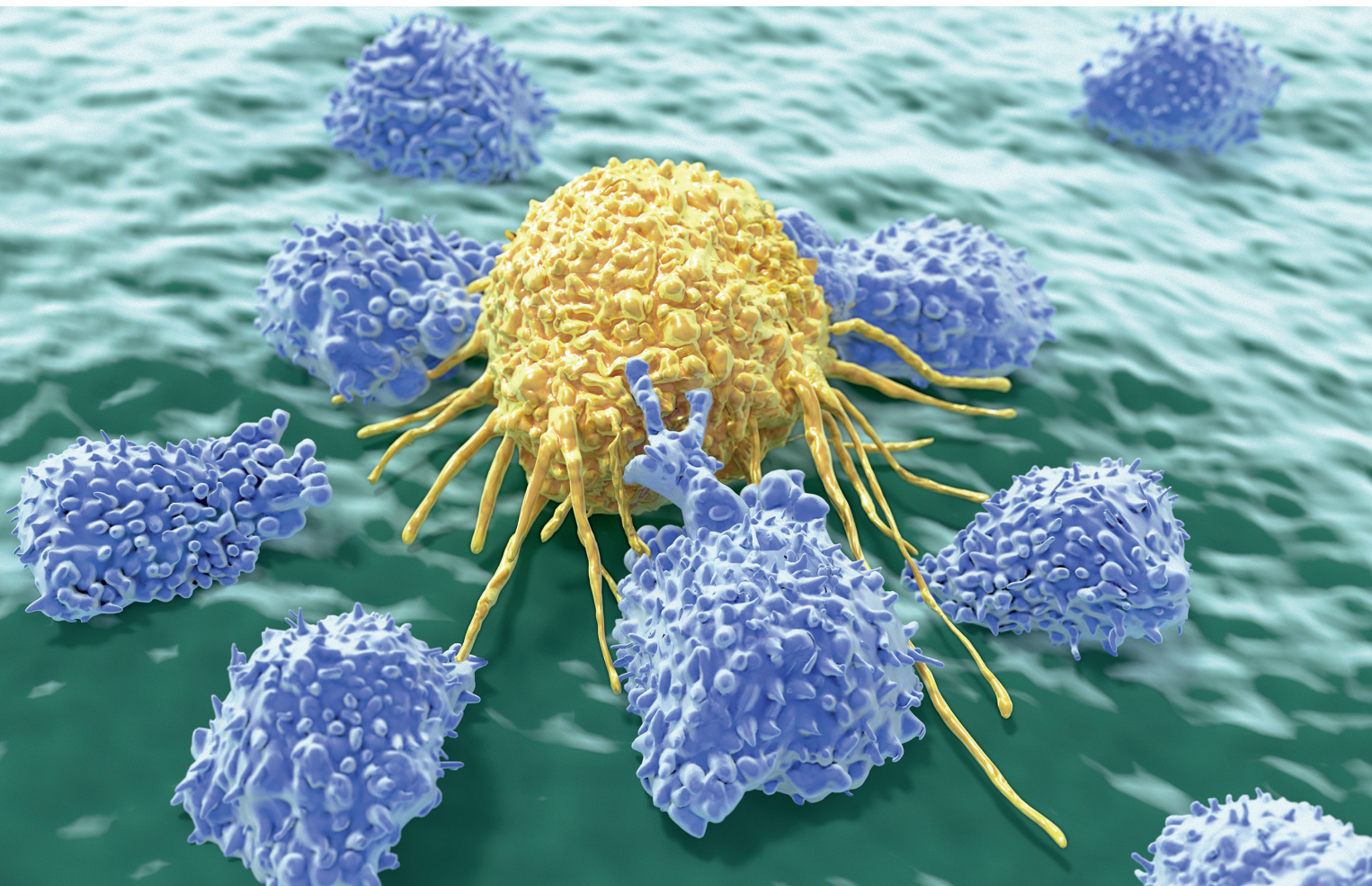




LE SYSTEME IMMUNITAIRE UN REMPART CONTRE LE CANCER

Colloque organisé sous le patronage
de L'Académie des Sciences

le Mardi 7 février 2017

dans la Grande salle
des Séances de l'Institut de France

SOMMAIRE



Avant-Propos	P.3
Introduction	P.4



PREMIÈRE PARTIE

Réponses immunitaires antitumorales	P.7
Vaccins thérapeutiques contre le cancer : état des lieux et perspectives	P.24
Traitement du mélanome par les anticorps monoclonaux	P.40



DEUXIÈME PARTIE

CAR T cells : combiner les thérapies cellulaire et génique	P.62
Contexture immunitaire et immunoscore : un nouveau paradigme en cancérologie	P.82



TABLE RONDE

Conséquences sociétales de ces découvertes	P.101
--	-------

AVANT-PROPOS



► Jean-Pierre DECOR

L'objectif de nos colloques est de nous familiariser avec les découvertes dans le domaine des sciences de la vie susceptibles d'avoir un impact direct majeur dans notre Société : faire le point sur un domaine scientifique nouveau dont les premières applications constituent un progrès pour l'Homme ou son Environnement.

