta A 2014)
	KRAS	23	Seul	Résécable	20 % OS à 10 ans	(Weden et al. 2011)
	KRAS	48	GM-CSF	Résécable Métastatique	↑ OS (2 à 5.4 mois)	(Gjertsen et al. 2001)
	KRAS	24	GM-CSF	Résécable	mOS de 20.3 mois	(Abou-Alfa et al. 2011)
	KRAS	39	Gemcitabine	Résécable	↑ OS de 21.7 5.4 mois	(Al. 2012)
	MUC1	16	SB-AS	Résécable	Pas de bénéfice	(Ramanathan et al. 2005)
	MUC1	6	Adjuvant incomplet de Freund	Métastatique	Pas de bénéfice	(Yamamoto et al. 2005)
	Telomerase	1062	Gemcitabine	Métastatique	Pas de bénéfice	(Middleton et al. 2014)
	Telomerase	520	Gemcitabine	Métastatique	Pas de bénéfice	(Pharmexa 2014)
	Telomerase	48	GM-CSF	Métastatique	mOS de 4.3 mois (p < 0.01)	(Bernhardt et al. 2006)
	Telomerase	178	Gemcitabine	Métastatique	Pas de bénéfice	(Buanes et al. 2009)
	VEGF	607	Erlotinib + Gemcitabine	Métastatique	Pas de bénéfice	(Van Cutsem et al. 2009)
	VEGF	535	Gemcitabine	Non résécable	Pas de bénéfice	(Yamaue H, 2013)
	VEGF	150	Gemcitabine	Non résécable	Pas de bénéfice	(Yamaue H, 2013)
DC autologues	MUC1	17	Seul	Non résécable	mOS de 9 mois	(Nakamura et al. 2009)
	MUC-1	20	Seul	Métastatique	mOS 9.8 mois	(Kondo et al. 2008)
	MUC-1	10	Seul	Résécable	Os de 30 % à 4 ans	(Lepisto AJ et al 2008.)
	MUC-1	2	Seul	Métastatique	Pas de bénéfice	(Pecher et al. 2002)
Vaccination à partir de lysat de cellules tumorales	GVAX	60	5-FU, radiothérapie,	Résécable	OS de 24,8 mois	NCT00084383
	GVAX	60	Cyclophosphamide + Cetuximab	Métastatique, Localement avancé	Pas de bénéfice du cetuximab	NCT00305760
	GVAX	50	Cyclophosphamide	Métastatique	Pas de bénéfice	(Laheru et al. 2008)
	GVAX	304	CRS-207 (Listeria monocytogenes atténuée)	Métastatique Localement avancé	↑ OS GVAX+ CRS-207 de 1mois VS chimiothérapie	(Le, Ko, et al. 2017)
	Algenpantucel-L	70	Seul	Résécable	86 % OS à 12	(Hardacre et al. 2013)
	Algenpantucel-L	722	Seul ou avec Gemcitabine/ 5-FU	Résécable	Pas de bénéfice	NCT01072981

Transfert adoptif	Mesothelin	6	Seul	Métastatique	Pas de bénéfice	(Beatty et al. 2014)
	MUC1	20	Seul	Non résécable	mOS 9.8 mois, 20 % 1 ans OS	eatty et al. 2014)
Inhibiteur de point de contrôle immunitaire	CD40	21	Gemcitabine	Non résécable Métastatique	↑mOS de 1.7 mois vs gemcitabine seul, OS 8,4 mois	(Beatty et al. 2011)
	CTLA-4	30	GVAX	Non résécable métastatique	↑20 % de l'OS à 1 ans par rapport au GVAX seul	(Le et al. 2013)
	CTLA-4	27	Seul	Non résécable Métastatique	Pas de bénéfice.	(Royal et al. 2010a)
	PD-L1	14	Seul	Métastatique	Pas de bénéfice	(Brahmer et al. 2012a)

Tableau 6 : Liste des principaux essais cliniques d'immunothérapies dans l'ADKP dont les résultats ont été publiés (Adapté de Kunk et al. 2016; Thind et al. 2017; Ma et al. 2016)

III. La galectine-9 : Nouveau point de contrôle immunitaire

La Gal-9 appartient à la famille des galectines dites divalentes. Elle possède de multiples fonctions biologiques telles que la chimio-attraction, l'agrégation cellulaire et l'apoptose (Rabinovich & Toscano 2009) (Alam et al. 2011)(Rabinovich & Toscano 2009; Rabinovich & Toscano 2009) . Elle est constituée de deux domaines de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD), reliés par un peptide de liaison. On la retrouve sur la membrane cellulaire, dans le cytoplasme et le noyau (Hirashima et al. 2004). Il existe trois gènes qui codent la Gal-9 : LGALS9, LGALS9B et LGALS9C et chacun de ces gènes peut produire différents variants par épissage alternatif (Chabot et al. 2002). À ce jour, on décrit principalement trois variants mais au total cinq variants ont été caractérisés. Les trois principaux ont des différences au niveau de la région peptidique qui relie les deux CRD et les deux autres possèdent un CRD tronqué dans la région C-terminal (Spitzenberger, Graessler et Schroeder, 2001; Chabot et al., 2002; Heusschen et al., 2013).

Le rôle préventif de la Gal-9 dans la dissémination des métastases et son effet pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses, ont suggéré un effet bénéfique de la Gal-9 dans le cancer. La Gal-9 a par exemple été associée à un bon pronostic dans le cancer gastrique, mammaire, broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC) et le myélome (Jiang et al. 2013; Irie et al. 2005; Schulkens et al. 2014a; Kobayashi et al. 2010). En revanche elle semble associée à un mauvais pronostic dans le carcinome du nasopharynx (CNP), du rein, dans le glioblastome et plus récemment dans l'adénocarcinome du pancréas (Lowther et al. 2016; Klibi et al. 2009; Fu et al. 2015). Très récemment, il a été montré qu'une immunothérapie anti-Gal-9 ciblant les Treg, parvenait à limiter de manière significative la croissance tumorale dans un modèle murin humanisé de CNP (Brevet *WO2015185875*) (article en soumission, Mustapha et al. 2018).

La Gal-9 est le principal ligand pour Tim-3, une protéine transmembranaire de type 1 appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Initialement identifiée sur les cellules Th1, la liaison Gal-9/Tim3, induit l'apoptose des Th1 effecteurs et T CD8+ *via* la voie Ca⁺⁺-calpaïne -caspase 1 agissant ainsi comme une voie de régulation négative des lymphocytes T activés (Zhu et al. 2005). Outre Tim-3, CD44 est une des autres molécules de surface cellulaire interagissant avec la Gal-9 (Bollyky et al. 2009; Bourguignon et al. 2002; Liu et al. 2009; Tanikawa et al. 2010). L'équipe du Dr Kuchroo a montré que la liaison de la Gal-9 au CD44 amplifie l'activité tyrosine kinase du récepteur au TGF- β , renforçant ainsi l'expression et la stabilité de Foxp3+ et de la Gal-9 dans les iTreg (Wu et al. 2014). Ainsi, la Gal-9 régule l'équilibre réciproque des cellules Teff et Treg en induisant non seulement la mort ou l'épuisement des lymphocytes Teff (Th1) mais aussi la promotion de la génération de cellules Treg Foxp3+ et constitue donc un nouveau point de contrôle immunitaire.

**PROPOSITION D'UNE NOUVELLE
STRATEGIE D'IMMUNOTHERAPIE DANS
LE CANCER DU PANCREAS**

RESUMÉ

Au cours de ces dernières années, nous et d'autres équipes avons montré, dans divers cancers, qu'une augmentation de la prévalence des lymphocytes T régulateurs (Treg), favorisait la progression de la tumeur, en inhibant notamment la réponse immune anti-tumorale. En ce sens, le laboratoire a développé une nouvelle stratégie d'immunothérapie active visant à inhiber spécifiquement l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs naturels humains (CD4+ CD25^{high} FoxP3+ CD127^{-/Low}). Celle-ci consiste en l'utilisation d'un anticorps monoclonal (Brevet WO2015185875) ciblant la Galectine-9 (Gal-9) produite par les Treg. Le laboratoire a, ainsi, montré pour la première fois qu'une immunothérapie anti-Gal-9, parvenait à limiter de manière significative la croissance tumorale dans un modèle murin humanisé de carcinome du nasopharynx. Par ailleurs, une augmentation de la prévalence des Treg a également été décrite dans le cancer du pancréas et plus récemment, il a été montré dans un modèle murin de cancer pancréatique une augmentation significative de la Gal-9 intra-tumorale. C'est pourquoi, nous avons eu pour objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser notre immunothérapie anti-Gal-9 dans le cancer pancréatique.

Dans un premier temps, nous avons montré par immunohistochimie une augmentation importante de l'expression de la Gal-9 sur des coupes de pancréas issues d'un modèle murin transgénique de cancer pancréatique (KrasG12D). Nous avons également montré que cette augmentation de la Gal-9 était proportionnelle à l'état d'avancement des lésions précancéreuses. Et, avant d'envisager l'utilisation de notre immunothérapie anti-Gal-9 dans ce modèle murin transgénique, nous avons montré (i) que les Treg murins exprimaient bien la Gal-9 (cytométrie de flux, Immunofluorescence et western-blot); (ii) que l'anticorps monoclonal breveté pour cibler et neutraliser la Gal-9 humaine pouvait aussi cibler et inhiber l'immunosuppression induite par la Gal-9 murine recombinante (tests de prolifération) et enfin (iii) que l'anticorps anti-Gal-9 pouvait cibler et neutraliser l'activité suppressive des Treg murins (tests de suppression : MLR). Par ailleurs, afin d'anticiper l'utilisation de cette immunothérapie chez l'homme, nous avons pu valider dans 4 lignées différentes de cancers pancréatiques humaines (Capan-1, Capan-2, MIAPaCa-2, PANC-1), l'expression génique (RT-QPCR) et protéique de la Gal-9 (Immunofluorescence, Western-blot et cytométrie). Et enfin, nous avons également montré que ces lignées étaient capables de sécréter la Gal-9 (ELISA).

En conclusion, nos résultats, bien que préliminaires, suggèrent que l'anticorps anti-Gal-9 humain pourrait être utilisé dans le modèle murin transgénique de cancer pancréatique, en ciblant spécifiquement la Gal-9 tumorale endogène et la Gal-9 exogène produite par les Treg. Ainsi, ce modèle devrait nous permettre de valider *in vivo* l'efficacité d'une immunothérapie anti-Gal-9. Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus sur les lignées pancréatiques humaines entrouvrent des perspectives encourageantes quant à l'utilisation clinique de l'anti-Gal-9.

I. OBJECTIFS DES TRAVAUX

Notre équipe, en collaboration avec l'équipe de Pierre Busson à l'institut Gustave Roussy, a développé un anticorps spécifique de la Gal-9 nommé 1G3. L'anticorps cible la partie C terminale de la Gal-9, et plus précisément la fin du « linker » et la partie N terminale du 2ème CRD. Cette séquence est commune aux trois isoformes de la Gal-9 (aa 166 à 178 de l'isoforme S, aa 178 à 190 de l'isoforme M, aa 210 à 222 de l'isoforme L) permettant ainsi à l'anticorps de reconnaître les 3 isoformes. De plus, il a été montré par ELISA que l'anticorps était capable de se lier à la Gal-9 murine, mais ne réagissait pas avec les autres galectines humaines (Barjon et al. 2012). Notre laboratoire a démontré le potentiel de cet anticorps à être utilisé dans des stratégies d'immunothérapie. En effet, le 1G3 est capable de cibler et neutraliser l'activité immunosuppressive de la Gal-9 *in vitro* et *in vivo* et de neutraliser l'activité suppressive des Treg permettant ainsi une restauration du système immunitaire. La preuve de concept a été établie dans un modèle murin humanisé par xénotransplantation d'une tumeur de carcinome de nasopharynx (connu pour être infiltré par un nombre important de Treg et pour produire des quantités massives de Gal-9) (Klibi et al. 2009). Plus récemment, les Treg et la Gal-9 ont également été associés à un mauvais pronostic dans le cancer du pancréas, c'est pourquoi, nous avons envisagé la possibilité d'étendre l'utilisation de notre immunothérapie dans les cancers pancréatiques qui sont de très mauvais pronostic. Afin de répondre à ce projet ambitieux, notre premier objectif a été de vérifier l'expression de la Gal-9 dans des coupes de pancréas issues d'un modèle murin transgénique de cancer pancréatique mais aussi de déterminer les taux de LTreg infiltrant et circulant dans ce modèle. Notre second objectif, en amont de l'utilisation de notre immunothérapie anti-Gal-9, a été de vérifier (i) que les Treg murins exprimaient bien la Gal-9, (ii) que l'anticorps monoclonal breveté pour cibler et neutraliser la Gal-9 humaine pouvait aussi cibler et inhiber l'immunosuppression induite par la Gal-9 et les Treg murins. Et enfin, afin d'anticiper l'utilisation de cette immunothérapie chez l'homme, notre dernier objectif a été de valider l'expression de la Gal-9 dans 4 lignées différentes de cancers pancréatiques humaines.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Modèles murins

Nous avons travaillé sur un modèle murin Pdx1-Cre ; LstopL-KrasG12D de fond génétique C57BL/6. C'est un modèle de cancérogenèse pancréatique développant des lésions pré-néoplasiques PanIN de bas grade à partir de 5-6 semaines et de moyen grade à partir de 9-12 semaines semblables à celles retrouvées chez l'homme. A plus faible fréquence, on peut retrouver des lésions de haut grade PanIN3 à partir de 12 à 15 semaines. Ce modèle a été développé et décrit par Hingorani et ses collaborateurs (Hingorani et al. 2003) . Nous y avons eu accès, par nos collaborateurs Isabelle Van Seuningen et Nicolas Jonckheere installés au Centre de recherche Jean-Pierre Aubert à Lille (JPARC). Ces lésions, ainsi que le microenvironnement tumoral, ont été reproduits dans des modèles transgéniques établis chez la souris à partir de la mutation de Kras. La mutation KRASG12D est introduite, après une cassette Lox-Stop-Lox (LSL), empêchant la transcription dans un allèle du gène Ras. La version oncogénique de Kras est alors induite, à des niveaux physiologiques, pendant le développement embryonnaire après excision de la cassette LSL par la recombinaison Cre exprimée sous le contrôle des promoteurs des facteurs de transcription Pdx1 (pancreatic et duodenal homeobox 1) spécifiques des cellules souches pancréatiques. Au final cela conduit à la formation des PanIN similaires aux PanIN humaines du point de vue des voies de signalisation activées et des protéines exprimées. Par la suite 10 % de ces souris développeront naturellement un adénocarcinome. Par ailleurs l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs murines, comme TP53, SMAD4, et INK4A/ARF, mutés dans la pathologie humaine, conduit au développement, en quelques mois, de tumeurs invasives entourées d'un stroma dense. Le pancréas de ces souris âgées de 5, 9, et 15 mois a été fixé dans le chloroforme, puis inclus dans la paraffine afin de réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur.

Le modèle murin à partir duquel nous avons réalisé nos expérimentations de mise au point est une souche de même fond génétique (C57BL/6 JANVIER®).

B. Lignées cellulaires

4 lignées de cancer du pancréas sont cultivées dans un incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C et maintenues dans des conditions stériles.

La lignée cellulaire Capan-2 est issue d'une tumeur primaire d'un adénocarcinome pancréatique de la tête du pancréas infiltrant l'anse du duodénum et l'ampoule de Water. C'est une lignée bien différenciée, tumorigène, polygonale, adhérente qui pousse en monocouche (Kyriazis et al. 1986).

La lignée Capan-1 est issue d'une métastase hépatique d'un adénocarcinome pancréatique de la tête du pancréas. C'est une lignée bien différenciée, tumorigène, prismatique, adhérente qui pousse en monocouche (Kyriazis et al. 1982).

La lignée MiaPaCa-2 est issue d'un adénocarcinome pancréatique du corps et de la queue infiltrant la zone péri-aortique. C'est une lignée peu différenciée, les cellules sont larges, fusiformes, adhérentes, et peuvent pousser les unes sur les autres (Yunis et al. 1977).

La lignée Panc-1 est issue d'un carcinome de la tête du pancréas envahissant la paroi du duodénum. Les cellules sont rondes, poussent en monocouche et sont adhérentes. Les lignées MIAPaCa-2 et PANC-1 sont cultivées dans un milieu DMEM, supplémenté avec de la L-glutamine (2mM), du SVF 10% (v/v), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine. Les lignées Capan-1 et Capan-2 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec de la L-glutamine 2mM, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et SVF 10% (v/v) pour Capan-2 et 15% (v/v) de SVF pour Capan-2.