Ce document a pour but de restituer le déroulement du colloque. Outre son caractère informatif pour tout public, il peut permettre une introduction aux publications scientifiques spécialisées des intervenants, pour les lecteurs qui souhaiteraient approfondir le domaine

L'Immunothérapie anticancéreuse, faisant l'objet d'un foisonnement de recherches et ayant obtenu des résultats très prometteurs en clinique, nous a semblé un bon thème pour notre colloque 2017.

Il s'agit d'un véritable changement de paradigme dans l'approche de cette maladie.

Il avait été établi que le système immunitaire exerçait un contrôle sur les cellules présentant des anomalies. On distingue trois phases : Elimination, Equilibre, Echappement.

L'Echappement constitue le stade pathologique entraînant la formation de tumeurs : les cellules tumorales ayant développé des stratégies variées pour échapper au système immunitaire.

Leur traitement classique fait habituellement appel à la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. Précédemment, des tentatives avaient été faites pour renforcer l'action du système immunitaire par des traitements avec l'interféron ou les cytokines.

Ces dernières années des progrès majeurs ont été obtenus pour redonner au système immunitaire toute son efficacité : c'est l'objet du présent colloque.

Deux stratégies sont développées pour rendre au système immunitaire toute son efficacité :

Lever les freins mis en place par les cellules cancéreuses à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules impliquées dans la régulation du système immunitaire.

Stimuler le système immunitaire vis-à-vis d'antigènes tumoraux, soit à l'aide de vaccins thérapeutiques, soit par thérapie génique appliquée en particulier aux lymphocytes T pour qu'ils puissent reconnaître et éliminer à nouveau les cellules tumorales.

Pour certains cancers les rémissions sans rechute sont telles que l'on peut parler de guérison. Ces stratégies sont à des stades divers d'avancement.

Par ailleurs, une classification des cancers entièrement nouvelle a été établie en prenant en compte la nature et l'intensité de la présence de cellules immunitaires dans les tumeurs. Cette classification appelée Immunoscore permet, à un stade très précoce, une estimation de la gravité voire le pronostic de la maladie.

L'occurrence des cancers ne peut que s'accroître avec notre espérance de vie. Sur le plan économique des solutions devront être trouvées pour que ces thérapies puissent s'appliquer au plus grand nombre.

Bonne lecture

INTRODUCTION



► Alain MÉRIEUX

Mesdames, Messieurs, bonjour. Bienvenue à ce colloque « Sciences et Société ». Merci à l'Institut de France de nous accueillir dans ce cadre prestigieux.

Il me semble important d'organiser ces rencontres ; elles constituent une interface avec la société pour s'approprier les connaissances en ayant accès à la meilleure information possible des processus de découvertes.

Ces rencontres sont nécessaires car une contradiction forte se dégage dans la société qui nous pousserait à ne faire que de la recherche appliquée et formulerait des critiques permanentes contre les applications de la science.

De plus, l'enchaînement recherche-technologie entraînant croissance et bien-être fait désormais l'objet de débats.

Donc diffuser la connaissance, expliquer les processus de découverte peut être un vecteur de cohésion sociale en évitant de générer méfiance et dans certains cas violence.

Il s'agit de diffuser les savoirs, de partager la culture scientifique pour plusieurs raisons. La recherche sur le vivant, en particulier, est remise en question par une partie de nos concitoyens.

Il est triste de voir que 41 % de la population du pays de Mr Pasteur doute de l'intérêt des vaccinations, même chose pour les OGM, l'expérimentation animale ou les cellules souches.

Par ailleurs, au niveau de la Haute Autorité de santé pour l'évaluation des médicaments, sa recommandation est basée sur l'intérêt médical mais aussi sur l'avis des citoyens par l'intermédiaire des associations. Ces dernières sont invitées à transmettre leurs attentes au retour d'expériences sur des produits en cours d'évaluation.

Notre fondation est engagée depuis longtemps dans ce type d'échanges. Le baron Edmond de Rothschild et mon père ont créé l'Institut des Sciences du Vivant car ils souhaitaient diffuser la science auprès de la société. Avec la fondation Bullukian, nous poursuivons ce type de rencontres et nous avons le privilège d'avoir le patronage d'organismes de réputation internationale comme c'est le cas aujourd'hui dans le cadre de l'Institut de France avec l'Académie des Sciences que nous remercions chaleureusement.

Je remercie également vivement Jean-Pierre DECOR pour l'organisation de ces rencontres et pour les choix particulièrement pertinents des thèmes.

Celui de cette journée est passionnant et je ne doute pas que nous aurons l'occasion d'avoir de nombreux échanges.

Je vous remercie.

(Applaudissements)



► Jean-François BACH

Tout d'abord, J'aimerais remercier Alain MÉRIEUX d'avoir rendu possible cette réunion et lui rendre hommage pour l'ensemble de son œuvre en biologie et plus particulièrement sur les maladies infectieuses. Ainsi, nous avons l'opportunité, chaque année, de travailler ensemble pour la remise d'un prix qu'il a créé pour le soutien à la recherche et à la mise en place de programmes sur les maladies infectieuses dans les pays en voie de développement.

Nous avons été particulièrement heureux à l'Académie quand Jean-Pierre DECOR, qui s'occupe très remarquablement de ces réunions, nous a proposé ce thème de l'immunothérapie du cancer avec ce programme.

En effet, nous sommes particulièrement intéressés, à l'Académie, par les thèmes transversaux interdisciplinaires concernant à la fois la recherche fondamentale et ses applications médicales. Ce sujet est bien sûr idéal et de grande actualité.

J'aimerais, à ce propos, vous dire quelques mots, non pas en tant qu'immunologiste du cancer mais en tant qu'immunologiste en général.

Cela fait longtemps que je me consacre à l'immunologie ; j'ai suivi les « péripéties » de l'immunothérapie des cancers au cours des années. Sans remonter à Georges Mathé ou au BCG, il y a eu une période de grand enthousiasme pour l'immunothérapie des cancers puis des difficultés. Le concept d'immunothérapie en cancérologie a mis longtemps à être reconnu. On ne voyait pas vraiment arriver d'application. Du point de vue fondamental, des questions se posaient suite à des tentatives comme celle de Thierry BOON en Belgique ou d'autres.

On savait qu'il existait une relation entre immunité et cancer. Cela apparaissait lors de transplantations d'organes avec les cancers viraux induits survenant chez ces patients traités par des immunosuppresseurs.

Il existait déjà une immunothérapie avec les vaccins. Le vaccin contre l'hépatite B a été la première immunothérapie parfaitement efficace dans le cas particulier des cancers du foie.

Wolf Hervé FRIDMAN évoquera certainement cette période.

L'acquisition de connaissances fondamentales associée à la technologie ont permis une évolution remarquable.

Une approche consiste à essayer de sensibiliser les malades déjà atteints d'un cancer contre les antigènes de leur tumeur ; c'est ce dont va vous parler Éric TARTOUR.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules du système immunitaire appelées « checkpoints » ont augmenté les réponses immunitaires, non seulement anti tumorales mais aussi en général.

Ce sont les anticorps dont Caroline ROBERT vous parlera.

INTRODUCTION

Ce résultat a été formidable dans ses applications cliniques, mais aussi sur le plan fondamental car il a montré que l'immunité anti-tumorale pouvait être efficace si elle était libérée de ses freins.

Une autre étape, qui sera traitée l'après-midi par Michel SADELAIN, est à l'étude. Il s'agit de l'émergence d'une immunothérapie des cancers au niveau cellulaire associée à des techniques de biologie moléculaire.

Ensuite Jérôme GALON nous montrera qu'il est possible de catégoriser les cancers en fonction de leurs possibilités de réponse aux traitements immuno- thérapeutiques

Le traitement des cancers a beaucoup bénéficié des progrès de la chimiothérapie, de la chirurgie et d'autres techniques, mais avec des limites pour certains cancers et des succès pour d'autres.

L'immunothérapie, comme nous allons le voir, offre la possibilité de proposer des traitements efficaces dans un nombre important de cancers, y compris pour ceux dont la science restait complètement désarmée.

Ce colloque est une très bonne occasion de faire le point sur ce sujet. Nous avons cinq orateurs remarquables et je me réjouis à l'avance, comme vous, de ce que nous allons entendre aujourd'hui.

(Applaudissements)

Wolf Hervé FRIDMAN

Hôpital européen Georges Pompidou, Université Paris-Descartes, Inserm

► Sébastien AMIGORENA

Je vais présenter notre premier orateur.

Hervé FRIDMAN a joué un rôle très important de pionnier dans l'immunologie des cancers au niveau mondial. En France, des intervenants de ce colloque et moi-même, comme la plupart des immunologistes spécialisés en cancérologie, sont issus de son laboratoire. Il a eu une influence déterminante au niveau conceptuel et pour l'avancée des connaissances. Il a une vue globale du domaine très impressionnante. Il a apporté des contributions majeures pour le diagnostic. Cet après-midi, vous entendrez un de ses brillants élèves, Jérôme GALON.

C'est vraiment un plaisir d'avoir Hervé FRIDMAN, comme premier orateur pour cette journée d'immunothérapie des cancers.



► Wolf Hervé FRIDMAN.

Je suis très heureux d'intervenir en introduction de cette journée. Je suis très content que les Fondations et l'Académie des Sciences reconnaissent l'importance de l'immunothérapie des cancers.

Pendant des années, c'était un thème délaissé, aujourd'hui c'est tout le contraire !

J'ai choisi d'abord de vous présenter les bases historiques de l'immunothérapie.

Dans la deuxième partie de mon exposé, j'insisterai sur quelques faits marquants et sur les questions qui restent en suspens.

Il y a cent ans déjà, Paul EHRLICH disait que le système immunitaire a un impact sur la fréquence des cancers. Peu de temps après, William COLEY a montré que les cancéreux qui avaient des infections aiguës pouvaient voir leur cancer régresser spontanément. Cela a donné naissance à l'utilisation d'extraits bactériens pour traiter le cancer comme l'a fait Georges MATHE. Mais les désillusions ont été nombreuses et il ne reste aujourd'hui que le traitement adjuvant par le BCG du cancer superficiel récidivant de la vessie. Cinquante ans plus tard, deux personnes, Mc FARLANE-BURNETT et Lewis THOMAS ont créé la théorie de la surveillance immunitaire :