C. Isolement des lymphocytes T conventionnels CD4+CD25- et des lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ murins

L'obtention des splénocytes murins se fait en condition stérile à partir de souris C57Bl/6 (JANVIER ® France) euthanasiées par dislocation cervicales. Les rates sont récupérées et placées dans du tampon MACS (Miltenyi Biotec®, Allemagne) jusqu'à leur utilisation. Elles sont ensuite broyées, sous poste de sécurité microbiologique, dans une boîte de Pétri stérile contenant du tissu en nylon 30 µm (Blutex® NYLON 90/35 W PW). Les cellules T CD4+CD25+ (Treg) ou T CD4+CD25- (Tconv) sont obtenues avec le kit d'isolement de lymphocytes T régulateurs «CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, murin» selon les instructions du fournisseur (Miltenyi Biotec, Allemagne). Tout d'abord, les cellules T CD4+ sont obtenues par sélection négative. Une première étape d'incubation de 10 minutes à 4°C avec un cocktail d'anticorps biotinylés ciblant les marqueurs CD8, CD11b, CD45R, CD49b, Ter-119. La suspension cellulaire est ensuite incubée pendant 15 minutes à 4°C avec des microbilles magnétiques biotinylées et l'anticorps anti-CD25 PE. Les cellules ayant fixés les billes sont retenues dans une colonne MACS® (Magnetic Activated Cell Sorting, Miltenyi Biotec, Allemagne) placée dans un champ magnétique. Seules les cellules CD4+, non marquées, sont éluées et récupérées à la sortie de la colonne. Ensuite les cellules CD4+ CD25+ sont obtenues par sélection positive : les cellules CD4+ sont incubées 15min à 4°C avec des microbilles magnétiques, un anticorps anti-PE. Les cellules marquées avec les billes sont retenues dans une colonne MACS® placée dans un champ magnétique

D. Analyse des lymphocytes T conventionnels et régulateurs murins par cytométrie en flux (BD FACSCanto II TM)

Anticorps :

Les Anticorps primaires monoclonaux anti-murins utilisés sont couplés à des fluorochromes : CD4-FITC, CD25-PE, anti-Gal-9 APC, CD45 PE-Cy5 et FoxP3-APC (Miltenyi Biotec, Allemagne). Pour la compensation, l'isotype contrôle des différents anticorps monoclonaux a été utilisé. L'exclusion des cellules mortes est réalisée par marquage des cellules vivantes en suivant les instructions du kit Viability405/452 de chez Miltenyi Biotec® (30-110-205). Le marquage des cellules est effectué grâce au kit «mousse

Treg detection kit » (Miltenyi Biotec, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, 300 000 splénocytes sont repris dans un volume de 35µL de tampon Miltenyi et incubées pendant 15 minutes à température ambiante avec 5 µL de « mouse FCR block » puis à l'obscurité pendant 20min avec 5 µL d'anticorps anti-CD4, anti-CD25. Les cellules marquées sont lavées puis reprises avec 1mL de solution de fixation et de perméabilisation et incubées 30min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées, reprises dans 45µL de tampon de perméabilisation 1X et incubées 20 min à 4°C avec 5µL de « mouse FCR block » puis avec 5µL d'anti-FoxP3 pendant 30min à 4°C. Enfin les cellules sont lavées et reprises dans 200µL de tampon Miltenyi. La fluorescence est analysée par cytométrie en flux au BD FACSCanto II™ (FACS Flow Supply System, Becton Dickinson, USA). Les résultats de cytométrie sont analysés exprimés sous forme de delta de médiane d'intensité de fluorescence (Δ MFI = anticorps MFI - contrôle isotopique de l'IMF) avec le logiciel Flow Jo (Tree Star Incorporation, USA).

E. Mesure de la prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire a été fait sur 100 000 cellules (splénocytes ou cellules T CD4+), 1 µCi/puits de thymidine [3H] (PerkinElmer®, Courtaboeuf, France) est ajouté 18 heures avant la mesure puis collectées sur un filtre en fibre de verre (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finlande) en utilisant un collecteur Tomtec (Wallac). Le filtre a ensuite été scellé dans un sac après un séchage et l'addition du liquide de scintillation (Beckman Coulter, Etats-Unis). La radioactivité a été mesurée en utilisant un compteur β (1450 Trilux, Wallac, Finlande). Chaque test de prolifération a été réalisé en triplicate et estimé en « coups par minute » (cpm).

Les lymphocytes CD25⁻ (Tconv⁻) et les co-cultures de T conv⁻/ Treg ayant été exposées au test de prolifération ont été préalablement mis en culture dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en pyruvate de sodium (concentration final = 1 mM), en acides aminés non essentiels MEM 1x, en HEPES (concentration final = 25 mM) en 2-mercaptoéthanol (concentration final = 50 µM), en gentamicine (concentration final = 10µg/ml) (Thermo Fisher Scientific France) et avec 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO, Invitrogen).

100 000 Tconv⁻ sont cultivées avec 50 000 Treg dans 100 µL de milieu en plaques 96 puits à fond rond (Corning France) avec ou sans Gal-9M (3 µg/mL), en présence de l'1G3 ou de son isotype contrôle IgG1 (5 µg / mL) pour les tests de prolifération. Chacun de ces essais de prolifération a été effectué à deux temps : 48h ou 72h de culture.

F. Immunofluorescence

1.5 10⁶ cellules sontensemencées dans une plaque de 6 puits dans lesquels une lamelle de verre stérile a été déposée. Après deux jours de culture les cellules sont fixées avec 1 ml de PFA 4%.

Pour les lymphocytes T conv et Treg: Après l'isolement, les cellules ont été fixées sur lamelle grâce au CytoSpin®, 2min à 300g

Perméabilisations et marquage :

Les cellules sont, par la suite, lavées 3 fois avec PBS (Thermo Fisher Scientific France) puis perméabilisées avec 0,5% de Triton 100-X (Sigma France) dans du PBS. Le blocage est effectué avec une solution d'albumine bovine à 2% et 0,3% de Triton 100X dans du PBS (Sigma France). Les incubations d'anticorps primaires et secondaires sont, quant à elles, effectuées dans du PBS contenant 0,5% de BSA pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps primaire anti- Gal-9 (ABCAM® ab69630) est utilisé au 1/500 pour les lignées cellulaires et 1/250 pour les lymphocytes. L'anticorps secondaire utilisé pour les lignées est une IgG de chèvre anti-lapin (H+L) couplée à Alexa Fluor® 555 utilisé au 1/500ème (Thermo Fisher Scientific France) pour les lymphocytes Alexa Fluor® 633 utilisé au 1/500. Le noyau des cellules est coloré avec du 4'6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) au 1/5000ème (Sigma Aldrich, États-Unis) durant 5 minutes, à TA. Enfin, les lamelles sont fixées sur les spots des lames à l'aide une solution de Mowiol® 4-88 (Sigma Aldrich, États-Unis) puis maintenues à l'obscurité à 4°C. Parallèlement, un contrôle est effectué sans Anticorps primaire pour éliminer le bruit de fond lié aux liaisons aspécifiques de l'Anticorps secondaire. L'analyse des photos a été effectuée sous le logiciel Zen (Carl Zeiss, France) par microscopie confocale LSM780 (Carl Zeiss).

G. Western Blot Gal-9

Lyse protéique : Les différentes lignées cellulaires de l'étude sont lysées pendant 15 minutes sur de la glace avec un tampon de lyse constitué de Tris-HCl 20mM, 50mM de NaCl, 5mM d'EDTA, 1% de Triton 100X, 0,02% d'azide de sodium et supplémenté par un inhibiteur de protéase (PIC) (1/400^{ème}) (Sigma-Aldrich®, USA). Le lysat obtenu est ensuite centrifugé (14000 rpm, 4°C pendant 30 minutes) afin d'éliminer les débris cellulaires et de récupérer le surnageant contenant les extraits protéiques.

Dosage des protéines : La concentration des protéines en solution est ensuite mesurée par dosage colorimétrique de Bradford (BIO-RAD Laboratories GmbH, München). Une gamme étalon est établie en préparant 400 µL de dilutions successives de BSA (20µg/mL) (Fluka, Sigma, USA) dans l'eau Milli-Q®. 100µL de réactif de BIORAD sont ajoutés dans chaque tube contenant 400µL de solution (lysate protéique dilué au 1/200^{ème} dans de l'eau). Puis 150µL de solution sont déposés par puits en *triplicate* sur une plaque de 96 puits à fond plat (Maxisorp™, NUNC, Danemark). L'absorbance à 595 nm est lue au spectrophomètre (Multiskan, ThermoLabsystems, France). Les analyses sont obtenues par le logiciel Ascent™ Software (ThermoLabsystems, France) et exprimées en µg/mL.

Electrophorèse et transfert: Pour la préparation des échantillons, 7.5µl de bleu de charge 1X (NuPAGE LDS Sample buffer 4X, Invitrogen, USA) sont mélangés à 3µL d'agent

réducteur (NuPAGE LDS Sample reducing agent 10Xn Invitrogen, USA). 20 µg de protéines sont ajoutés au mélange et le volume final est ramené à 30 µL avec le tampon de lyse. Les protéines sont chauffées 10 minutes à 70°C puis centrifugées (300g, 30sec, TA), avant d'être déposées sur un gel dénaturant de polyacrylamide (NuPAGE(r)NOVEX 4-12% Bis-Tris Gel, Lifes technologies, USA). La migration est réalisée dans un tampon MES1X (NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20X)) à 150Volts, 2h à TA. 12µL de marqueurs de poids moléculaire (MagicMark™ XP Western Protein Standard) sont utilisés comme indicateurs de taille. Après la migration, le gel est récupéré et les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane IPVH PORE SIZE : 0.45µm). Le transfert est réalisé en tampon Tris-Gly (Tri-glycine 10X, pH 8.5, Euromedex, France) ; Méthanol (AnalaR NORMAPUR, VWR PROLABO, France) et eau déionisée à 65 Volts, pendant 2h30 à 4°C dans une cuve Invitrogen® Novec mini-cell..

La qualité du transfert et de l'équicharge sont vérifiées par coloration au rouge ponceau (Sigma, USA) pendant 5 minutes. La membrane est ensuite décolorée par des bains d'eau déionisée.

Saturation, Anticorps et révélation : Après l'étape de transfert, la membrane est bloquée dans une solution de saturation PBS 1X (Euromedex, France) caséine (2mg/mL) sur la nuit à 4°C, sous agitation. La membrane est ensuite immergée dans une solution d'anticorps primaires à TA et sous agitation pendant 2h. Afin de détecter les protéines correspondantes, nous avons utilisé les Anticorps suivants :

Cible	Anticorps primaires		Anticorps secondaires	
Galectine-9	Rabbit anti-Gal-9 CT-L1 (Galpharma®, Japan)	1/400 ^{ème}	Anti-rabbit HRP (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)	1/10000 ^{ème}
HSP 60	Mouse anti-HSP 60	1/100 ^{ème}	Anti-mouse HRP (GE Healthcare, Wauwatosa, USA)	1/10000 ^{ème}

Tableau 7 : Liste des Anticorps primaires et secondaires utilisés pour Western Blot.

Les membranes sont ensuite lavées au PBS 1X Tween 0.05% puis incubées 2h avec une solution d'anticorps secondaires, sous agitation à TA. Elles sont ensuite lavées avec du PBS 1X Tween 0.05% puis rincées avec du PBS 1X. La révélation des protéines est faite avec 400 µL de luminol ECL + 400µL d'ECL peroxide (SuperSignal™ West Femto Extended Duration Substrate) ; Les acquisitions ont été réalisées sur BIORAD ChemiDOC® XRS et analysées sur le logiciel Image Lab Image Capture and Analysis Software.

H. Immunohistochimie

Après rehydratation des coupes, les peroxydases endogènes ont été désactivées par un peroxyde d'hydrogène à 0,3% dans du méthanol pendant 20 minutes. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec une solution de PBS/BSA 5%/sérum de chèvre 5% (Vector Labs U.S.A) pendant 2 heures. Ensuite, suivie d'un blocage de l'avidine et de la biotine pendant 15 minutes chacun (Vector Labs U.S.A). Après un rinçage au PBS, l'anticorps primaire anti-Gal-9 (ABCAM ® ab69630) a été ajouté. Il a été dilué au 1/250^{ème} dilué dans une solution à 2% de BSA + 2% de sérum de chèvre pendant une nuit à 4 ° C sous agitation. Après 3 lavages dans du PBS pendant 5 minutes, l'anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (BA-1000 Vector Labs U.S.A) au 1/250 dilué dans du PBS/BSA 2% a été ajouté et incubé pendant 1 heure. Après 3 étapes de lavage, l'amplification a été effectuée par VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Labs U.S.A), 3 étapes de lavage ont été effectuées de nouveau avant la révélation par ImmPACT AEC Peroxidase (HRP) Substrat (Vector Labs U.S.A) pendant 4 minutes avant de laver à l'eau. La coloration du noyau a été effectuée par une solution d'hématoxyline de Mayer (CL64040 LABOMODERNE France) pendant 2 minutes et une contre coloration par une solution Hemalun de Mayer a été réalisée. Les photos ont été réalisées grâce au microscope Axio plan 2 ® puis analysées avec le logiciel Zen 2012.

I. ELISA Galectine-9

Les surnageants de culture des différentes lignées ont été testés pour mesurer la sécrétion de Gal-9 par ELISA Sandwich en suivant les instructions du fabricant (Hu Cloud-Clone Corp, USA).

Les surnageants de culture des Capan-1, Capan-2, MiaPACA-2, PanC-1 ont été recueillis puis centrifugés à 300 g pendant 10 minutes pour éliminer les cellules et débris et congelés à -80 ° C jusqu'à l'analyse où les plaques sont lues à 450 nm au spectrophotomètre (Multiskan EX, ThermoLabsystems, France).

J. Analyse transcriptomique

Extraction de l'ARN :

L'extraction d'ARN total est réalisée à partir des cellules en culture, à l'aide de TRIzol® (Life Technologies, GB). Après homogénéisation dans 1mL de TRIzol, du chloroforme est ajouté (PROLABO, Merck eurolab, France). Suite à une agitation et à une incubation à TA, les tubes sont centrifugés à 12000g (15 minutes à 4°C). La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN est alors récupérée et précipité par l'isopropanol (ACROS Organics, USA). Le culot est récupéré, puis solubilisé dans de l'eau DNases free et RNases free (eau RF, Life Technologies, GB). L'ARN est quantifiable par absorbance à 260 nm grâce au Nanodrop™ 2000c.

Rétro-transcription (RT) :

Le kit de Transcriptase Reverse Superscript™ II RNase H est utilisé pour la RT (Life Technologies, GB). L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir de 2µg d'ARN total, dans un volume de 15µL d'eau RF. 5µL du mélange composé de 1µL d'oligo dT (Roche Diagnostics, Germany), 0,1µL de RNAsin 40U/µL (PROMEGA, USA) et 4µL d'eau RNase free (Life technologies, USA) sont ensuite ajoutés au mélange. Après une autre incubation de 10 minutes à 70°C puis 5 minutes à TA, 10µL d'un second mélange réactionnel contenant : 6µL de tampon 5X (Tris-HCl, KCl, MgCl₂) (Invitrogen, GB), 1µL de DTT (life Technologies, GB), 2µL de dNTPs 10mM (Amersham Bioscience, GB), 0,1µL de RNAsin (Promega, USA), 1µL de transcriptase Reverse Superscript™ II à 100UI/µL (Life Technologies, GB), sont ajoutés. Une incubation d'une heure à 45°C puis 5 minutes à 95°C est réalisée. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 70µL d'eau RF/µL d'ARN initial, afin d'obtenir une concentration finale de 10ng d'équivalent ARN/µL.

PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) :

La réaction est réalisée à partir d'ADNc à une concentration de 10ng d'équivalent ARN/µL de mélange réactionnel. Toutes les amorces sont conçues spécifiquement pour la Q-PCR :

Galectine 9 humaine (SIGMA) : 5'-GTGGGTGTGAAAGGCAGCGGT-3' 3'-AGGTTCGACAGGGGAAAAGACCCT-5'	GAPDH (EUROGENTEC) : 5'-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3' 3'-TTAAGGTACCGTGGCAGTTC-5'
β-Actine (EUROGENTEC) : 5'-CACGGCATCGTCACCAAC-3' 3'-GTTACTCGACGCACACCGA-5'	18S (EUROGENTEC) : 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3' 3'-ACACTACGGGAATCTACAGG-5'

Tableau 8 : Amorces utilisées pour la q-PCR

Les transcrits sont amplifiés et quantifiés par le Mx3005P (Statagène, USA) dans des plaques optiques 96 puits (Eurogentec, France). Dans chaque puits, 10µL d'un couple d'amorces spécifiques sont déposés, chaque plaque contenant les couples d'amorces et un puits contrôle contenant l'eau RF, en double exemplaire. Les Q-PCR sont réalisées, à partir d'1µL d'échantillon d'ADNc/puits, suivant les instructions du fabricant avec le kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, France). Après une première dénaturation de 5 minutes à 95°C, le mélange réactionnel va subir 40 cycles d'amplification consistant en une succession de passage de 15 secondes à 95°C (dénaturant de double brin d'ADN) puis une minute à 60°C (Hybridation des amorces et élongation du brin d'ADN néosynthétisé). L'intensité de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation, et un cycle de fusion est programmé immédiatement après la dernière amplification.

L'analyse des résultats se fait selon l'expression quantitative relative d'un gène en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al. 2001). L'expression d'un gène donné est interprétée en CT (Cycle Threshold) puis normalisée par la moyenne des 3 gènes de ménage = ΔCT . L'expression de chaque gène est ensuite rapportée à la condition de référence = $\Delta\Delta CT$. Enfin, l'expression relative des gènes est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

K. Analyse des données de Transcriptome

Les données concernant le transcriptome ont été extraites à partir de la base de données publique Gène Expression Omnibus (GEO) puis analysées statiquement à l'aide du logiciel GraphPad. Les courbes de survies ont été obtenues à partir de la plateforme PROGeneV2.

L. Analyse statistique

Le logiciel Graphpad a été utilisé pour le traitement des données et l'analyse statistique. Le test a été appliqué pour les analyses respectivement $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) et $P < 0.001$ (***)

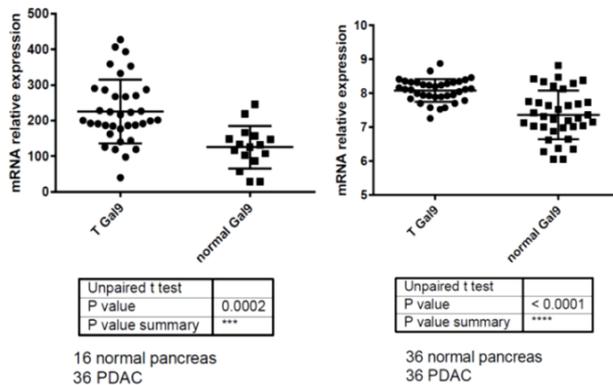
III. RÉSULTATS

A. Expression génique et protéique de la Galectine 9

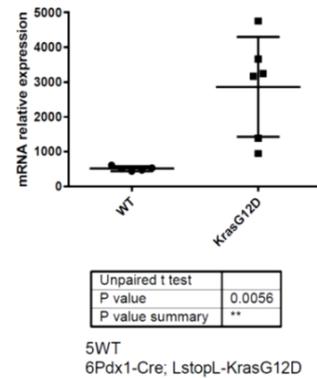
1. Expression génique de la Galectine 9

Nous avons, dans un premier temps, par analyse bioinformatique à partir de la banque de donnée public GEO (Gène Expression Omnibus), récupéré les données d'expression des transcrits de Gal-9 provenant de deux études issues des tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique et de tissus sains (GSE15471 et GSE16515).

A.



B.



C.

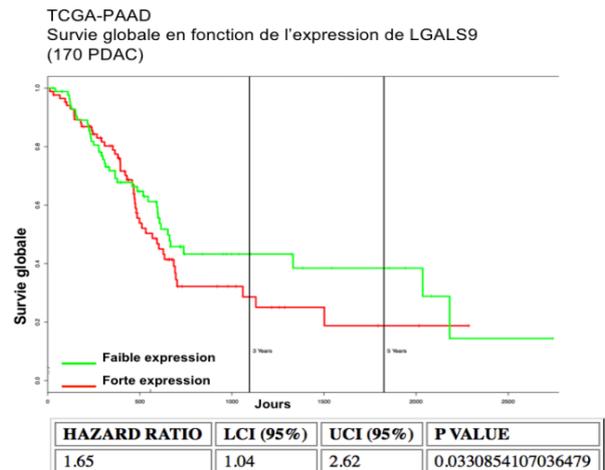
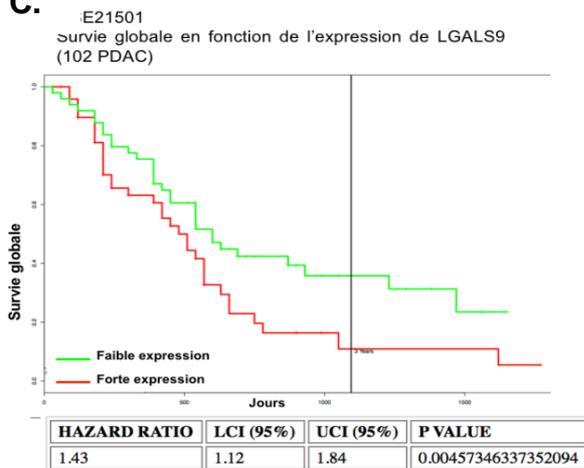


Figure 15 : Expression des transcrits de Gal-9 dans les adénocarcinomes pancréatiques humain et dans le pancréas des souris KRASG12D vs contrôles.

A. Quantification, par analyse bioinformatique des données de transcriptome humain, de l'expression des transcrits de la Gal-9 chez des patients atteints d'ADKP comparée à celle de pancréas sains. **B.** Quantification, par analyse bioinformatique des données de transcriptome chez les souris KRAS^{G12D} et leurs contrôles WT. **C.** Courbe de survie en fonction de l'expression de la Gal-9 chez des patients atteints ADKP.

L'analyse montre une augmentation statistiquement significative de l'expression des transcrits de la Gal-9 dans les adénocarcinomes humains comparés aux pancréas sains

(Figure 15 A). Une étude similaire réalisée sur une cohorte de souris $KRAS^{G12D}$ vs saines (GSE53659) a également montré une augmentation statistiquement significative de l'expression génique de la Gal-9 **(Figure 15 B)**. Enfin nous avons relié l'expression génique de la Gal-9 à la survie globale à grace à la plateforme PROGgeneV2. Les courbes de survie réalisées à partir de deux cohortes de patients ADKP (GSE21501 et TCGA) montrent qu'une forte expression des transcrits de Gal-9 est associée à une diminution de la survie globale de 100 à 150 jours **(Figure 15 C)**

2. Expression protéique de la Galectine 9 dans le pancréas des souris $KRAS^{G12D}$.

L'expression protéique de la Gal-9 a été étudiée par immunohistochimie sur des coupes paraffinées de pancréas âgées de 5, 9 et 15 mois. Nous avons observé une expression plus forte chez les souris mutées $KRAS^{G12D}$ que chez les souris non mutées (WT) et constaté que l'expression de la Gal-9 augmente drastiquement dans les PanIN de haut grade (15 mois). Plus précisément, nous avons observé une expression plus intense au niveau des lésions précancéreuses (PanIN) et nous avons constaté une expression au niveau des îlots de Langherans et au niveau vasculaire chez les souris mutées et non mutée **(Figure 16)**.

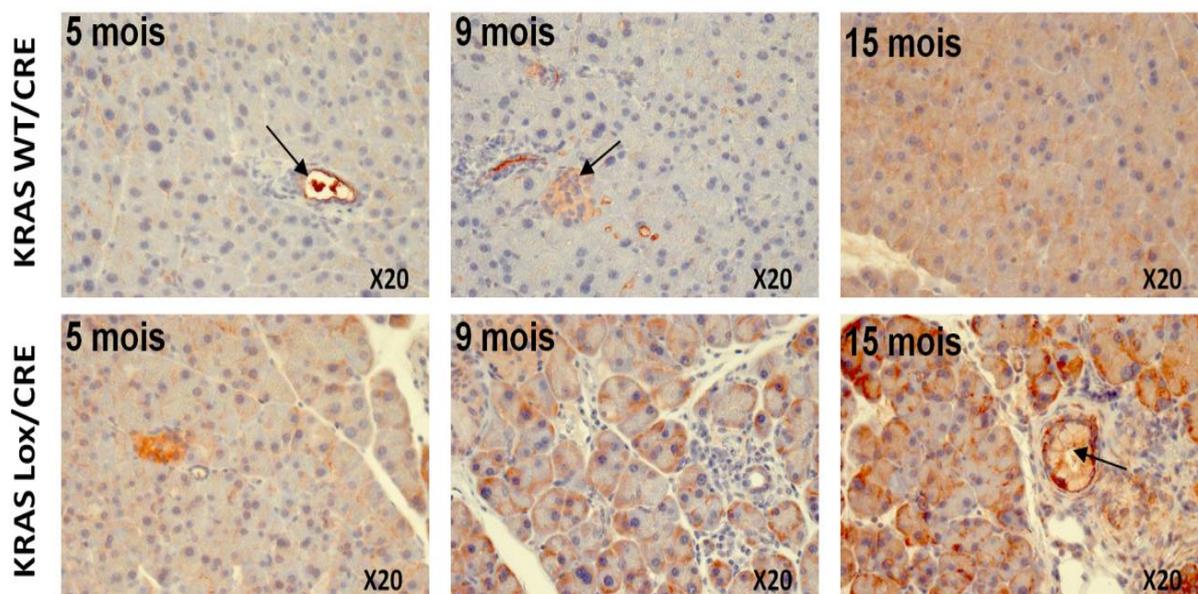


Figure 16 : Expression de la Gal-9 dans le pancréas des souris $KRAS^{G12D}$ vs $KRAS^{WT}$. Immunohistochimie anti-Gal-9 sur des coupes paraffinées de pancréas de souris $KRAS^{G12D}$ et $KRAS^{WT}$, prélevées à 5, 9 et 15 mois. La flèche noire sur le contrôle $KRAS^{WT}$ indique à 5 mois un exemple de fixation sur l'endothélium vasculaire et à 9 mois un exemple de fixation au niveau des îlots de Langherans. La flèche noire à 15 mois chez la souris $KRAS^{G12D}$ indique un PanIN3.

B. Evaluation de la prévalence des lymphocytes T régulateurs périphériques et infiltrants dans le modèle KRAS^{G12D}

Nous avons analysé la prévalence des lymphocytes Treg périphériques et infiltrants les pancréas des souris KRAS^{G12D} par cytométrie. L'analyse des Treg périphériques a été faite dans le sang des souris et l'analyse des Treg infiltrants a été faite après digestion enzymatique des pancréas. Les lymphocytes Treg ont été identifiés sur la base de l'expression du CD4+, Foxp3+, CD25+ et CD127-/low On constate une forte augmentation des taux de Treg infiltrants chez les souris KRAS^{G12D} par rapport au souris WT. Nous n'avons pas retrouvé cette différence au niveau périphérique.

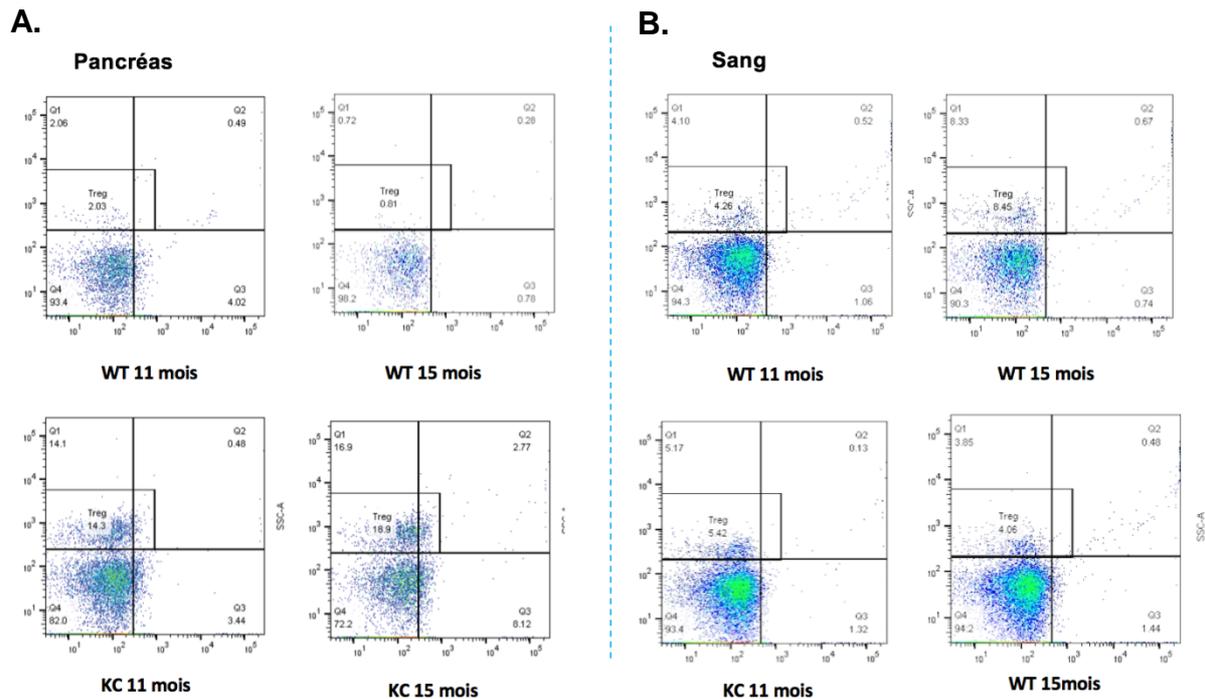


Figure 17 : Prévalence des lymphocytes T régulateurs dans les souris KRAS^{G12D} vs KRAS WT.

A. Les lymphocytes T reg ont été marqués après digestion mécanique puis enzymatique des pancréas des souris KRAS^{G12D} vs WT. **B.** Les lymphocytes T reg ont été marqués à partir du sang périphérique après lyse des globules rouge

C. Evaluation de l'expression de la galectine 9 dans les lymphocytes T régulateurs murins de souris C57Bl6.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression intracellulaire de la Gal-9 par cytométrie de flux dans les lymphocytes Treg et les Tconv murins. Nous avons retrouvé une expression intracellulaire de la Gal-9 murine à la fois dans les Treg et les Tconv, avec un niveau d'expression très comparable (**Figure 18 A**).

Par ailleurs, l'analyse par immunofluorescence a conforté l'expression de la Gal-9 murine dans les Treg avec également un niveau d'expression comparable entre les 2 types cellulaires (**Figure 18 B**).

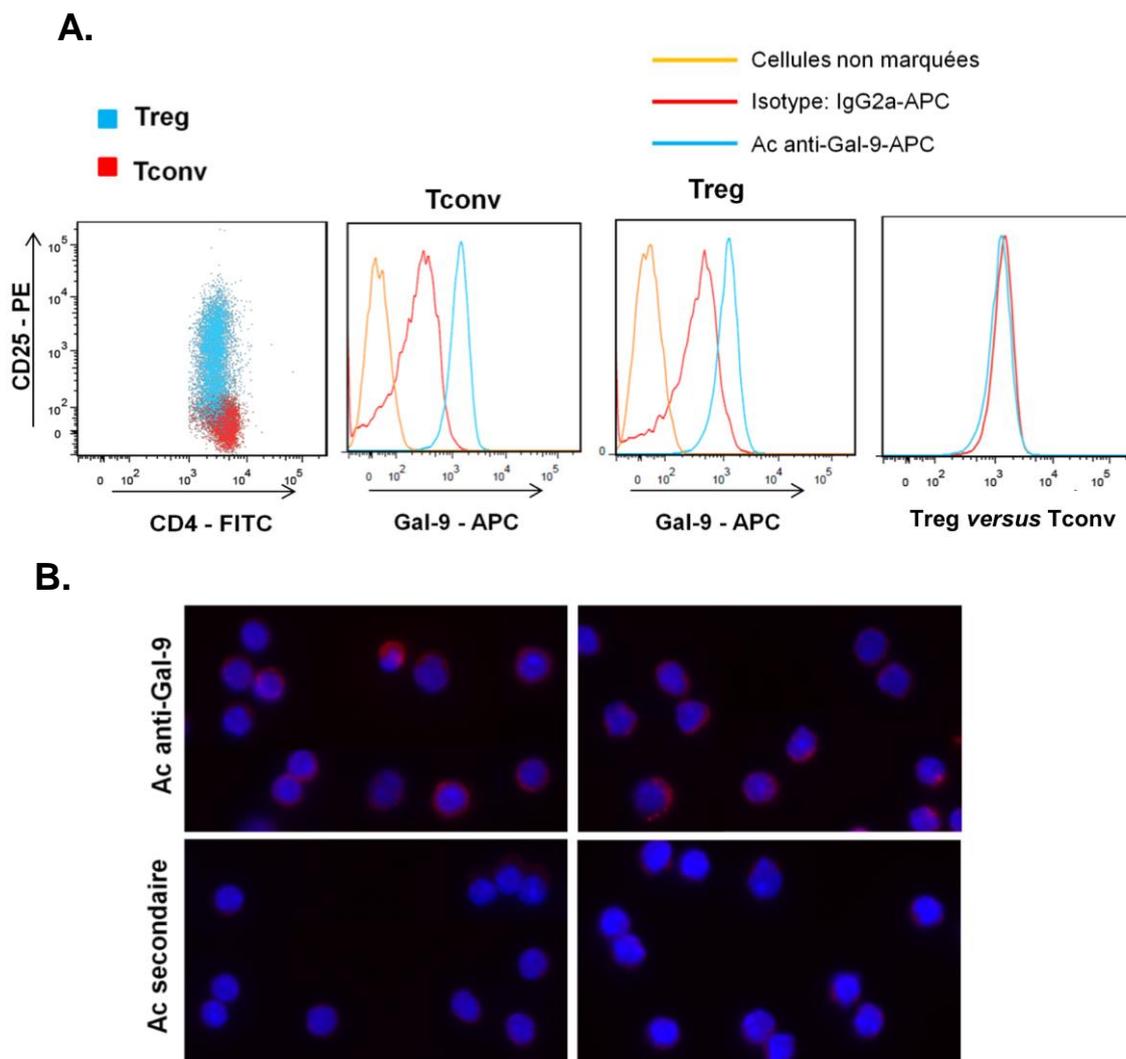


Figure 18 : Expression protéique de la Gal-9 dans les lymphocytes Tconv et Treg murins.

A. Marquage intracellulaire de la Gal-9 par cytométrie de flux. *Figures représentatives de 3 expériences indépendantes.* **B.** Marquage par immunofluorescence de la Gal-9 murine. *Figures représentatives de 2 expériences indépendantes*

D. Evaluation de la capacité du 1G3 à neutraliser la suppression de la galectine 9 recombinante murine sur les Tconv murins

Afin de tester si l'anticorps 1G3 était capable de neutraliser la Gal-9 murine, nous avons testé par des tests de prolifération sur les Tconv, la capacité de l'anticorps à inhiber le potentiel immunosuppresseur de la rGal-9 murine. Comme attendu, la Gal-9 recombinante murine (3 µg/mL) inhibe bien la prolifération des lymphocytes Tconv⁺ spécifiquement activés (anti-CD3-Anti-CD28) et ce de façon hautement statistiquement significative ($p < 0.0001$).

L'ajout du 1G3 permet de restaurer la prolifération des Tconv et donc d'inhiber l'effet de la Gal-9r également de façon hautement statistiquement significative ($p < 0.0001$). L'effet a été observé à 48 et 72h mais seul l'effet à 72h est présenté ici (**Figure 19**). Par contre, aucune restauration immunitaire n'est observée avec l'isotype contrôle (IgG1). Par ailleurs, on observe une légère diminution de la prolifération des Tconv qui est statistiquement significative ($p < 0.05$), à la fois avec 1G3 et son isotype contrôle.

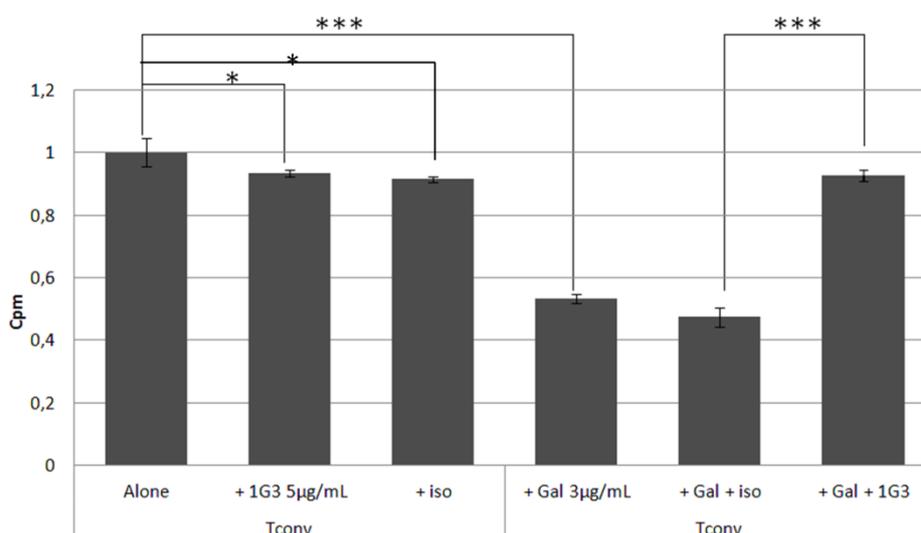


Figure 19 : L'anticorps anti-Gal9 inhibe l'immunosuppression induite par la rGal-9 murine. La prolifération des Tconv a été analysée après une culture de 72 heures par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats de prolifération obtenus sont présentés sous forme de prolifération relative après normalisation par rapport aux Tconv. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les calculs de la significativité ont été faits avec un t-test de Student. Histogramme moyenné sur 3 expériences indépendantes

E. Evaluation de la capacité du 1G3 à neutraliser la suppression des Treg murins sur les Tconv autologues

Les Tconv activés prolifèrent *in vitro* tandis que les lymphocytes Treg isolés *ex vivo* sont anergiques même après leur activation. Comme attendu, une co-culture des Tconv avec les Treg autologue (ratio 2 :1) montre que les Treg autologues induisent une diminution d'environ 40% de la prolifération des Tconv activés. Ainsi, le test de suppression par MLR conforte bien que les Treg murins spléniques isolés *ex vivo* et en condition d'activation possèdent une activité immunosuppressive.