Immunosurveillance: first theories

Paul Ehrlich, 1909

The immune system may influence the frequency of cancers

Sir Mac-Farlane Burnett, 1957

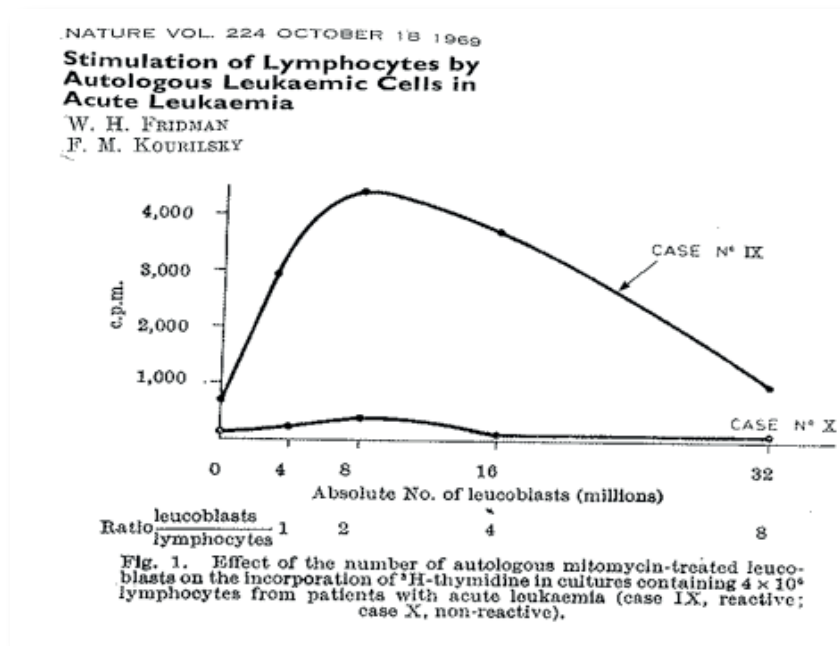
« It is by no means inconceivable that small accumulations of tumour cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of its existence »

Lewis Thomas, 1957

« It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for eliminating or inactivating such potentially dangerous mutant cells and it is speculated that this mechanism is of immunological character »

RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

En 1966, avec François Kourilsky, dans le service de Jean BERNARD et Jean DAUSSET à l'Hôpital Saint Louis, nous avons mis en rémission des leucémiques. François KOURILSKY avait eu l'idée de congeler et de mélanger les blastes oncologiques avec les lymphocytes de rémission. Nous avons ainsi démontré que dans certains cas, il y avait une réaction immunitaire cellulaire vis-à-vis de leurs propres cellules tumorales.



Dans le même temps, George KLEIN, avait détecté des anticorps vis-à-vis des cellules tumorales.

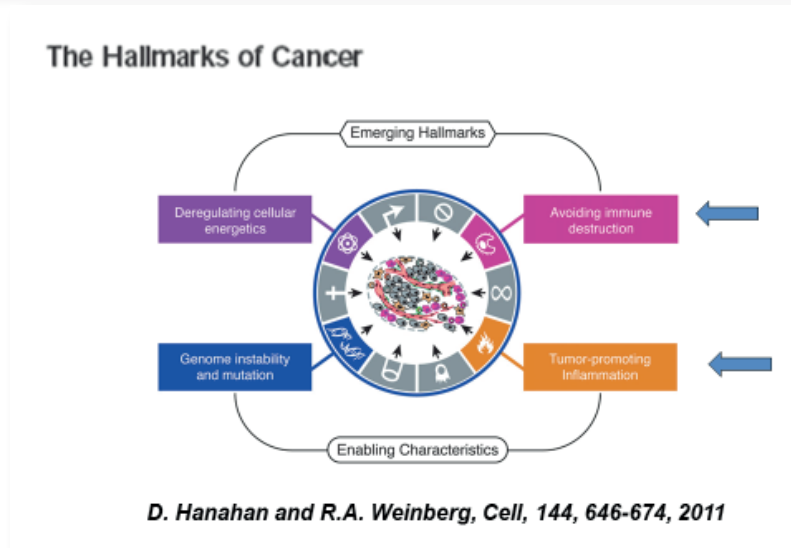
Les réactions immunitaires ont commencé à être étudiées. Vingt-cinq ans plus tard, en 1991, Thierry BOON a identifié des antigènes tumoraux.

En 2000, deux grands noms de la cancérogénèse, Douglas HANAHAN et Robert WEINBERG, ont publié leur fameux « The Hallmarks of cancer », c'est-à-dire les conditions nécessaires à la formation d'un cancer.

Mais, pas un mot sur le système immunitaire ! Cela un siècle après les travaux d'EHRlich et William COLEY...

Toutefois dix ans plus tard, ces mêmes auteurs publient une nouvelle revue mettant en évidence deux caractéristiques impliquant le système immunitaire :

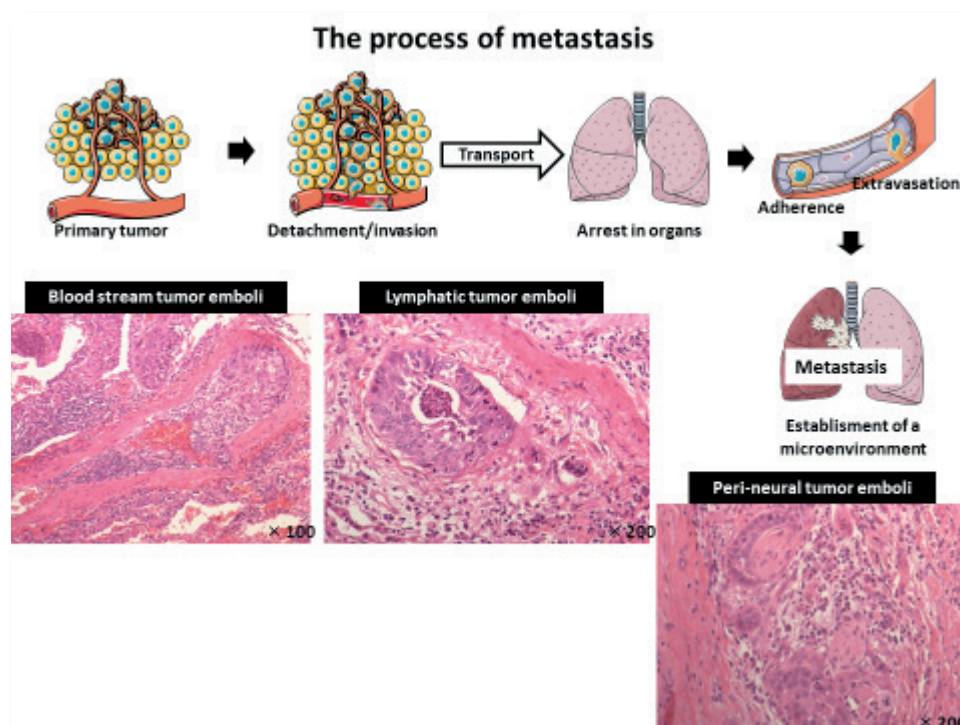
1. L'une est l'inflammation qui favorise l'oncogenèse ;
2. L'autre est la nécessité d'échapper au système immunitaire.



Dans les années qui suivirent, tous les grands journaux ont fait leur Une sur l'immunothérapie des cancers. En très peu de temps, l'immunothérapie jusqu'alors ignorée est devenue un élément majeur pour le traitement des cancers.

Que s'est-il passé pendant ces dix ans ?

Il s'est produit une prise de conscience qu'un cancer n'est pas seulement des cellules tumorales comportant des modifications génétiques somatiques, voire germinales pour certains gènes favorisants, mais qu'elles doivent se développer dans un tissu. Au niveau de la tumeur primitive le cancer va devoir d'abord envahir le tissu. Puis, des cellules tumorales vont, à travers les vaisseaux sanguins, les faisceaux lymphatiques ou le long des nerfs, être transportées à distance dans des organes. Ce processus va recommencer avec un nouveau développement et une interaction avec ce nouveau microenvironnement.



RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

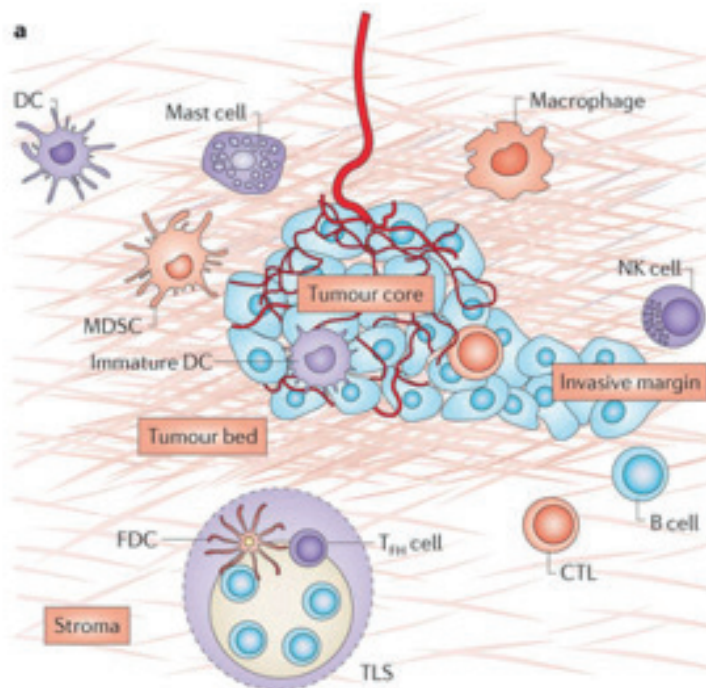
Ce phénomène a été beaucoup étudié chez des souris immuno-incompétentes par le groupe de Bob SCHREIBER à Saint-Louis dans le Missouri. Il a simplement observé vieillir des souris complètement immuno-incompétentes, sans système de réaction adaptative, sans immunité innée. 100 % de ces souris ont développé des tumeurs sans qu'il soit nécessaire de leur injecter un anti-CD3 ou de leur faire de l'immunosuppression, processus que Jean-François BACH connaît bien. En l'absence de système immunitaire, les mutations s'accumulent et vont finir par donner un cancer.

Puis, il y a eu les travaux réalisés en grande partie dans mon laboratoire, par Éric TARTOUR, Franck PAGES, Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN et Jérôme GALON. Ce dernier en parlera plus en détail tout à l'heure. Toutefois je vais évoquer quelques faits marquants en guise de fil conducteur:

Tout d'abord, nous avons constaté que toutes les cellules du système immunitaire étaient présentes dans un environnement tumoral : des lymphocytes T et B, des macrophages, des NK, des cellules mastocytaires, myéloïdes et des îlots lymphoïdes attachés à cette tumeur.

Deuxième élément, cet environnement immunitaire est organisé. On retrouve ces cellules au centre de la tumeur, dans la marge d'invasion et dans ces structures lymphoïdes.