L'ajout de l'anti-Gal-9 à cette co-culture permet de restaurer partiellement la prolifération indiquant ainsi une inhibition de la fonction suppressive des Treg.

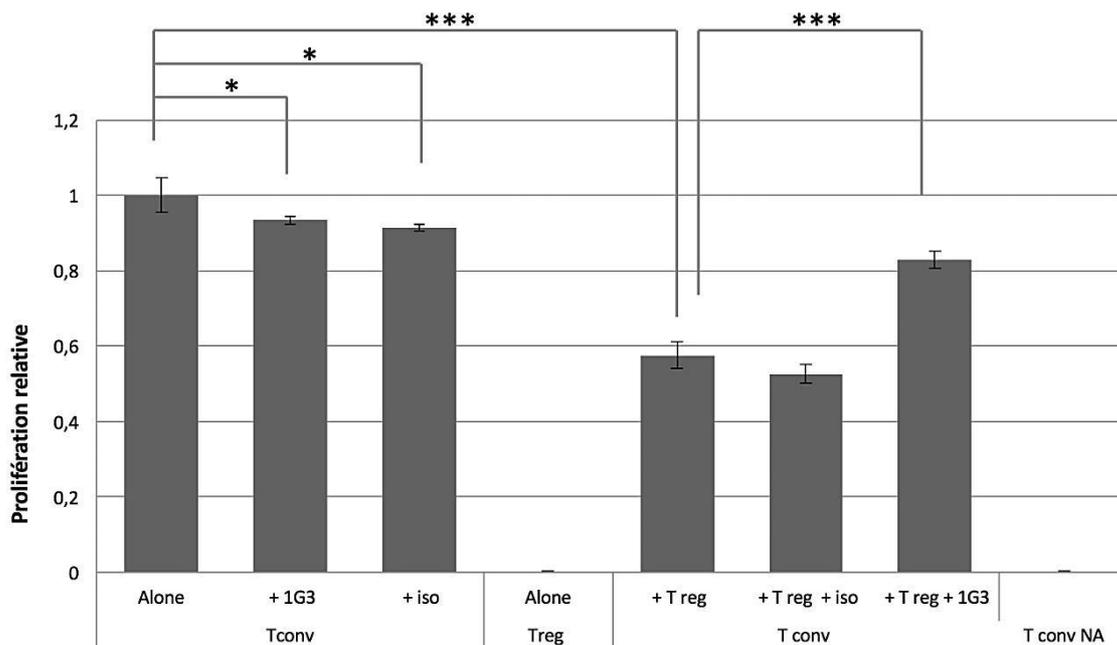


Figure 20 : Test de suppression par MLR. Effets de l'anticorps anti-Gal9 sur l'effet suppressif des Treg

Les Tconv ont été mis en culture pendant 72 heures avec ou sans Treg. La prolifération a été évaluée par incorporation de thymidine tritiée après 72h. Les résultats de proliférations obtenus sont présentés sous forme de prolifération relative suite à la normalisation par rapport aux Tconv. N=3 Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les calculs de la significativité ont été faits avec un t-test de Student

F. Evaluation de l'expression de la galectine 9 dans les lignées humaines de cancer pancréatique

Nous avons analysé par RT-QPCR l'expression des transcrits de Gal-9 dans les 4 lignées MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1 et Capan-2 et nous avons retrouvé un niveau d'expression similaires dans les 4 lignées étudiées (**Figure 21 A**).

Par la suite nous avons recherché l'expression protéique de la Gal-9 par immunofluorescence et nous avons observé par microscopie confocale une expression plus importante de la Gal-9 dans les MIAPaCa-2 et les PANC-1 comparativement au Capan-1 (**Figure 21 B**)

Afin de conforter ce résultat, l'expression de la Gal-9 a été évaluée par Western Blot dans les quatre lignées ((**Figure 21 C**).

Afin de qualifier et de quantifier l'isoforme de la Gal-9 exprimée par nos cellules, nous avons (i) utilisé une gamme de concentration avec 3 points de 0.1, 0.6 et 1 ng de l'isoforme M et (ii) déposé deux extraits protéiques, de 30 µg de cellules de carcinome de nasopharynx (C15), connu pour exprimer fortement l'isoforme L mais aussi les isoformes S et M de la Gal-9. Quantitativement, l'expression de la Gal-9 pour Capan-1 et Miapaca-2 est plus importante que l'expression pour PanC-1 et Capan-2. Grâce à la gamme réalisée, nous avons pu estimer respectivement une concentration de 0.19ng (Capan-1), 0.07ng (Capan-2), 0.14ng (MIAPaCa-2), 0.07ng (PANC-1) pour 20µg d'extrait protéique de chacune des lignées. Qualitativement, pour les 4 lignées nous observons un isoforme dont le poids moléculaire est supérieur à celui des isoformes S et M (respectivement de 34.7 et 35.9 Kda). Cet isoforme a en revanche le même poids moléculaire que l'isoforme L des extraits de C15.

Par ailleurs, nous avons également évalué par cytométrie de flux l'expression intracellulaire de la Gal-9 dans nos quatre lignées. Les résultats sont présentés en delta de MFI. La figure 19 D montre que les lignées MIAPaCa-2 et PANC-1 expriment significativement plus de Gal-9 que les lignées Capan-1 et -2. Et enfin, nous avons mesuré par ELISA le niveau de sécrétion de Gal-9 à partir du surnageant de cultures de chacune des lignées cancéreuses. La Gal-9 est produite par toutes les lignées cellulaires mais avec une sécrétion significativement plus importante pour MIAPaCa-2 et PANC-1 comparativement aux Capan-1 et Capan-2 (**Figure 21 E**)

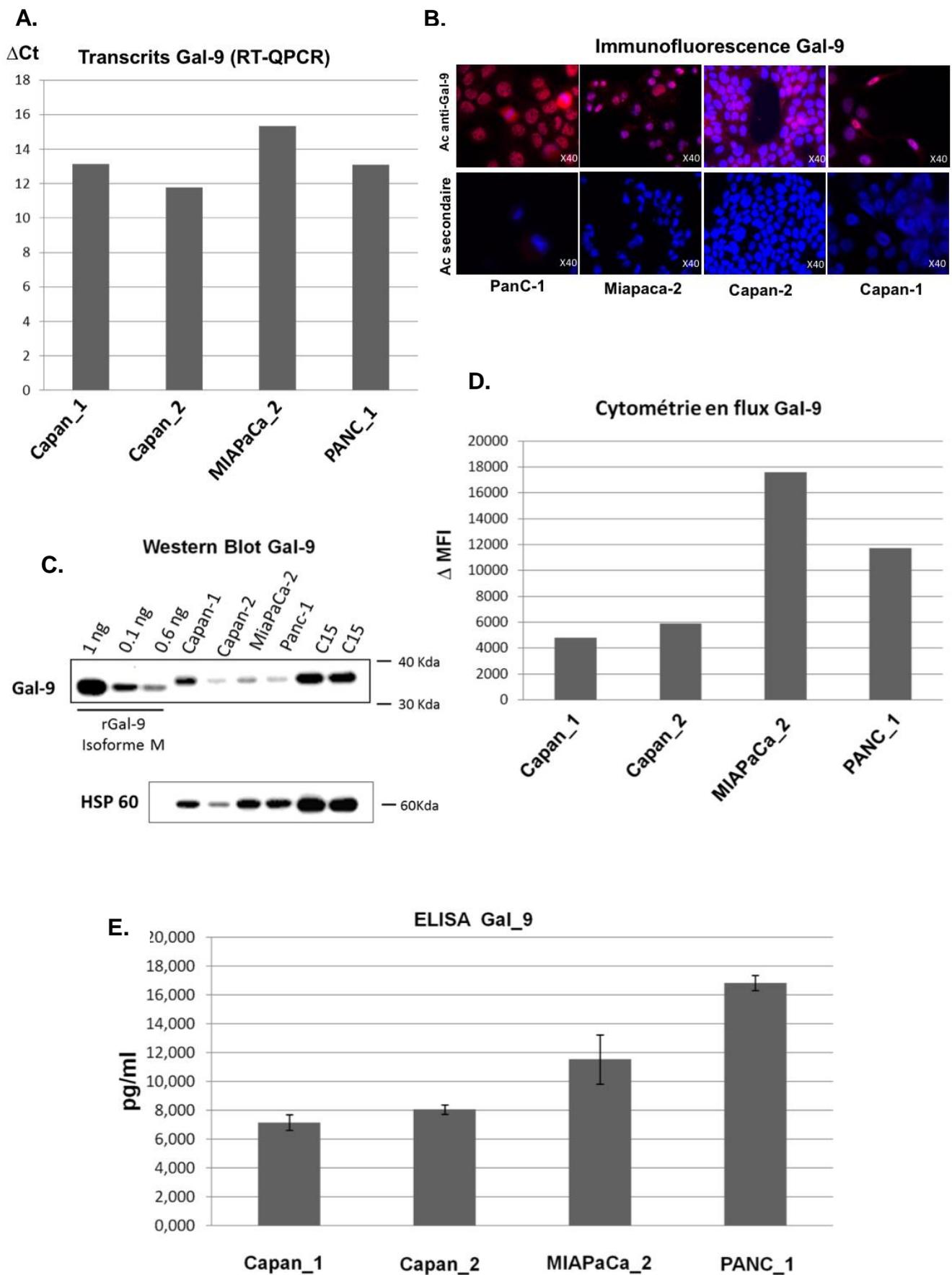


Figure 21 : Expression de la Gal-9 dans les 4 lignées de cancer pancréatique humain
A. Analyse par RT-QPCR des transcrits de la Gal-9 dans les quatre lignées. **B.** Immunofluorescence anti-Gal-9 dans les 4 lignées tumorales. **C.** Analyse de l'expression de la Gal-9 par Western Blot. **D.** Analyse de l'expression intracellulaire de la Gal-9 par les 4 lignées. **E.** Analyse de la sécrétion de la Gal-9 par ELISA

DISCUSSION GENERALE

Nous avons vu, en introduction, comment, les lymphocytes Treg exercent leurs effets supprimeurs sur les lymphocytes Teff responsables de la réponse anti-tumorale. Dans le but d'inverser la balance entre les lymphocytes Treg et lymphocytes Teff dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale, de nombreuses équipes ont cherché à développer des stratégies thérapeutiques visant à inhiber les lymphocytes Treg CD4+CD25+. Ces équipes ont cherché à cibler, avec des anticorps monoclonaux, des molécules de surface exprimées par les lymphocytes Treg, et notamment celles intervenant dans leur activité suppressive. Néanmoins, malgré l'effet prometteur de différentes molécules, un des obstacles à la déplétion spécifique des lymphocytes Treg est le manque de spécificité de leurs marqueurs de surface. En effet, les protéines de surface CD25, CTLA-4 ou GITR, exprimées par les lymphocytes Treg sont également des marqueurs d'activation des lymphocytes Teff. L'utilisation de ces protéines comme cibles pour la déplétion des lymphocytes Treg a donc eu pour effet indésirable l'élimination de nombreux lymphocytes Teff CD4+ et CD8+, indispensables à la régression tumorale. Dans ce contexte, il reste très difficile de cibler spécifiquement les lymphocytes Treg dans des protocoles thérapeutiques. L'originalité de l'immunothérapie anti-Gal9 développée au laboratoire tient dans sa capacité à cibler et à neutraliser les lymphocytes Treg sans affecter les lymphocytes Teff.

Plus particulièrement, il a été montré dans le laboratoire que la Gal-9, est sécrétée de manière spécifique par les lymphocytes Treg et non les Tconv lors de l'activation et que l'anticorps 1G3 dirigé contre la Gal-9 permet d'inhiber l'activité suppressive des lymphocytes Treg sans affecter les Teff (Brevet WO2015185875). Par ailleurs, il a été démontré que cet anticorps est capable de neutraliser la conversion des lymphocytes T CD4+ conventionnels en T CD4+ immunosupprimeurs induite par la Gal-9. Nous avons également montré que cet anticorps est capable, au-delà de la restauration de leur prolifération, de restaurer chez les PBMCs et les T CD4+ humains la sécrétion de cytokines de type Th1 avec une forte production d'INF γ et de TNF α conjugué d'une faible production de TGF β .

Quel rationnel y-a-t-il à évaluer le 1G3 dans le cancer du pancréas ?

Il a été décrit, dans le cancer du pancréas, une infiltration intra-tumorale de lymphocytes Treg et une polarisation Th2 des lymphocytes intra-tumoraux (TILs) et du TME (Fukunaga et al. 2004; Hiraoka et al. 2006). Les mécanismes à l'origine de cet infiltrat pro-tumoral ne sont pas encore totalement élucidés. En revanche, nous avons assisté très récemment à un changement spectaculaire concernant le rôle probable, ou démontré, de la Gal-9 dans l'échappement à la surveillance immunitaire pour toute une série d'affections malignes, et notamment pour le carcinome pancréatique (PAD)(Daley et al. 2017a; Daley et

al. 2016)(Sideras et al. 2017). Le PAD se développe à partir de lésions pré-néoplasiques, les PanIN, d'abord de bas grade (PanIN1), puis de haut grade (PanIN3) et chez 10 % des patients ces lésions se transforment en adénocarcinome. Fait intéressant, il a été décrit dans la littérature un infiltrat de Treg dans les PanIN-1 et une augmentation croissante dans les PanIN-2 et PanIN-3. L'observation inverse a été faite avec l'infiltrat de lymphocytes TCD8⁺(Hiraoka et al. 2006). Nous avons pu montrer, dans notre modèle murin, la forte expression de la Gal-9 au niveau de ces PanIN et l'augmentation de cette expression dans les PanIN de haut grade. En parallèle nous avons également montré une augmentation du taux de Treg infiltrant ces pancréas. Ces résultats sont encourageants quant à l'impact que peut avoir un anticorps ciblant et neutralisant la Gal-9 dans ce contexte.

Comment expliquer l'efficacité du 1G3, chez l'humain et chez la souris ?

Comme nous venons d'en discuter, afin d'évaluer l'impact de notre Anticorps l'1G3 dans le cancer du pancréas, nous avons choisi un modèle murin. Nous devons donc préalablement valider l'efficacité du 1G3 sur du matériel biologique murin. J'ai notamment pu montrer que le 1G3 pouvait cibler et neutraliser la Gal-9 murine et l'activité suppressive des Treg murin. De façon inattendue, nous avons observé une légère, mais significative, diminution de la prolifération des Tconv alors que cela n'avait pas été observé avec les Tconv humain. En revanche, nous n'avons pas retrouvé de différence de prolifération statistiquement significative que ce soit avec le 1G3 ou son isotype, ce qui suggère une toxicité aspécifique. Grâce à nos tests MLR, nous avons pu montrer que le 1G3 pouvait également cibler la Gal-9 et les Treg murins et donc être utilisé dans un modèle murin, pour neutraliser la Gal-9 tumorale et/ou l'activité suppressive des Treg. L'une des explications possibles de cette efficacité croisée entre les deux espèces est que le 1G3 cible la séquence d'acides aminés, TPAIPPMPHP chez l'homme et que la Gal-9 murine contient dans son domaine de liaison une séquence d'acides aminés, TPGIPVVYPTP, homologue à 69%. Chez l'homme, le 1G3 empêche la fixation de la Gal-9 sur son récepteur soit en modifiant la conformation de la Gal-9 soit en se fixant directement sur son site de liaison aux récepteurs. Des études cristallographiques et d'affinité (Biacore) permettront dans le futur de répondre à ces questions d'autant que tous les récepteurs de la Gal-9 ne sont pas encore connus (Su et al. 2011). En raison de l'homologie des séquences, il est probable que la neutralisation de la Gal-9 murine passe par les mêmes voies que celles de la Gal-9 humaine.

L'expression de la Gal-9 peut-elle être un marqueur d'agressivité dans le cancer du pancréas ?