The immune microenvironment



W H Fridman et al., Nature Rev. Cancer, 12, 298-306, 2012

Les cancers sont habituellement classés par leur capacité d'invasion en grade 1, 2, 3, 4. Le grade 1 correspond à des petites tumeurs non invasives, le grade 2 à des tumeurs localement invasives, le 3 à l'envahissement ganglionnaire et le 4 à des métastases à distance.

Si on coopte la survie sans récurrence, 20 % des cancéreux avec des petites tumeurs non invasives rechutent, 30 % lorsque la tumeur est plus invasive, 40 % lorsqu'il s'agit de tumeur ganglionnaire et tous lorsqu'il s'agit de tumeur métastatique.

Il y a 10 ans déjà, Franck PAGES et Jérôme GALON ont analysé en laboratoire un millier d'études de cancers colorectaux qui avaient été annotés dans le service du regretté Paul-Henri CUGNENC par Anne BERGER. Ils ont montré que la présence de cellules T mémoires dans le centre de la tumeur et dans la marge d'invasion était extrêmement importante pour le pronostic. En effet, des tumeurs avec un environnement ganglionnaire dont la densité était élevée ont un meilleur pronostic que parfois des petites tumeurs non invasives. Plus important et impressionnant, les tumeurs qui ont perdu ou qui n'ont jamais eu ces cellules T mémoires, même les petites non invasives, s'accompagnent d'une rechute pour tous les patients. Cela a été un changement de paradigme. Ils ont développé un « *Immunoscore* » dont Jérôme GALON vous parlera longuement.

Ainsi, on avait osé écrire que l'évaluation du type, de la densité et de la localisation de la réaction immunitaire *in situ*, dans des territoires tumoraux distincts prédisait la réponse du patient et sa survie bien mieux que ce qui était utilisé jusqu'à présent.

Quelle est donc la nature de la réaction immunitaire et où a-t-elle lieu ?

Tous les immunologistes vous répondront qu'elle a lieu dans le ganglion. Le problème est que le ganglion est aussi le premier endroit où les cellules métastatiques s'installent.

Pour éclaircir ce point, Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN et son équipe, en observant un cancer du poumon, un adénocarcinome épidermoïde, ont remarqué la présence de nombreuses formations lymphoïdes autour des massifs tumoraux.

Ces formations lymphoïdes sont très semblables à ce qui se passe dans un ganglion. Il y a des cellules dendritiques matures qui présentent les antigènes en contact avec les lymphocytes CD3, entourés de vaisseaux particuliers appelés « *high endothelial venules* ». Ils permettent l'entrée des lymphocytes directement dans la circulation. C'est le seul endroit où l'on trouve des lymphocytes naïfs échappant au milieu inflammatoire et suppresseur de la tumeur. Puis, il y a une zone B qui possède des follicules lymphoïdes.

Quand une inflammation chronique dure, ces structures lymphoïdes tertiaires, présentes aussi dans les maladies inflammatoires et auto-immunes, sont capables d'activer les cellules T et leur faire produire vis à vis des antigènes tumoraux des anticorps pour les lymphocytes B et des réponses T pour les lymphocytes T.

Examinons comment se produisent les anticorps.

Si l'on considère un ganglion et un poumon avec les structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Il y a de nombreux lymphocytes B et des enzymes AID qui servent à la mutation. Les cellules B prolifèrent, exprimant BCL6. Puis, des plasmocytes quittent ces structures. Dans les structures lymphoïdes tertiaires, ces ganglions ont tout ce qu'il faut pour fabriquer des anticorps.

RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

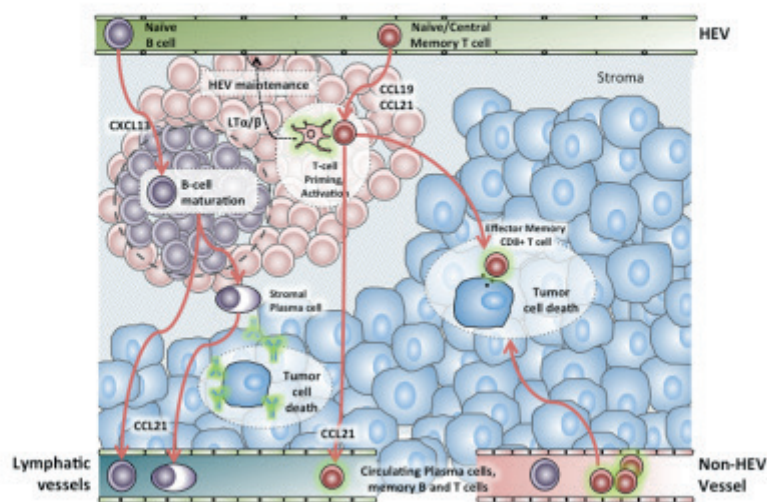
Fabriquent-ils effectivement des anticorps ? La réponse est oui. C'est un travail mené en collaboration avec le centre Kettering à New York qui a montré l'activité des surnageants de ces lymphocytes B en présence d'une série d'antigènes tumoraux. Dans un poumon, on a à la fois la production d'IgG et d'IgA par ces cellules vis-à-vis d'une série d'antigènes tumoraux. Il est donc possible d'éduquer au site de la tumeur la réaction immunitaire et on peut d'ailleurs retrouver ces anticorps dans la circulation.

Notre vision de la réaction immunitaire anti-tumorale est donc la suivante : des lymphocytes B et T naïfs entrent directement dans ces structures lymphoïdes tertiaires (TLS) en échappant à l'immunosuppression et à l'inflammation de la tumeur. Ils sont éduqués par des cellules dendritiques matures pour les lymphocytes T et par des cellules folliculaires dendritiques pour les B. Certaines vont aller dans la tumeur primitive détruire les cellules cancéreuses et produire des anticorps. Mais aussi elles vont circuler dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins conventionnels devenant des lymphocytes T et B mémoires, capables de contrôler d'éventuelles cellules métastatiques qui auraient échappé à la tumeur.

TLS as conductors of the adaptive intra-tumor and systemic immune responses against cancer

(MC Dieu-Nosjean et al, *Immunol Rev*, 271, 260-275, 2016)

Fig. 1



Avec Jérôme GALON nous avons décrit la texture immunitaire dans la tumeur :

Le type de cellules cytotoxiques mémoires ;

Leur densité ;

Leur orientation fonctionnelle :

- TH1 ;
- Les facteurs associés, par exemple, la signature Interferon-gamma, la production de granzymes, de perforin, de granulysin par ces lymphocytes T cytotoxiques ;
- Les chimiokines qui attirent les lymphocytes B et aident à former les structures lymphoïdes tertiaires ;

Leur localisation ;

La présence et la qualité de ces structures lymphoïdes tertiaires.

Cette texture immunitaire définit l'impact du système immunitaire sur la survie des patients.

Ce concept a été confirmé par beaucoup d'immunologistes.

Quand il y a une forte réaction d'infiltration de lymphocytes TH1 avec une signature Interféron-gamma des lymphocytes T cytotoxiques, c'est de bon pronostic.

Pour les autres sous-classes de lymphocytes T (TReg, TH17, TH2) dans la moitié des cas, c'est plutôt un mauvais pronostic et dans l'autre moitié, l'impact est nul, voir positif en fonction du degré d'inflammation.

Toutefois, le microenvironnement peut produire des contre-exemples.

Les cellules les plus fréquentes dans ce microenvironnement ne sont pas les lymphocytes mais les macrophages. Or, une catégorie de macrophages, appelés M2, produit des facteurs de néo-vascularisation, des facteurs suppresseurs. Pratiquement dans tous les cas, ces macrophages ont une variété que l'on appelle les cellules myéloïdes dendritiques suppressives ; leur présence en nombre est un mauvais pronostic.

En conséquence, la composition de la texture immunitaire prédit la réponse. Il est essentiel que les cellules CD8 TH1 soient présentes en grande quantité. Même s'il y a une forte infiltration de lymphocytes CD8, elle peut être accompagnée de texture immunitaire différente qu'il y ait ou non des TLS, de l'exhaustion de lymphocytes T.

A titre d'illustration, une classification consensuelle de cancers colorectaux ; il s'agit d'un travail effectué en collaboration avec l'équipe de Pierre Laurent PUIG.

Par l'expression de leurs gènes et l'analyse transcriptomique, les cancers colorectaux peuvent être classés en 4 catégories :

- 1** - Une catégorie de bon pronostic constituée en grande partie par les cancers qui ont des instabilités microsatellitaires, donc beaucoup de néoantigènes potentiels, des mutations très importantes. Souvent situés dans le colon droit, ils représentent 15 % des cas;
- 2** - Une catégorie que l'on appelle canonique parce qu'elle suit le modèle de Burg Fogenstein avec activation de bêta-caténine Wnt et MYC ;
- 3** - Une catégorie métabolique avec des mutations KRAS qui les rendent insensibles à un traitement par un anticorps monoclonal ;
- 4** - Une quatrième catégorie mésenchymale (un quart des patients) avec une transition épithélio-mésenchymateuse, une infiltration stromale, une activation de la voie TGF- β , beaucoup d'angiogenèse.

RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

The consensus molecular subtypes of colorectal cancer

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

J Guinney et al, Nature Med, 21, 1350-56, 2015

Concernant la possibilité de survie sans récidence, le groupe 1 (MSI et quelques autres hyper mutés) se comporte très bien. 2 et 3 sont intermédiaires. 4 est vraiment très mauvais.

Nous avons analysé l'expression de gènes de l'immunité dans ces différentes populations.

Le groupe 1 est un groupe classique. Il a beaucoup de lymphocytes cytotoxiques, un peu d'infiltrations inflammatoires et très peu de cellules endothéliales et fibroblastiques.

Les groupes 2 et 3 sont des « déserts immunitaires ». Or, ils représentent la moitié des cancers colorectaux.

Le groupe 4 mésenchymateux est plein de lymphocytes mais non cytotoxiques dans un contexte inflammatoire et angiogénique important et avec de nombreux fibroblastes.

C'est la raison pour laquelle les réponses positives sont seulement dans 20 à 30% des cancers colorectaux

Les cellules tumorales jouent un rôle majeur dans la construction de leur microenvironnement.