En parallèle de ce travail de validation, j'ai également validé l'expression de la Gal-9 dans 4 lignées de cancer pancréatique humain. Nous avons observé, dans les lignées,

l'expression de l'isoforme L, mais pas des isoformes S et M. Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur les différentes isoformes de la Gal-9 et il semblerait que les isoformes puissent avoir des niveaux d'expression, des fonctions et des localisations différentes. Il est donc possible que les isoformes S et M soient également produites et /ou sécrétées dans d'autres conditions. De façon intéressante, j'ai pu montrer que les quatre lignées semblent toutes exprimer autant de Gal-9. En revanche nous montrons très clairement que les lignées PanC-1 et MIAPaCa-2 sécrètent plus de Gal-9 que les lignées Capan-1 et Capan2. Ces deux dernières sont des lignées présentant un phénotype dit « épithélial » moins agressif que l'on associe à un meilleur pronostic. En revanche les deux lignées sécrétant le plus de Gal-9 présentent un phénotype dit « quasi-mésenchymateux » associé à une plus grande résistance aux traitements et à une progression tumorale plus rapide (Collisson et al. 2011).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, plusieurs articles ont corrélé l'augmentation de l'expression de Gal-9 par la tumeur à un meilleur pronostic en lien avec la diminution des métastases. En fait, la description de la Gal-9 comme facteur apoptotique a dominé la littérature pendant longtemps (Heusschen, Griffioen, et al. 2013). En tenant compte de cette information et avant de comprendre son rôle immunosuppresseur, il était normal d'imaginer que l'expression de la Gal-9 puisse être diminuée dans les cellules cancéreuses. Par exemple, il a été montré dans le mélanome qu'une augmentation de l'expression intra-tumorale de Gal-9 aux premiers stades était associée à une diminution des métastases et était donc corrélée à un meilleur pronostic. En revanche, une autre étude dans le mélanome a clairement montré que l'augmentation du taux de Gal-9 circulant était corrélée à un mauvais pronostic (Kageshita et al. 2002; Kobayashi et al. 2010). L'explication potentielle serait que les tumeurs utilisent la Gal-9 de deux manières différentes pour favoriser leur croissance : à l'intérieur de la tumeur, la Gal-9 est sous exprimée car il s'agit d'un facteur apoptotique, mais à la périphérie de la tumeur la Gal-9 peut être directement sécrétée pour créer un environnement pro-tumoral en inhibant la réponse immune. Cette théorie est en fait soutenue par un travail réalisé dans le cancer bronchique non à petites cellules, dans lequel les auteurs ont constaté que la diminution des niveaux intra-tumoraux de Gal-9 était couplée à une augmentation de Gal-9 dans le tissu péri-tumoral, favorisant ainsi la théorie de l'expression localisée de la Gal-9 dans les tumeurs (Schulkens et al. 2014b).

Quel est le meilleur modèle pour l'évaluation d'une immunothérapie dans le cancer du pancréas ?

Le choix du modèle est extrêmement important en immunothérapie. Pour rappel la mauvaise connaissance des modèles murins a conduit à remettre en question la théorie de l'immunosurveillance tumorale pendant plus de 20 ans (Stutman 1974; Stutman 1979;

Rygaard & Povlsen 1976; Dighe et al. 1994; Shankaran et al. 2001; Miller et al. 1963). Il est donc très important de savoir quelles informations peuvent être obtenues à partir des modèles disponibles. Afin d'évaluer notre stratégie de neutralisation de la Gal-9, nous disposons du modèle murin transgénique d'adénocarcinome pancréatique (souris KC). Au laboratoire, nous proposons un autre modèle de souris immunodéficientes humanisées suite à l'injection de PBMCs humains et xénotransplantées avec une tumeur d'adénocarcinome pancréatique. Une partie de la preuve de concept du 1G3 a été établie en montrant l'efficacité du 1G3 dans un modèle de souris immunodéficientes humanisées et xénotransplantées avec une tumeur de carcinome du nasopharynx. Ainsi, il a été possible de recréer au laboratoire un nouveau modèle murin humanisé xénotransplanté cette fois avec des cellules tumorales d'ADKP (Miapaca-2).

Il est clairement montré que l'échec des traitements actuels dans l'ADKP n'est pas seulement lié à la tumeur elle-même, mais aussi et surtout à son microenvironnement. Ainsi, nous devons avoir un modèle le plus proche possible du cancer humain en termes de structure histologique (présence de PanIN) et d'infiltration lymphocytaire. Chez l'humain la mutation ponctuelle de l'oncogène Kras confère un gain de prolifération non contrôlée pour la cellule cancéreuse qui acquiert ainsi un pouvoir oncogénique amplifié. Cette mutation est retrouvée dans 75 à 95 % des cancers du pancréas, mais aussi dans les lésions précancéreuses de type PanIN. Ces lésions, ainsi que le microenvironnement tumoral, ont été parfaitement reproduits dans des modèles transgéniques murins à partir de la mutation de Kras^{G12D} (modèle KC). Au final cela conduit à la formation des PanIN similaires aux PanIN humaines du point de vue des voies de signalisation activées et des protéines exprimées. Par la suite 10 % de ces souris développeront naturellement un adénocarcinome. Enfin, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, mutés dans la pathologie humaine, comme TP53, SMAD4, et INK4A/ARF, ou l'injection d'un agent inflammatoire (céruléine), conduit au développement, en quelques mois, de tumeurs invasives entourées d'un stroma dense (modèle KPC). Ces deux derniers modèles (KC et KPC) sont particulièrement réalistes et reflètent l'ensemble de la physiopathologie (moléculaire, histologique et immunitaire) de l'AKP. Sur la base de ce raisonnement, ce modèle de souris pourrait donc nous permettre d'évaluer avec précision l'impact de notre immunothérapie. Chez l'homme les monothérapies et les bithérapies par anti-CTLA-4 et anti-PD-1 n'ont pas permis de restaurer la réponse immune antitumorale dans l'ADKP (Winograd et al. 2015). De façon similaire chez les souris KPC, ces stratégies d'immunothérapies n'ont pas fonctionné. Ce modèle reproduit donc fidèlement la manque d'efficacité clinique observé à ce jour avec les anti-PD-1 et les anti-CTLA-4 dans l'ADKP humain. En effet, il reproduit fidèlement la complexité du microenvironnement y compris l'immunosuppression multifactoriel retrouvée dans l'ADKP humain (M2, Treg, MDSC, LT $\gamma\delta$, cellules mésenchymateuses...).

Les données cliniques actuelles montrent très clairement que dans ce contexte, la neutralisation d'une voie unique d'immunosuppression n'est pas suffisante pour restaurer la réponse immune. Ainsi, il semble nécessaire de développer des stratégies combinatoires en ciblant plusieurs voies d'immunosuppression. La combinaison d'un anti-CD40 ou d'un anti-CXCR2, ciblant respectivement les M2 et les MDSC, avec un anti-PD-1 et/ou un anti-CTLA4 ont permis d'améliorer la survie globale des souris KPC (Winograd et al. 2015)(Steele et al. 2016).

Dans ce contexte compliqué, nos objectifs sont (i) d'évaluer l'impact de l'1G3 sur la neutralisation de l'activité suppressive des Treg dans l'ADKP (ii) d'évaluer l'impact de la neutralisation de la Gal-9 dans l'ADKP et (iii) enfin d'évaluer son impact sur la progression tumorale.

Ce modèle très agressif et réaliste, est adapté pour confirmer le rôle des Treg (infiltrant et circulant) et de la Gal-9 dans le développement de l'ADKP. Ces souris peuvent également constituer un très bon modèle prédictif de réponse pour le développement de stratégies combinatoires puissantes. En revanche, les données de la littérature montrent que ce modèle n'est pas le plus adapté pour évaluer l'impact d'une immunothérapie seule et de son mécanisme d'action (Winograd et al. 2015)(Steele et al. 2016)(Daley et al. 2017b)(Lu et al. 2017). Hormis la puissante immunosuppression, il existe une relative hétérogénéité dans le développement des lésions cancéreuses et ensemble ces paramètres suggèrent qu'il sera très difficile de préjuger de l'efficacité de l'1G3 seul dans ce modèle. La mise en place d'un modèle murin reconstitué par des PBMC humains permet de contrôler précisément le taux de LTreg et ainsi d'évaluer l'impact de notre immunothérapie sur une seule composante de l'immunosuppression et au final de pouvoir proposer ultérieurement la stratégie combinatoire la plus efficace dans le modèle KC ou KPC et chez l'homme.

D'autres cibles potentiel du 1G3 dans le cancer du pancréas ?

Nous avons discuté du potentiel de cette immunothérapie en montrant sa capacité à restaurer l'immunité anti-tumorale *via* l'inhibition de l'activité suppressive des Treg. Très récemment, il a été montré, dans le cancer du pancréas, que d'autres populations immunitaires pouvaient inhiber la réponse anti-tumorale *via* la Gal-9. Ainsi, il a été montré récemment que d'une façon inhabituelle, les T $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$ T), représentant jusqu'à 40 % des TILs dans ce contexte, agissent comme des régulateurs centraux de l'activation des cellules T effectrices *via* leur forte expression de point de contrôle immunitaire, PD-L1 et Gal-9. En outre, il a été décrit que le blocage ou l'épuisement des T $\gamma\delta$ conduit à l'augmentation **(i)** de l'infiltration tumorale par les lymphocytes $\alpha\beta$ T et à **(ii)** la polarisation Th1 des TILs. L'utilisation d'un anticorps ciblant la Gal-9 a conduit à la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, ralentissant ainsi la progression tumorale. Fait intéressant, il a été montré que les T $\gamma\delta$

infiltrants expriment FOXP3⁺ alors que l'on ne retrouve pas ce phénotype en condition normal. La forte expression du TGF- β dans le microenvironnement tumoral pourrait induire l'expression de FOXP3 et conférer un phénotype régulateur pro-tumorale chez les T $\gamma\delta$ T dans ce contexte.

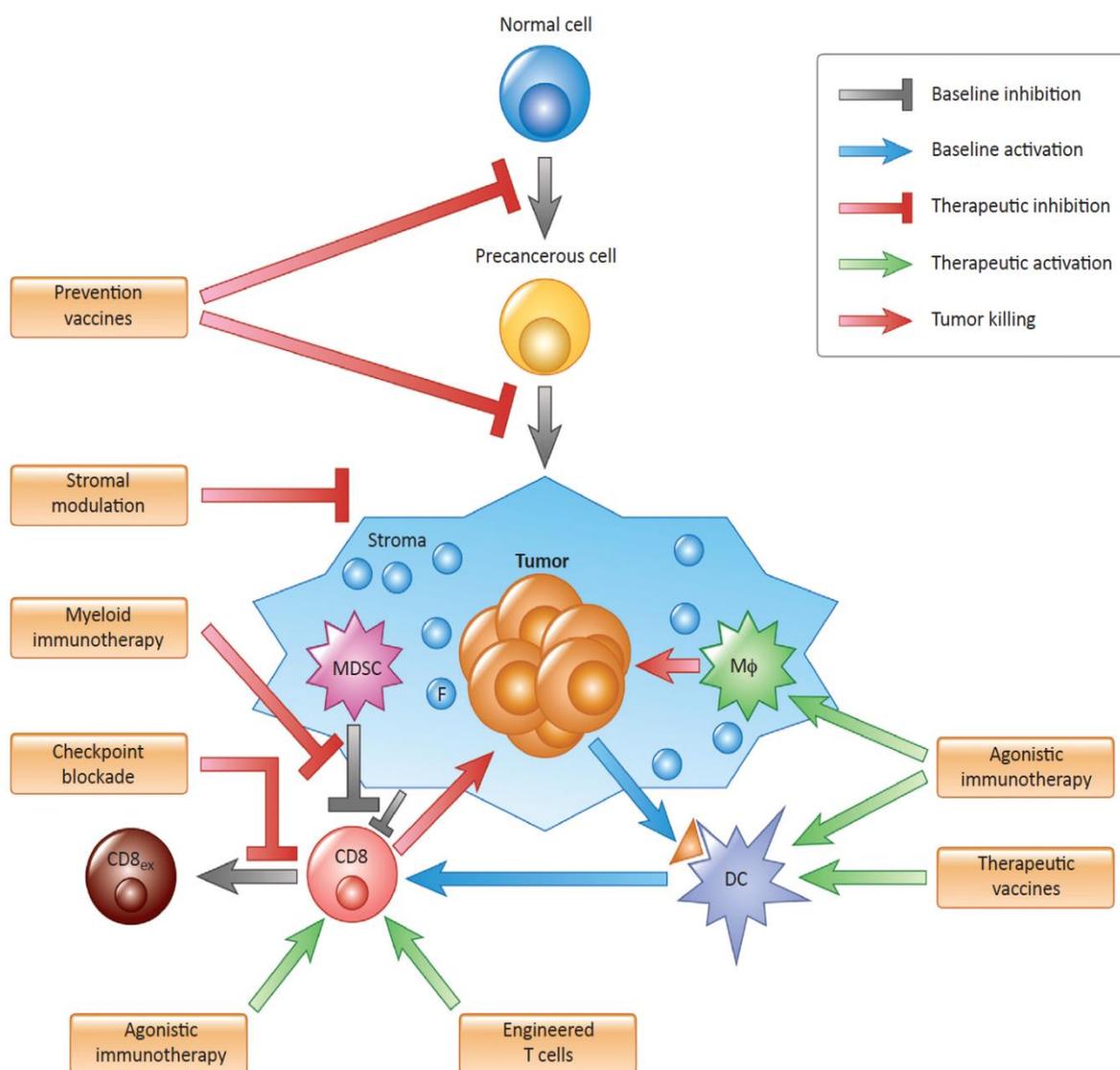
Il a également été montré dans une autre étude que la Gal-9 est un ligand fonctionnel de la dectine1, une lectine de type C exprimée sur les macrophages et décrite dans la défense antifongique. Les auteurs ont trouvé que l'interaction Gal-9/Dectin-1 induisait la transformation des macrophages infiltrants en macrophage tolérogène de type M2 (Daley et al. 2017b). Ainsi, on pourrait supposer que les M2, les T $\gamma\delta$ pourrait être de nouvelles cibles pour notre Ac anti-Gal-9.

Quelle stratégie combinatoire peut-on proposer dans l'ADKP et quel serait la place d'un anti-Gal-9 dans une telle stratégie ?

Les immunothérapies ciblant les points de contrôles immunitaires, comme le CTLA-4 ou PD-1 provoquent des réponses objectives dans de nombreux types de tumeurs y compris dans des cancers considérés comme non-immunogènes (Borghaei et al. 2015; Weber et al. 2015). Dans l'ADKP, seulement 1 patient sur 27 a répondu à l'ipilimumab (anti-CTLA-4)(Royal et al. 2010b) et 0 patients sur 14 ont eu une réponse objective à l'anti-PDL-1 (Brahmer et al. 2012b) malgré la surexpression de PD1 et de CTLA-4.

Il est régulièrement décrit que la surexpression de PD-1 ou du CTLA-4 ne permet pas de prédire la réponse à une immunothérapie. En revanche, les meilleures réponses aux anti-PD-1 et aux anti-CTLA-4 ont été obtenues dans des tumeurs solides (mélanomes et cancers pulmonaires) caractérisées par un nombre élevé de TILs avant le traitement (Taube et al. 2014). Dans l'ADKP, au fur et à mesure que les lésions pancréatiques progressent, le taux de lymphocytes T CD8⁺ infiltrant diminue alors que celui des Treg augmente (Hiraoka et al. 2006). Ainsi l'ADKP, est couramment considéré comme un cancer peu immunogène malgré la forte expression de CTLA-4 et de PD-1 (Zhang et al. 2017; Loos et al. 2008). On peut donc expliquer l'échec des anti-PD-1 et des anti-CTLA-4 dans ce contexte non pas, par l'absence de reconnaissance et d'activation du SI sur les cellules, mais par une autorégulation excessive et un micro environnement très immunosuppresseur. Cette théorie est parfaitement corrélée avec la forte prévalence de leucocytes immunosuppresseurs (Treg, MDSC, M2) et avec la surexpression des molécules co-inhibitrice (PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3) qui témoigne d'une réaction immunitaire sous-jacente. Cette observation est fondamentale car elle suggère que le SI n'est pas ignorant de l'ADKP mais est instruit par la tumeur de ne pas l'attaquer. L'échec des monothérapies dans l'ADKP est le témoin direct d'une immunosuppression multifactorielle qui ne peut pas être levée par l'inhibition d'une seule composante. Il est donc nécessaire de pouvoir définir une stratégie combinatoire

s'articulant autour de trois axes majeurs de l'activation lymphocytaire : (i) stimuler l'immunité adaptative (ii) briser la tolérance systémique et (iii) augmenter l'immunogénicité tumorale.



Trends in Cancer

Figure 22 : Mécanismes des immunothérapies dans l'ADKP (Morrison et al. 2018)

Représentation graphique de la réponse immunitaire dans l'ADKP indiquant où chaque type d'immunothérapie agit. F : fibroblaste ; MDSC : cellules myéloïdes suppressives, Mφ : macrophage ; DC : cellule dendritique, CD8 : LT CD8 ; CD8_{ex} : LT CD8 épuisée.

Ainsi, comme nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit, de nombreuses immunothérapies permettent de stimuler l'immunité adaptative, c'est le cas des anti-PD-1/PD-L-1, des anti-CTLA-4 mais aussi de l'anti-Gal-9, de l'anti-TIM-3, de l'anti-LAG-3 et de l'anti-TIGIT. Toutes ces thérapies peuvent être théoriquement combinées entre elles mais le choix doit être réfléchi en fonction de deux paramètres : La tolérance et l'orientation de la RI.

Concernant la tolérance il a été observé une très forte toxicité lors de l'association d'un anti-CTLA-4 et d'un anti-PD-1. Cette toxicité est majoritairement attribuable à l'activation anarchique des LT puisque cette stratégie brise dans un premier temps la tolérance périphérique (anti-PD-1) et facilite l'activation précoce des lymphocytes T naifs (anti-CTLA-4) dans un deuxième temps. Afin de limiter la toxicité, il est nécessaire d'évaluer des combinaisons agissant sur les stades tardifs de l'activation lymphocytaires et d'éviter une activation précoce des lymphocytes T. Concernant la Gal-9 elle est peu ou pas exprimé à l'état basal et son expression est bien induit dans un état inflammatoire. A l'inverse des modèles murins CTLA-4 KO, les modèles murins Gal-9 KO ne présente pas de signe majeur de toxicité. Ensemble ces données suggèrent un bon profil de tolérance pour l'anti-Gal-9. L'autre point crucial à évaluer est la façon dont nous voulons réactiver la réponse immune. Deux stratégies sont possibles et complémentaires : « activer les effecteurs » et « inhiber les inhibiteurs ». Ainsi, il est vraisemblable d'imaginer qu'une immunothérapie anti-Gal9 dans le contexte de l'ADKP permettra, de briser l'inhibition médié par les Treg, et de réinstaller la réponse immune. Il est logique de supposer que la force de cette immunothérapie serait sa complémentarité avec les anti-PD1 en permettant dans un premier temps le déverrouillage du SI *via* l'anti-Gal-9, et dans un second temps un « boost » de la réponse immune *via* un anti-PD1. L'association avec un anti-Tim-3, LAG-3 ou TIGIT pourrait être discuté au cas par cas en fonction de l'infiltrat lymphocytaire et des données de toxicité. Au stade actuel, il est nécessaire de maîtriser l'impact de ces immunothérapies sur le SI pour comprendre comment elles modulent la réponse dans la tumeur et définir ainsi la meilleure stratégie combinatoire.

Enfin, étant donné la redondance des voies de l'immunosuppression et le rôle majeur des M2 et des MDSC, il semble nécessaire de compléter les stratégies d'activations lymphocytaires avec des stratégies ciblant plus spécifiquement les M2 et les MDSC (anti-CCR2, antiCD40, iCSF1R). De façon intéressante les données récentes de la littérature suggèrent qu'un anti-Gal-9 pourrait neutraliser l'activité suppressive des M2 et des MDSC (Daley et al. 2017b; Zambirinis et al. 2016).

Au-delà des stratégies de réorientation des acteurs de l'immunité il est nécessaire de créer un microenvironnement favorable à la réponse immune. L'importance du métabolisme tumorale est de plus en plus en avant pour expliquer le phénotype immunosuppressif des

leucocytes dans certaines tumeurs. La consommation en tryptophane, la production de lactate et de kynurénine *via* les enzymes IDO/TDO2 ou les surexpressions des canaux transporteur de lactate : MCT1 joue un rôle direct dans l'immunosuppression. Les premiers essais avec les inhibiteurs d'IDO dans d'autres types de cancers ont montré une très bonne tolérance et suggèrent un effet synergique avec les anti-PD-1. En association avec les stratégies combinatoires ces inhibiteurs peuvent agir comme des adjuvants d'immunothérapies pour créer un microenvironnement favorable en levant l'immunosuppression systémique.

Enfin, il est nécessaire de faciliter l'orientation de la réponse immune vers les cellules tumorales. L'utilisation concomitante d'une stratégie combinatoire avec des vaccins ciblant des antigènes tumoraux (MUC1, mesotheline, CEA, Ras) permettrait de focaliser la réponse immune sur les cellules tumorales. Ces vaccins ont montré un profil de tolérance favorable mais une efficacité limitée. En effet, il a été montré chez ces patients pré-traités ou en progression la présence d'amas lymphocytaires inactivés. Ces données fournissent un puissant rationnel pour évaluer une stratégie combinatoire d'inhibiteurs de *checkpoint* dans les protocoles de vaccination et espérer ainsi restaurer la RI.

Quel est la place des stratégies actuels de radio-chimiothérapie avec l'immunothérapie ?

Dans un premier temps l'avènement de l'immunothérapie a semblé concurrencer la chimiothérapie. Comment combiner des stratégies de chimiothérapies le souvent extrêmement lymphodéplétive avec des immunothérapies ? Récemment des études ont montré que certaines chimiothérapies, en particulier les anthracyclines (doxorubicine, mitoxantrone etc.) mais aussi le cyclophosphamide et l'oxaliplatine, sont capables d'induire une mort cellulaire dite « immunogénique ». Cette mort cellulaire se caractérise par un haut potentiel d'activation du SI notamment *via* le relargage ou l'exposition de DAMPs (HMGB1, ATP, calréticuline etc.). De façon très intéressante le Livatag[®], une formulation nanoparticulaire de doxorubicine, est actuellement évalué dans l'ADKP humain. Le laboratoire Onxeo, qui commercialise le Livatag[®], affirme avoir montré qu'en combinaison avec des inhibiteurs de « check point », il présente une efficacité combinée supérieure à celle de chacun des deux agents seuls dans des modèles orthotopiques murins de cancer du pancréas (France et al. 2017). Ainsi, l'association de chimiothérapie peut faciliter l'activation et l'orientation de la RI comme pourrait le faire la vaccination.

Cette notion de mort immunogéniques fait également évoluer la façon de percevoir la radiothérapie. En effet, doit-on irradier massivement pour détruire les cellules tumorales ou doit-on procéder à une irradiation douce afin de ne pas dénaturer les antigènes et faciliter la réponse immune lors de l'utilisation d'immunothérapie ?

Depuis l'avènement des ICI, l'étude de l'impact des différentes stratégies d'irradiations sur la RI anti-tumorale semble indispensable pour offrir les meilleures stratégies d'irradiation aux patients. Ainsi, l'étude RADVAX évalue actuellement un protocole de radiothérapie hypo fractionnée en combinaison avec le pembrolizumab dans l'ADKP.

APRÈS-PROPOS

Jusqu'à aujourd'hui le seul traitement curatif du cancer était la chirurgie, la chimiothérapie cytotoxique étant le plus souvent un traitement palliatif. L'immunothérapie est un bouleversement dans le sens où elle est la seule à pouvoir offrir des réponses durables. Cette nouvelle approche thérapeutique est non seulement élégante mais pourrait également devenir « universelle ». Cependant, les résultats spectaculaires sont à pondérer par l'absence totale de réponse d'un grand pourcentage de patients. Il est nécessaire de comprendre « pourquoi » certains patients répondent et d'autres non. Bien que des hypothèses soient formulées, il est aujourd'hui impossible d'identifier précisément les populations qui répondront ou non à l'immunothérapie. Les données massives fournies par la multiplication des essais cliniques, les nouvelles méthodes de séquençage et de spectrométrie devraient permettre de répondre à ces questions. J'aimerais également souligner qu'au même titre que l'immunothérapie, les travaux sur le métabolisme des cellules tumorales prennent aujourd'hui une ampleur considérable et ouvre peut-être la voie à de nouvelles approches dans le traitement du cancer.

Le pharmacien en tant que responsable des médicaments qu'il délivre doit pouvoir informer à l'hôpital mais aussi en ville autour de ces médicaments en passe de devenir des « standards ». En outre, ces nouveaux traitements innovants qui semblent loin de la réalité du comptoir de l'officine sont en fait très présents. Par ailleurs, la chronicisation du cancer soulève la question de la gestion des effets indésirables à moyen et long terme. Le pharmacien en tant que spécialiste du médicament est parfaitement légitime pour communiquer sur les effets secondaires liés à une immunothérapie. Le développement des systèmes de communication et de partage avec le médecin spécialiste va vraisemblablement se renforcer dans les années à venir.

Les stratégies combinatoires vers une toxicité financière ?

Le développement rapide des connaissances et les applications cliniques qui en découlent doivent conduire la réflexion du « juste prix de l'innovation et des traitements » au cœur de la société. Il s'agit d'une vraie décision de santé publique et en ce sens le pharmacien doit un être un acteur incontournable dans ce débat.

En quelques chiffres, près de 1 français sur 20 ont eu ou vivent avec un cancer. Le coût des médicaments anticancéreux était estimé à 3,2 milliards d'euros en 2017 et le surcoût attendu lié aux nouveaux traitements anticancéreux est estimé entre 1 à 1,2 milliards par an (Ibrah et al. 2017). Brièvement en France, pour un nouveau médicament, la Commission de la transparence (CT) au sein de l'Haute Autorité de santé (HAS) juge d'une part le service médical rendu (SMR) qui évalue les propriétés intrinsèques du médicament et d'autre part l'amélioration du service médical rendu (ASMR). L'avis de la CT est transmis au ministre de la Santé qui prend la décision de suivre ou non l'avis rendu par le CT pour le

remboursement (Guillot 2017). En fonction de l'ASMR, le Comité économique des produits de santé (CEPS) va fixer le prix du médicament par rapport à celui des concurrents déjà existants.

Aujourd'hui le coût d'un traitement par ipilimumab dans le traitement du mélanome métastatique, est de 56 000 € par patient (quatre perfusions). Les inhibiteurs de PD-1 ont une durée de prescription non-limitée sauf par l'échec thérapeutique ou l'intolérance. Le pembrolizumab, anti-PD-1 utilisé actuellement dans le mélanome ou le cancer du poumon, coûte près de 84 000 € par an pour un malade (Ifrah et al. 2017). Les prochaines années pourraient être marquées par (i) l'approfondissement des stratégies d'immunothérapies (CAR-T, vaccins, nouveaux inhibiteurs de « checkpoint », inhibiteurs d'IDO, activateurs d'APC, agonistes de costimulation), (ii) l'extensions des indications, (iii) des associations et (iv) de nouvelles localisations tumorales. En parallèle ces traitements sont de plus en plus coûteux, à titre d'exemple la stratégie par transfert adoptif de CAR-T, très efficace en hématologie, est actuellement commercialisée à 400 000 euros. Il est donc difficilement envisageable pour l'Etat de pouvoir supporter (i) l'augmentation considérable des prix, (ii) l'extension des indications (iii) la généralisation de stratégies combinatoire et (iv) l'augmentation de la durée du traitement (chronicisation des maladies autrefois mortelles).

La recherche contre le cancer est un domaine très dynamique dans lequel la compréhension de la physiopathologie embraye rapidement sur l'utilisation clinique de stratégie thérapeutique. Ainsi, l'Inca a recensé 89 molécules anticancéreuses susceptibles de recevoir une AMM et un remboursement dans les deux prochaines années (Ifrah et al. 2017). Il s'agit donc de permettre l'accès de ces stratégies innovantes dans un contexte de « contrainte forte sur les comptes sociaux » (Desclerc-Dulac et al. 2016). Il y a toujours eu des traitement coûteux et innovants mais il existait un équilibre qui permettait à tous les patients d'être traités. Une analyse du système de santé de plus 190 pays publiée en 2016 dans le journal « The Lancet » soulignait que la France était l'un des seuls pays au monde à conjuguer à la fois l'excellence de l'accès aux nouveaux médicaments et l'excellence de la prise en charge social (Barber et al. 2017). Aujourd'hui, l'arrivée massive de traitements innovants met réellement en danger l'égalité d'accès aux traitements en France. Fort heureusement, les pays de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques : 35 Pays, 20 % de la population mondiale) représentent 80 % du marché des industries pharmaceutiques et l'Europe constitue 25 % de ce marché, laissant ainsi la place pour la négociation (Desclerc-Dulac et al. 2016). Afin d'éclairer la situation dans le cancer, prenons l'exemple récent du Sovaldi dans le traitement de l'hépatite C.

Le prix du Sovaldi a été fixé à 41 000 € pour trois mois de traitement pour une pathologie qui touche près de 300 000 personnes en France. Selon certaines associations ce consensus a été fait au mépris de l'égalité d'accès aux soins. En effet seul les patients au

grade de fibrose la plus élevée, ont pu accéder au traitement et c'est seulement sous la pression d'associations qu'un arrêté ministériel a permis 1 an plus tard d'élargir le cycle des potentiels bénéficiaires. La question posée par Madame Desclerc-Dulac, co-présidente du Collectif Interassociatif Sur la Santé (CISS) est alors « Doit-on sélectionner les malades pour que la dépense reste compatible avec la contrainte budgétaire ? ». D'après la ministre de la santé « les patients doivent avoir accès aux traitements dont ils ont besoin y compris les plus innovants sur l'ensemble du territoire et sans avoir à se soucier des questions financières » (MS Touraine, 2017). L'instauration du statut d'ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) pour certains médicaments a permis d'assurer jusque-là l'accès à des médicaments innovants. Malgré cela il n'existe pas, aujourd'hui, de consensus sur la question du juste prix de l'innovation (MS Touraine, 2017) et l'exemple du Solvadi illustre la menace que ces prix très élevés représentent pour l'accès universels aux soins en France.

Les industries pharmaceutiques leader dans l'onco-immunologie comme Novartis, BMS, Merck et Roche semblent particulièrement impliquées dans l'accessibilité aux médicaments en France et se définissent eux-mêmes comme des « acteurs de santé ». Ainsi l'objectif clairement affiché de Roche est que « les patients en France continuent à avoir accès aux médicaments dont ils ont besoin ». BMS au travers de sa fondation finance des projets « scientifiques et philanthropiques au service du patient dans le domaine de l'immuno-oncologie ». Toutes les conditions semblent donc être réunies pour que les industries pharmaceutiques et l'Etat trouvent les solutions nécessaires pour maintenir les meilleurs traitements et l'égalité de l'accès aux soins en France. Il s'agit donc de trouver des solutions pour permettre aux patients d'avoir accès à des thérapies, certes très innovantes, mais qui malheureusement sont loin d'avoir une efficacité chez tous les patients.

Proposition 1 : En France le QALY (quality-adjusted life year, « année de vie pondérée par la qualité ») n'est presque pas utilisé comme moyen de régulation à cause de la fragilité des analyses microéconomiques. Dans certains pays, le QALY est clairement identifié et permet d'imposer une limite au-delà de laquelle le prix serait insupportable pour la collectivité (autour de 50 000 € par an en Angleterre et de 50 000 à 100 000 € par an aux États-Unis. Le CEPS en partenariat avec les différentes industries pharmaceutiques et l'HAS pourrait définir un budget par pathologie sur la base du QALY rapporté au PIB. Il est actuellement évalué la possibilité de créer une agence européenne de fixation des prix.

Proposition 2 : Plusieurs associations et notamment La Ligue contre le cancer demandent que les coûts soient alignés sur le coût réel de la recherche dépensée par les laboratoires et cette possibilité semble déjà avoir l'accord du LEEM (Les Entreprises du médicament). En effet, il est contestable d'imputer les frais de recherche sur le prix du médicament lorsque l'investissement du laboratoire consiste uniquement à racheter la licence. C'est le cas par

exemple du paclitaxel qui est issu de la recherche du National Cancer Institute aux États-Unis ou du docétaxel issu de la recherche du CNRS en France.

Proposition 3 : Aujourd'hui, le prix est fixé en fonction de l'intérêt social et pas du coût de production. Il est en effet nécessaire de récompenser un produit utile à la société même s'il coûte moins cher à produire. Dans le cas précis de l'immunothérapie, comment fixer le prix d'un médicament, inefficace en monothérapie, mais très efficace en association avec une autre immunothérapie ? Les valeurs d'efficacité d'un médicament peuvent être très différentes selon les indications, les populations et les associations. Il serait donc judicieux de pouvoir négocier les prix par indications.

Proposition 4 : Une solution qui semble particulièrement discutée dans le cancer serait la mise en place d'un remboursement conditionné à l'efficacité individuelle. Cette dernière mesure permettrait aux patients d'accéder à l'innovation thérapeutique tout en maîtrisant les coûts.

Les arguments les plus faciles pour baisser le coût des médicaments seraient d'expliquer que les industries pharmaceutiques se portent bien, qu'elles enregistrent plus de bénéfices (112 milliards en 2016) que les industries du pétrole (110 milliards) et du luxe (20 milliards). Bien que les industries pharmaceutiques se définissent comme des acteurs majeurs de la santé, elles restent des entreprises avec des objectifs de rentabilité économique. Comme le souligne Pierre-Yves Geoffard, directeur de la Paris School of Economics, les industries pharmaceutiques génèrent de l'information et tentent régulièrement de convaincre les différents acteurs que leurs médicaments sont utiles et efficaces en dépensant une très grande partie de leur chiffre d'affaire dans le marketing. Ainsi en 2013, sur 50 milliards de dollars de revenus, Roche consacrait 18 milliard de dollars à une activité de production et de diffusion de l'information.

En fait, il n'y a aucun intérêt à opposer l'industrie pharmaceutique à ses contradictions car nous avons besoin de leur puissance financière pour une partie de la R&D, et pour préserver la qualité des médicaments disponible en France. Par ailleurs il est clairement reconnu que la solvabilisation des soins en France est une source de dynamisme et de richesse qui permet également un développement du pays sur le plan social et économique (MS Touraine, 2017).

En revanche, les prix récemment demandés par les industriels pour certains traitements innovants ont interpellé la communauté médicale, la société civile et l'opinion publique. Le problème de l'accès aux soins et ainsi remonté lors des discussions du G7. En France, cette prise de conscience publique a conduit les responsables politiques à confirmer en 2017 leur attachement au principe d'accès universel aux médicaments. Le Conseil Economique, Social et Environnemental (CESE) par l'intermédiaire de Catherine Pajares y Sanchez et Christian Saout explore « les voies et moyens de sauvegarder ce modèle qui

constitue un des piliers de la cohésion sociale et de l'égalité en France ». Ils ont notamment fait un certain nombre de propositions qui relèvent d'une régulation européenne ou internationale pour sauvegarder à la fois une juste rémunération de l'innovation et un accès aux nouveaux traitements (Pajares y Sanchez & Saout 2017). Les propositions mettent également en avant la nécessité de rendre public les négociations et de les ouvrir aux patients et aux professionnels de santé.

Le pharmacien doit participer activement à ce débat pour pouvoir continuer de fournir aux médecins et aux patients les meilleurs outils thérapeutiques. Enfin, l'évolution nous a doté d'un système de défense extraordinairement puissant garant de notre intégrité biologique. L'immunothérapie nous rappelle le rôle crucial du SI dans sa capacité à prévenir le développement du cancer, cependant les dérèglements de ce système sont prévisibles au-delà d'un certain âge. Le SI est à mon sens notre meilleur outil de prévention du cancer, il est donc à préserver.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A.K. et al., 2013. Regulatory T cells : recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Publishing Group*, 14(4), pp.307–308. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2554>.
- Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), pp.787–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893001>.
- Abès, R. et al., 2010. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*, 116(6), pp.926–934.
- Abou-Alfa, G.K. et al., 2011. Targeting mutated K-ras in pancreatic adenocarcinoma using an adjuvant vaccine. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 34(3), pp.321–325.
- Al., M.P. et al., 2012. A randomized, placebo controlled, doubled, blind, multicenter phase 2 adjuvant trial of the efficacy, immunogenicity, and safety of GI-4000 plus Gem vs Gem alone in patients with resected pancreas cancer with activating Ras mutations/survival and immunolo. *J Clin Oncol*.
- Alam, S. et al., 2011. Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), pp.44211–44217.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Campbell, P.J., et al., 2013a. Deciphering Signatures of Mutational Processes Operative in Human Cancer. *Cell Reports*, 3(1), pp.246–259.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Campbell, P.J., et al., 2013b. Deciphering Signatures of Mutational Processes Operative in Human Cancer. *Cell Reports*, 3(1), pp.246–259. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.008>.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., et al., 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), pp.415–421.
- Alter, G. et al., 2004. Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J Immunol*, 173(8), pp.5305–5311. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15470077%5Cnhttp://www.jimmunol.org/cgi/reprint/173/8/5305.pdf.
- Amiel, J., 1967. Immunothérapie active non spécifique par le BCG de la leucémie virale E male G2 chez des receveurs isogéniques. *Rev Fr Etud Clin Biol*.
- Anderson, A.C., Joller, N. & Kuchroo, V.K., 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44(5), pp.989–1004.
- De Andrade, L.F. et al., 2018. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science*, 359(6383), pp.1537–1542.
- Arslan, C. & Yalcin, S., 2014. Current and future systemic treatment options in metastatic pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5(4), pp.280–295.
- Babior, B., 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 64(5), pp.959–966.
- Badoual, C., 2006. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating CD4+ T-Cell Subpopulations in Head and Neck Cancers. *Clinical Cancer Research*, 12(2), pp.465–472. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-1886>.
- Baeyens, a. et al., 2014. Effector T Cells Boost Regulatory T Cell Expansion by IL-2, TNF, OX40, and Plasmacytoid Dendritic Cells Depending on the Immune Context. *The Journal of Immunology*, 194(3), pp.999–1010. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400504>.
- Balli, D. et al., 2017. Immune cytolytic activity stratifies molecular subsets of human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(12), pp.3129–3138.
- Barber, R.M. et al., 2017. Healthcare Access and Quality Index based on mortality from causes amenable to personal health care in 195 countries and territories, 1990–2015: a novel analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 390(10091), pp.231–266.
- Barjon, C. et al., 2012. A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses. *Infectious agents and cancer*, 7(1), p.16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3464730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Beatty, G.L. et al., 2013. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(22), pp.6286–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3834036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Beatty, G.L. et al., 2018. Activity of Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor T cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508518303238>.
- Beatty, G.L. et al., 2011. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, 331(6024), pp.1612–1616.
- Beatty, G.L. et al., 2014. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells

- induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer immunology research*, 2(2), pp.112–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24579088><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3932715>.
- Berek, C., Berger, A. & Apel, M., 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67(6), pp.1121–1129.
- Bernhardt, S.L. et al., 2006. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *British Journal of Cancer*, 95(11), pp.1474–1482.
- Biron, C.A. et al., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17, pp.189–220. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10358757.
- Blanc, C., Granier, C. & Tartour, É., 2017. Vaccination antitumorale Anti-tumour vaccination. *Innov Ther Oncol*, 3, pp.149–157.
- Bollyky, P.L. et al., 2009. CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(4), pp.2232–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3057032&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bonifant, C.L. et al., 2016. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 3.
- Boon, T. et al., 2006. HUMAN T CELL RESPONSES AGAINST MELANOMA. *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp.175–208. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090733>.
- Borg, C., 2017. Utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés avec un récepteur antigénique chimérique (CAR) pour la thérapie cellulaire des cancers The use of genetically. , 3, pp.158–168.
- Borghaei, H. et al., 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, 373(17), pp.1627–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26840144><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412456>.
- Bourguignon, L.Y.W. et al., 2002. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor ?? receptor I in metastatic breast tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.39703–39712.
- Bradley, J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214(2), pp.149–160.
- Brahmer, J.R. et al., 2012a. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), pp.2455–2465. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200694>.
- Brahmer, J.R. et al., 2012b. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), pp.2455–2465. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200694>.
- Branca, M.A., 2016. Rekindling cancer vaccines. *Nature Biotechnology*, 34(10), pp.1019–1024. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3690>.
- Brett, B.T. et al., 2002. Phase II study of anti-gastrin-17 antibodies, raised to G17DT, in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 20(20), pp.4225–4231. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12377966.
- Le Bris, Y. & Béné, M.C., 2016. Le point sur les CAR T-cells. *Revue d'Oncologie Hematologie Pédiatrique*, 4(4), pp.202–209. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oncohp.2016.09.001>.
- van der Bruggen, P. et al., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038), pp.1643–1647.
- Bruggen, P. Van Der et al., 1991. A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a human melanoma. , 254(5038), pp.1643–1647.
- Buanes, T. et al., 2009. A randomized phase III study of gemcitabine (G) versus GV1001 in sequential combination with G in patients with unresectable and metastatic pancreatic cancer (PC). *Journal of Clinical Oncology*, 27, p.4601. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=120352692&site=ehost-live>.
- Burmester, G. & Pezzuto, A., 2008. ATLAS DE POCHE D'IMMUNOLOGIE.
- Burnet, F.M., 1971. Immunological Surveillance in Neoplasia. *Immunological Reviews*, 7(1), pp.3–25.
- Buscail, L. et al., 2015. Nouveautés dans la biologie du cancer du pancréas. *Bulletin du Cancer*, 102(6), pp.S53–S61. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-4551\(15\)31218-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-4551(15)31218-2).
- Buscail, L. & Bournet, B., 2017. Adénocarcinome du pancréas : quels traitements proposer en 2017 et

- quelles sont. , XX, pp.84–88.
- Byrne, K.T. & Vonderheide, R.H., 2016. CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer. *Cell Reports*, 15(12), pp.2719–2732. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.058>.
- Campbell, B.B. et al., 2017. Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell*, 171(5), p.1042–1056.e10.
- Campbell, D.J. & Koch, M.A., 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), pp.119–130.
- Carpentier, a et al., 2009. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(9), pp.2102–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624566>.
- Carreras, J. et al., 2006. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 108(9), pp.2957–2964.
- Cassatella, M. a., 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today*, 16(1), pp.21–26.
- Chabot, S. et al., 2002. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*, 12(2), pp.111–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886844>.
- Chakravarti, A., Allaey, I. & Poubelle, P.E., 2007. Neutrophile et immunit?? - Est-ce inn?? ou acquis? *Medecine/Sciences*, 23(10), pp.862–867.
- Chauvin, J.-M. et al., 2015. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen – specific CD8 + T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), pp.1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866972>.
- Chen, D.S. & Mellman, I., 2017. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), pp.321–330.
- Chen, D.S. & Mellman, I., 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), pp.1–10.
- Chmielewski, M. et al., 2012. T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice. *Gastroenterology*, 143(4).
- ClinialTrial.gov, 2018. *Liste des essais cliniques évaluant un anti-Lag3 recensés sur ClinialTrial.gov :NCT03489369, NCT02658981, NCT02061761, NCT03250832, NCT01968109, NCT03005782, NCT03219268, NCT02966548, NCT03459222, NCT03440437, NCT02195349, NCT02488759, NCT03365791, NCT020,*
- Coley, W.B., 1893. THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS. *The American Journal of the Medical Sciences*, 105(5), pp.487–510. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000441-189305000-00001>.
- Collisson, E.A. et al., 2011. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine*, 17(4), pp.500–503.
- Van Cutsem, E. et al., 2009. Phase III Trial of Bevacizumab in Combination With Gemcitabine and Erlotinib in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(13), pp.2231–2237. Available at: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2008.20.0238>.
- Daley, D. et al., 2016. T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining T Cell Activation. *Cell*, 166(6), p.1485–1499.e15.
- Daley, D. et al., 2017a. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nature Medicine*, 23(5), pp.556–567. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4314>.
- Daley, D. et al., 2017b. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nature Medicine*, 23(5), pp.556–567.
- Delhem, N. et al., 1998. Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(4), pp.2060–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712080>.
- Desclerc-Dulac, D. et al., 2016. Le Prix Des Medicaments Innovants Menace-T-II L'Acces Aux Soins ? , pp.1–17.
- DeSelm, C.J. et al., 2017. CAR T-cell therapy for pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 116(1), pp.63–74.
- Dighe, a S. et al., 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), pp.447–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895156>.
- Driss, V. et al., 2010. L'eosinophile: Nouvel acteur de la réponse immunitaire innée? *Medecine/Sciences*, 26(6–7), pp.621–626.
- Du, W. et al., 2017. Tim-3 as a target for cancer immunotherapy and mechanisms of action.

- International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), pp.1–12.
- Dunn, G.P. et al., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), pp.991–998. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni1102-991>.
- Ehrlich, P., 1909. Ueber Den Jetzigen Stand Der Karzinomforschung. *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde*, (5), pp.273–290. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cber.19090420105>.
- Eissler, N. et al., 2012. Trifunctional bispecific antibodies induce tumor-specific T cells and elicit a vaccination effect. *Cancer Research*, 72(16), pp.3958–3966.
- Espinosa, eric, 2012. Évolution des systèmes immunitaires. *ATALA. Cultures et sciences humaines*, 15(R).
- Feldmann, G. et al., 2007. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 14(3), pp.224–232.
- Fokas, E. et al., 2015. Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1855(1), pp.61–82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.12.001>.
- Foley, E.J., 1953. Antigenic Properties of Methylcholanthrene-induced Tumors in Mice of the Strain of Origin. *Cancer Research*, 13(12), pp.835–837.
- France, P., Danemark, C. & Euronext, O.S.A., 2017. Onxeo annonce des résultats précliniques prometteurs de Livatag ® dans le cancer du pancréas. , pp.4–6.
- Fu, H.C. et al., 2015. Galectin-9 predicts postoperative recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Tumor Biology*, 36(8), pp.5791–5799. Available at: <http://download.springer.com/static/pdf/893/art%253A10.1007%252Fs13277-015-3248-y.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs13277-015-3248-y&token2=exp=1455196914~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F893%2Fart%25253A10.1007%25252Fs13277-015-3248>.
- Fukumura, D. et al., 2018. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2018.29>.
- Fukunaga, a et al., 2004. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 28(1), pp.e26-31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707745>.
- Gagliani, N. et al., 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine*, 19(6), pp.739–746.
- Garber, K., 2018. A promising new cancer drug has hit a major setback, raising questions about whether the field is moving too fast.
- Gargett, T. et al., 2016. GM-CSF signalling blockade and chemotherapeutic agents act in concert to inhibit the function of myeloid-derived suppressor cells in vitro. *Clinical & Translational Immunology*, 5(12), p.e119. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cti.2016.80>.
- Garon, E.B. et al., 2015. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), pp.2018–2028. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1501824>.
- Gatault, S. et al., 2012. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. In *Cancer Immunology, Immunotherapy*. pp. 1527–1534.
- Geynisman, D.M. et al., 2013. A randomized pilot phase I study of modified carcinoembryonic antigen (CEA) peptide (CAP1-6D)/montanide/GM-CSF-vaccine in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 1.
- Gilliam, A.D. et al., 2012. An international multicenter randomized controlled trial of G17DT in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*, 41(3), pp.374–379.
- Gjertsen, M.K. et al., 2001. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 92(3), pp.441–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11291084>.
- Golstein, P. & Griffiths, G.M., 2018. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nature Reviews Immunology*. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41577-018-0009-3>.
- Granot, Z. et al., 2011. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*, 20(3), pp.300–314.
- Grob, J., Malissen, N. & E-f, P., 2017. L ' L ' utilisation clinique des anticorps. , 3, pp.131–138.
- Gross, L., 1943. Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Research*, 3(5), pp.326–333.
- Groux, H. et al., 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(October), pp.737–742.

- Guillot, B., 2017. Le Prix Des Médicaments Anticancéreux. , pp.381–385. Available at: <http://media.onco-npdc.fr/27573.pdf>.
- Habtezion, A., 2016. Macrophages and Pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Letters*, 36(5), pp.1011–1014.
- Hammel, P., 2017. *Journée Scientifique du GERCOR “Carte blanche à…Pascal HAMMEL: Le cancer du pancréas 2017,”*
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>.
- Hannani, D. et al., 2014. Contribution of humoral immune responses to the antitumor effects mediated by anthracyclines. *Cell Death and Differentiation*, 21(1), pp.50–58.
- Hardacre, J.M. et al., 2013. Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 17(1), pp.94–100 100–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23229886>.
- Hartmann, J. et al., 2017. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Molecular Medicine*, 9(9), p.e201607485. Available at: <http://embomolmed.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emmm.201607485>.
- HAS, 2010. Cancer du du pancréas_HAS. *Ald* 30, p.31.
- Heusschen, R., Freitag, N., et al., 2013. Profiling Lgals9 splice variant expression at the fetal-maternal interface: implications in normal and pathological human pregnancy. *Biology of reproduction*, 88(1), p.22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242525>.
- Heusschen, R., Griffioen, A.W. & Thijssen, V.L., 2013. Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1836(1), pp.177–185.
- Hingorani, S.R. et al., 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), pp.437–450.
- Hiraoka, N. et al., 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical Cancer Research*, 12(18), pp.5423–5434.
- Hirashima, M. et al., 2004. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconjugate journal*, 19(7–9), pp.593–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14758084>.
- Hsu, F.J. et al., 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(1), pp.52–58.
- Hu, Z.I. et al., 2018. Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clinical Cancer Research*, p.clincanres.3099.2017. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-3099>.
- Humphris, J.L. et al., 2017. Hypermutation In Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 152(1), p.68–74.e2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.060>.
- Ifrah, N. et al., 2017. Le Prix Des Médicaments Anticancéreux. Available at: <http://media.onco-npdc.fr/27573.pdf>.
- Iii, B.A.J. et al., 2017. CCR FOCUS Strategies for Increasing Pancreatic Tumor Immunogenicity. , 23(7), pp.1656–1670.
- Irie, A. et al., 2005. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(8), pp.2962–2968.
- Jesus-Acosta A, O'Dwyer P, Ramanathan R, et al, 2014. A phase II study of vismodegib, a hedgehog (Hh) pathway inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel (nab-P) in patients (pts) with untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA). *J Clin Oncol*, ASCO Annua.
- Jha, G.G. et al., 2017. A phase II randomized, double-blind study of sipuleucel-T followed by IDO pathway inhibitor, indoximod, or placebo in the treatment of patients with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), p.3066. Available at: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3066.
- Jiang, J. et al., 2013. Decreased Galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS ONE*, 8(12).
- Jones, S. et al., 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), pp.1801–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772397%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2848990>.
- June, C.H. et al., 2018. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 359(6382), pp.1361–1365. Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar6711>.
- Kageshita, T. et al., 2002. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human

- melanoma cell lines and its clinical significance. *Int.J.Cancer*, 99(6), pp.809–816.
- Kharaziha, P. et al., 2012. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1826(1), pp.103–111.
- Kleeff, J. et al., 2016. Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(April), pp.1–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>.
- Klibi, J. et al., 2009. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*, 113(9), pp.1957–1966.
- Kobayashi, T. et al., 2010. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia*, 24(4), pp.843–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200560>.
- Koebel, C.M. et al., 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), pp.903–907.
- Köhler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), pp.495–497.
- Kondo, H. et al., 2008. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Research*, 28(1 B), pp.379–387.
- Krishnadas, D.K. et al., 2015. A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(10), pp.1251–1260.
- Kumar, V. et al., 2017. Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell*, 32(5), p.654–668.e5.
- Kunk, P.R. et al., 2016. From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1).
- Kyriazis, A.P. et al., 1982. Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. *The American journal of pathology*, 106(2), pp.250–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6278935> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1916189>.
- Kyriazis, A.P. et al., 1986. Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma capan-2 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Research*, 46(11), pp.5810–5815.
- Ladoire, S., Martin, F. & Ghiringhelli, F., 2011. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(7), pp.909–918.
- Laheru, D. et al., 2008. Allogeneic Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Secreting Tumor Immunotherapy Alone or in Sequence with Cyclophosphamide for Metastatic Pancreatic Cancer: A Pilot Study of Safety, Feasibility, and Immune Activation. *Clinical Cancer Research*, 14(5), pp.1455–1463. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-0371>.
- Le, D.T. et al., 2013. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *Journal of Immunotherapy*, 36(7), pp.382–389.
- Le, D.T., Durham, J.N., et al., 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349), pp.409–413. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28596308> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5576142>.
- Le, D.T., Uram, J.N., et al., 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 372(26), pp.2509–2520. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1500596>.
- Le, D.T., Ko, A.H., et al., 2017. Results from a phase 2b, randomized, multicenter study of GVAX pancreas and CRS-207 compared to chemotherapy in adults with previously-treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (ECLIPSE Study). *Journal of Clinical Oncology*, 35(4_suppl), p.345. Available at: https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.4_suppl.345.
- Le, D.T., Wang-Gillam, A., et al., 2015. Safety and survival with GVAX pancreas prime and Listeria monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(12), pp.1325–1333.
- Lebien, T.W. & Tedder, T.F., 2008. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*, 112(5), pp.1570–1580.
- Lee, D.W. et al., 2015. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 385(9967), pp.517–528.

- Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, Lee K, Bartlett D, McKolanis JR, et al, A phase I/ II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther.*
- Lévy, P., 2018. Génétique des maladies du pancréas (hors tumeurs neuroendocrines).
- Lewandowski, C.M., Co-investigator, N. & Lewandowski, C.M., 2015. *Immunology Kuby 7th Ed*,
- Liu, J., Liu, S. & Cao, X., 2012. Highlights of the advances in basic immunology in 2011. *Cellular and Molecular Immunology*, 9(3), pp.197–207.
- Liu, T. et al., 2009. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biology direct*, 4(1), p.40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852824><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2770033><http://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-4-40><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770>.
- Löhr, M. et al., 2005. Frequency of K-ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Neoplasia*, 7(1), pp.17–23. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558605800958>.
- Loos, M. et al., 2008. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 268(1), pp.98–109.
- Lotteau, V., 1995. PRESENTATION DES ANTIGÈNES : QUI PRÉSENTE QUOI ? Vincent. *Médecine/Sciences*, pp.8–9.
- Lou, Y. et al., 2008. Combining the antigen processing components TAP and tapasin elicits enhanced tumor-free survival. *Clinical Cancer Research*, 14(5), pp.1494–1501.
- Lowther, D.E. et al., 2016. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight*, 1(5), pp.1–15. Available at: <https://insight.jci.org/articles/view/85935>.
- Lu, J. et al., 2017. Nano-enabled pancreas cancer immunotherapy using immunogenic cell death and reversing immunosuppression. *Nature Communications*, 8(1).
- Luheshi, N.M. et al., 2016. Transformation of the tumour microenvironment by a CD40 agonist antibody correlates with improved responses to PD-L1 blockade in a mouse orthotopic pancreatic tumour model. *Oncotarget*, 7(14). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7610>.
- Lupinacci, R.M. et al., 2018. Prevalence of Microsatellite Instability in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology*, 154(4), pp.1061–1065. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.11.009>.
- Ma, Y. et al., 2016. Recent Advancements in Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Cancer Research Frontiers*, 2(2), pp.252–276. Available at: <http://cancer-research-frontiers.org/2016-2-252/>.
- Mahoney, K.M., Freeman, G.J. & McDermott, D.F., 2015. The next immune-checkpoint inhibitors: Pd-1/pd-l1 blockade in melanoma. *Clinical Therapeutics*, 37(4), pp.764–782. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.02.018>.
- Maliar, A. et al., 2012. Redirected T cells that target pancreatic adenocarcinoma antigens eliminate tumors and metastases in mice. *Gastroenterology*, 143(5).
- Malka, D. et al., 2002. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51(6), pp.849–852.
- Malvezzi, M. et al., 2018. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Annals of Oncology*. Available at: <https://academic.oup.com/annonc/advance-article/doi/10.1093/annonc/mdy033/4935197>.
- Mantovani, A. et al., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), pp.519–531.
- Mantovani, A. et al., 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), pp.399–416.
- Mathé, G. & Amiel, J., 1964. Mathé G, Amiel JL. Réduction de la concentration plasmatique du virus leucémigène de Charlotte Friend par immunothérapie adoptive (greffe de moelle osseuse allogénique). *Acad Sci. Acad Sci.*
- Maude, S.L. et al., 2014. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371(16), pp.1507–1517. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1407222>.
- Middleton, G. et al., 2014. Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine GV1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (TeloVac): An open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(8), pp.829–840.
- Miller, J.F.A.P., Grant, G.A. & Roe, F.J.C., 1963. Effect of thymectomy on the induction of skin tumours by 3,4-benzopyrene [29]. *Nature*, 199(4896), pp.920–922.
- Mittal, D. et al., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27(1), pp.16–25.
- Mondragón, L., Kroemer, G. & Galluzzi, L., 2016. Immunosuppressive $\gamma\delta$ T cells foster pancreatic carcinogenesis. *Oncotarget*, 5(11), p.e1237328. Available at:

- <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1237328>.
- Moralès, O. et al., 2012. EBV latency II-derived peptides induce a specific CD4+cytotoxic T-cell activity and not a CD4+regulatory T-cell response. *Journal of Immunotherapy*, 35(3), pp.254–266.
- Morgan, R.A. et al., 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314(5796), pp.126–129.
- Morgan, R.A. et al., 2010. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*, 18(4), pp.843–851.
- Morrison, A.H., Byrne, K.T. & Vonderheide, R.H., 2018. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *TRENDS in CANCER*, xx, pp.1–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.04.001>.
- Mrizak, D. et al., 2015. Effect of nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes on human regulatory T cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(1), p.363.
- Munn, D.H. & Mellor, A.L., 2016. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in Immunology*, 37(3), pp.193–207. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>.
- Musiani, P. et al., 1996. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Laboratory Investigation*, 74(1), pp.146–157. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8569177>.
- Nakamura, M. et al., 2009. Long-term outcome of immunotherapy for patients with refractory pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 29(3), pp.831–836.
- Nathan, B. et al., 2016. Phase 2 trial of the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway (IDO) inhibitor indoximod plus gemcitabine/ nab-paclitaxel for the treatment of metastatic pancreas cancer: interim analysis. Paper presented at: ASCO Annual Me. *Journal of Clinical Oncology*.
- Nywening, T.M. et al., 2016. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*, 17(5), pp.651–662.
- Olive, D. & Golstein, P., 2017. therapeutic antibodies CTLA-4 et PD-1 : des origines aux anticorps. , 3, pp.121–130.
- Oshita, C. et al., 2012. Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: Phase II clinical trial. *Oncology Reports*, 28(4), pp.1131–1138.
- Outzen, H.C. & Custer, R.P., 1975. Growth of human normal and neoplastic mammary tissues in the cleared mammary fat pad of the nude mouse. *J Natl Cancer Inst*, 55(6), pp.1461–1466. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve%7B%7Ddb=PubMed%7B%7Ddopt=Citation%7B%7Dlist%7B_%7Duids=1206764.
- Pajares y Sanchez, C. & Saout, C., 2017. Prix et accès aux traitements médicamenteux innovants. *Les éditions des Journeaux officiels*, p.106. Available at: http://www.lecese.fr/sites/default/files/pdf/Avis/2017/2017_04_acces_medicaments_innovants.pdf.
- Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.252–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3239%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437870>.
- Park, S.G. et al., 2010. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell*, 18(2), pp.160–170. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.014>.
- Paul, P., 1990. Modification De L'Expression Des Molecules De Classe I Du Cmh Et Progression Tumorale. *Medecine/Sciences*, 6(5), pp.449–455.
- Pavlova, N.N. & Thompson, C.B., 2016. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), pp.27–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- Pecher, G. et al., 2002. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol Immunother*, 51(11–12), pp.669–673. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12439613.
- Pepper, M. & Jenkins, M.K., 2011. Origins of CD4+ effector and central memory T cells. *Nature Immunology*, 12(6), pp.467–471.
- Pergamo, M. & Miller, G., 2017. Myeloid-derived suppressor cells and their role in pancreatic cancer. *Cancer Gene Therapy*, 24(3), pp.100–105. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2016.65>.
- Pharmexa, S.J., 2014. Stops One of Two Phase III Trials. 2008.
- Pollard, J.W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumor progression and metastasis.

- Nature Reviews Cancer*, 4, pp.71–78.
- Posey, A.D. et al., 2016. Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity*, 44(6), pp.1444–1454.
- Prendergast, G.C. et al., 2017. Discovery of IDO1 Inhibitors: From bench to bedside. *Cancer Research*, 77(24), pp.6795–6811.
- Prizment, A.E. et al., 2016. Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health Study. *Modern Pathology*, 29(5), pp.516–527.
- Pylayeva-Gupta, Y. et al., 2012. Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell*, 21(6), pp.836–847. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.024>.
- Rabinovich, G. a & Toscano, M. a, 2009. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 9(5), pp.338–352.
- Ramanathan, R.K. et al., 2005. Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer. In *Cancer Immunology, Immunotherapy*. pp. 254–264.
- Raphael, B.J. et al., 2017. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 32(2), p.185–203.e13.
- Rebours, V., 2009. États Précancéreux Du Pancréas. *Fmc Hge*, pp.93–103.
- Reefman, E. et al., 2010. Cytokine Secretion Is Distinct from Secretion of Cytotoxic Granules in NK Cells. *The Journal of Immunology*, 184(9), pp.4852–4862. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0803954>.
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M. & Wentzensen, N., 2009. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 58(10), pp.1535–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ribas, A. et al., 2016. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*, 315(15), p.1600. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.4059>.
- Ribas, A., 2015. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *Cell*, 162(6), pp.1186–1190.
- Ribas, A. & Wolchok, J.D., 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), pp.1350–1355. Available at: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar4060>.
- Robert, C. et al., 2011. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 364(26), pp.2517–2526. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1104621>.
- Rosenberg, S.A. et al., 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 17(13), pp.4550–4557.
- Roy Baynes, 2018. Incyte and Merck Provide Update on Phase 3 Study of Epacadostat in Combination with KEYTRUDA® (pembrolizumab) in Patients with Unresectable or Metastatic Melanoma. Available at: <http://investors.merck.com/news/press-release-details/2018/Incyte-and-Merck-Provide-Update-on-Phase-3-Study-of-Epacadostat-in-Combination-with-KEYTRUDA-pembrolizumab-in-Patients-with-Unresectable-or-Metastatic-Melanoma/default.aspx>.
- Royal, R.E. et al., 2010a. Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Immunotherapy*, 33(8), pp.828–833.
- Royal, R.E. et al., 2010b. Phase 2 Trial of Single Agent Ipilimumab (Anti-CTLA-4) for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Immunotherapy*, 33(8), pp.828–833. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002371-201010000-00009>.
- Rygaard, J. & Povlsen, C.O., 1976. The Nude Mouse vs. The Hypothesis of Immunological Surveillance. *Immunological Reviews*, 28(1), pp.43–61.
- Sainio, A., 2013. Extracellular Matrix Macromolecules in Tumour Microenvironment with Special Reference to Desmoplastic Reaction and the Role of Matrix Proteoglycans and Hyaluronan. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, S13. Available at: <https://www.omicsonline.org/extracellular-matrix-macromolecules-in-tumour-microenvironment-with-special-reference-to-desmoplastic-reaction-2157-2518.S13-002.php?aid=13316>.
- Sakkal, S. et al., 2016. Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable? *Current Medicinal Chemistry*, 23(7), pp.650–666.
- Sanford, D.E. et al., 2013. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: A role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clinical Cancer Research*, 19(13),

- pp.3404–3415.
- Schleinitz, N. et al., 2002. Les cellules natural killer. *Revue Francaise des Laboratoires*, 2002(341), pp.23–30. Available at: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=GatewayURL&_origin=ScienceSearch&_method=citationSearch&_piikey=S0338989802801780&_version=1&_returnURL=&md5=e4013e227f54fdc4bfd42f41b7b7fb7b.
- Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P.H., 2012. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology*, 3(March), p.51.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), pp.1565–1570. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1203486>.
- Schuetz T, Kaufman H, Marshall J, S.H., 2005. Extended survival in second-line pancreatic cancer after therapeutic vaccination. *ASCO Annual Meeting.*, 16 suppl 2.
- Schulkens, I.A. et al., 2014a. Galectin expression profiling identifies galectin-1 and Galectin-9Δ5 as prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *PLoS one*, 9(9), p.e107988. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4178059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schulkens, I.A. et al., 2014b. Galectin expression profiling identifies galectin-1 and Galectin-9Δ5 as prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *PLoS one*, 9(9), p.e107988.
- Schwartz, D.L. et al., 2010. Radiosensitization and Stromal Imaging Response Correlates for the HIF-1 Inhibitor PX-478 Given with or without Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(7), pp.2057–2067. Available at: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-09-0768>.
- Seliger, B., Maeurer, M.J. & Ferrone, S., 1997. TAP off--tumors on. *Immunology today*, 18(6), pp.292–299.
- Shankaran, V. et al., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), pp.1107–1111.
- Shapiro, J. et al., 2005. G17DT+gemcitabine [Gem] versus placebo+Gem in untreated subjects with locally advanced, recurrent, or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: Results of a randomized, double-blind, multinational, multicenter study. *Journal of Clinical Oncology*, 23(16_suppl), p.LBA4012-LBA4012. Available at: https://doi.org/10.1200/jco.2005.23.16_suppl.lba4012.
- Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity*, 30(5), pp.636–645.
- Sica, A. & Bronte, V., 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1155–1166.
- Sideras, K. et al., 2017. Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer. *International Journal of Cancer*, pp.1–11. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.30760>.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2016. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 66(1), pp.7–30.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S., 2009. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.591–619. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>.
- Spitzenberger, F., Graessler, J. & Schroeder, H.E., 2001. Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissue. *Biochimie*, 83(9), pp.851–862.
- Steele, C.W. et al., 2016. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 29(6), pp.832–845.
- Stromnes, I.M. et al., 2017. T-cell Localization, Activation, and Clonal Expansion in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Immunology Research*, 5(11), pp.978–991. Available at: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-16-0322>.
- Stutman, O., 1979. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J. Natl Cancer Inst.*
- Stutman, O., 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, N. Y.)*, 183(4124), pp.534–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17841365> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4588620>.
- Su, E.W., Bi, S. & Kane, L.P., 2011. Galectin-9 regulates T helper cell function independently of Tim-3. *Glycobiology*, 21(10), pp.1258–1265.
- Tanikawa, R. et al., 2010. Galectin-9 induces osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), pp.317–322.

- Tartour, E., 2012. Influence de l'angiogenèse et des traitements sur la réponse immunitaire et l'immunosuppression. , pp.13–16.
- Taube, J.M. et al., 2014. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(19), pp.5064–5074.
- Thind, K. et al., 2017. Immunotherapy in pancreatic cancer treatment: A new frontier. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 10(1), pp.168–194.
- Thomas, E.D. et al., 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 257(11), pp.491–496.
- Toubaji, A. et al., 2008. Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(9), pp.1413–1420.
- Touraine, M., 2017. Présentation de l'avis Prix et accès aux traitements médicamenteux innovants, en présence de la Ministre des affaires sociales et de la santé, Mme Marisol Touraine. 25-01-2017. Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=bCjeMNX1zY8>.
- Valadi, H. et al., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), pp.654–659.
- Veglia, F. & Gabrilovich, D.I., 2017. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Current Opinion in Immunology*, 45, pp.43–51.
- Verona, R.I. et al., 2017. **Combination of CD40 agonism and CSF-1R blockade reconditions tumor-associated macrophages and drives potent antitumor immunity.** *Cancer Immunology Research*, p.canimm.0258.2017. Available at: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-17-0258>.
- Vivier, E. et al., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), pp.503–510. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425107>.
- Voron, T. et al., 2015. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(2), pp.139–148. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20140559>.
- Waddell, N. et al., 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), pp.495–501.
- Watier, H., 2014. [Biotherapies, immunotherapies, targeted therapies, biopharmaceutics... which word should be used?]. *Médecine sciences : M/S*, 30(5), pp.567–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939545>.
- Watier, H., 2017. Les nouveaux formats d'anticorps thérapeutiques. In *DU Immunothérapie antitumorale*. Lille.
- Weber, J.S. et al., 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 16(4), pp.375–384.
- Weden, S. et al., 2011. Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras. *Int J Cancer*, 128(5), pp.1120–1128. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473937>.
- Weiss, S.J. et al., 1981. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 68(3), pp.714–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wilgenhof, S. et al., 2011. Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 34(5), pp.448–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21577140>.
- Winograd, R. et al., 2015. Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunology Research*, 3(4), pp.399–411. Available at: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-14-0215>.
- Wu, C. et al., 2014. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*, 41(2), pp.270–282. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.011>.
- Yamamoto, K. et al., 2005. MUC1 peptide vaccination in patients with advanced pancreas or biliary tract cancer. *Anticancer Research*, 25(5), pp.3575–3579.
- Yamaue H, Tani T, Miyazawa M, Yamao K, Mizuno N, Okusaka T, et al, 2013. Phase II/III clinical trial with VEGFR2-epitope peptide and gemcitabine for patients with locally advanced, metastatic, or unresectable pancreatic cancer: *J Clin Oncol*.
- Yoshikawa, K. et al., 2012. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Science*, 103(11), pp.2012–2020.
- Yu, N. et al., 2012. CD4⁺CD25⁺CD127^{low}/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood. *Inflammation*, 35(6), pp.1773–1780.

- Yunis, A.A., Arimura, G.K. & Russin, D.J., 1977. Human pancreatic carcinoma (mia paca???) in continuous culture: Sensitivity to asparaginase. *International Journal of Cancer*, 19(1), pp.128–135.
- Zambirinis, C.P. et al., 2016. gd T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Article gd T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining ab T Cell Activation. *Cell*, pp.1485–1499.
- Zhang, Y. et al., 2017. Myeloid cells are required for PD-1/PD-L1 checkpoint activation and the establishment of an immunosuppressive environment in pancreatic cancer. *Gut*, 66(1), pp.124–136. Available at: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2016-312078>.
- Zhou, L., Chong, M.M.W. & Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30(5), pp.646–655.
- Zhu, C. et al., 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology*, 6(12), pp.1245–1252.
- Zhu, J. & Paul, W.E., 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, 20(1), pp.4–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.138>.
- Zhu, Y. et al., 2014. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Research*, 74(18), pp.5057–5069.
- Zitvogel, L. et al., 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*, 4(5), pp.594–600.
- Zitvogel, L. & Kroemer, G., 2017. *Oncoimmunology: A Practical Guide for Cancer Immunotherapy* Springer, ed., Springer International Publishing.
- Zou, W. & Chen, L., 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), pp.467–477.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire : 2017/2018

Nom : Quilbe
Prénom : Alexandre

Titre de la thèse :
IMMUNOTHÉRAPIE DANS LE CANCER DU PANCRÉAS : Evaluation *in vitro* et *in vivo* d'une nouvelle immunothérapie anti-galectine-9 dans un modèle de cancer pancréatique

Mots-clés : Immunothérapie, immunologie, galectine-9, adénocarcinome du pancréas

Résumé : Dans cette thèse, les grands fondements de l'immunologie et plus particulièrement de l'immunité anti-tumorale seront posés dans un premier temps. Cette première partie nous conduira à une seconde partie consacrée à la description des stratégies d'immunothérapies. Nous verrons comment et pourquoi nous tentons aujourd'hui d'utiliser le système immunitaire pour lutter contre le cancer. Pour reprendre les propos du Pr Joseph Gligorov « l'immunologie est à la médecine ce que la philosophie est à la science, il aura fallu du temps pour comprendre d'abord que ce qui paraît simple est en fait compliqué, puis ensuite imaginer que cette complexité puisse se simplifier lorsqu'il s'agit d'applications cliniques ».

Dans une troisième partie de mon manuscrit, je décrirai plus précisément les stratégies d'immunothérapie envisagées pour le traitement des adénocarcinomes du pancréas (ADKP).

Et, enfin dans une dernière partie, je vous présenterai un travail original d'évaluation dans l'ADKP d'une stratégie d'immunothérapie ciblant les lymphocytes T régulateurs qui sont des cellules jouant un rôle important dans l'immunorégulation du système immunitaire (Brevet WO2015185875).

Membres du jury :

Président :	Professeur Delphine ALLORGE , Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille, Praticien Hospitalier, CHRU, Lille
Directeur de Thèse :	Professeur Philippe CHAVATTE , Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Lille
Assesseur(s) :	Professeur Nadira DELHEM , Professeur des Universités, Faculté de Sciences et Technologies, Lille Professeur Philippe CARDOT Professeur des Universités, Limoges, Faculté de Pharmacie, Limoges Docteur Michèle VASSEUR Pharmacien Praticien Hospitalier, CHRU, Lille Docteur Isabelle Dagenat , Pharmacien Praticien Hospitalier, CH Compiègne-Noyon