Il y a deux types de cellules tumorales :

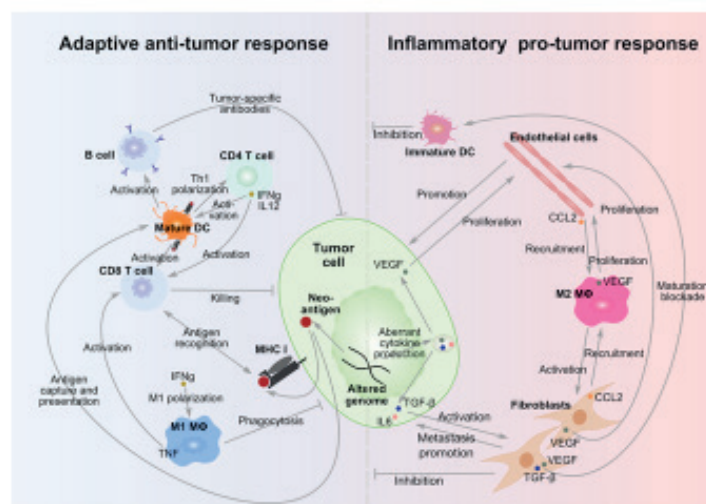
L'un correspond au groupe hyper muté, fabriquant des néoantigènes associés aux molécules hysto-compatibles classe 1. Les cellules dendritiques qui deviennent matures présentent cet antigène aux lymphocytes T et B. Il y a une production Interféron-gamma qui induit des macrophages M1, les bons macrophages anti-tumoraux. Il y a production d'anticorps, de lymphocytes cytotoxiques et cette tumeur peut être contrôlée.

Pour d'autres tumeurs, celles du groupe 4 présentent une dérégulation d'un certain nombre de gènes de cytokines qui se mettent à produire le TGF- β , fort facteur immunosuppresseur, de l'IL6, fort facteur pro inflammatoire, du VEGF induisant des cellules endothéliales et de la vascularisation. Ceci recrute des fibroblastes qui renforcent le phénomène en

produisant également du VEGF, du TGF- β . Les macrophages sont de type M2, de très mauvais pronostic, ils produisent du VEGF qui augmente la néovascularisation. Les cellules dendritiques sont immatures ce qui induit des lymphocytes dérégulateurs et le blocage de la réaction immunitaire.

Il est même possible qu'au sein d'une même tumeur, les deux mécanismes se déroulent en même temps.

The complex interactions between malignant, stromal and immune cells of the tumor microenvironment



Becht E, Giraldo NA et al, Adv Immunol, 130, 95-190, 2016

Connaissant tout cela, quel peut être le but de l'immunothérapie ?

Le but ultime est de modifier le microenvironnement tumoral à la fois dans des sites primaires et métastatiques pour augmenter le ratio de cellules T cytotoxiques matures anti-tumorales sur les mécanismes suppresseurs inflammatoires avec leurs médiateurs et d'induire ou augmenter la réaction systémique anti-tumorale de façon à contrôler les cellules métastatiques à distance.

Dans cette deuxième partie de l'exposé je vais aborder les stratégies en immunothérapie. Elles seront développées plus en détail au cours des exposés suivants.

On peut les classer en deux catégories :

L'immunité active d'abord pratiquée avec des cytokines en particulier l'interleukine 2 (IL 2) et l'interféron avec une bonne efficacité mais souvent associée à une toxicité très importante. Elle est actuellement moins utilisée, particulièrement avec l'IL2.

L'immunité active peut être induite par la vaccination thérapeutique (Elle fera l'objet de la conférence d'Éric TARTOUR) et également par les « *anti check-points* » qui constituent le grand succès actuel.

RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

L'immunité passive opère avec des anticorps anti-tumeurs ou des lymphocytes T. Mais, *in fine*, elle n'est pas complètement passive. Nombre d'éléments démontrent qu'elle induit une mort immunogénique qui, à son tour, va induire des lymphocytes T capables de contrôler la tumeur avec un effet à long terme. Cela sera développé par Michel SADELAIN .

La découverte de protéines régulatrices du système immunitaire appelées « *checkpoints* » (point de contrôle du système immunitaire) ont permis de changer de paradigme en immunothérapie.

Jusque-là, on essayait de traiter la cellule tumorale elle-même. Depuis une dizaine d'années, on s'est préoccupé des lymphocytes pour les rendre plus efficaces.

Les 2 grands « *checkpoints* » sur le lymphocyte sont CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen) et PD-1 (Programmed cell Death).

CTLA-4 a été découverte en France par Pierre GOLDSTEIN. Il l'a clonée dans des CTL (*cytotoxic T-lymphocyte-associated*). Cette protéine empêche le système immunitaire d'augmenter la production de cellule T. Lorsqu'une cellule présente un antigène, il y a une co-stimulation via CD28, la cellule s'active et met un frein qui a une plus forte affinité pour le même corécepteur CTLA-4.

PD-1 du ganglion se lie à PD-L1 de la cellule tumorale et la rend invisible au lymphocyte. L'idée de bloquer cette inhibition et de revigorer les lymphocytes a été développée par James ALLISON. Les inhibiteurs de PD-1 et PD-L1 agissent en empêchant PD-1 et PD-L1 de se lier. Les cellules cancéreuses perdent alors leur capacité de tromper le système immunitaire.

Caroline ROBERT vous développera, en détail les traitements par les anticorps monoclonaux.

A partir des illustrations suivantes, je souhaite seulement souligner quelques points importants.

Anti-CTLA4 in Metastatic Melanoma



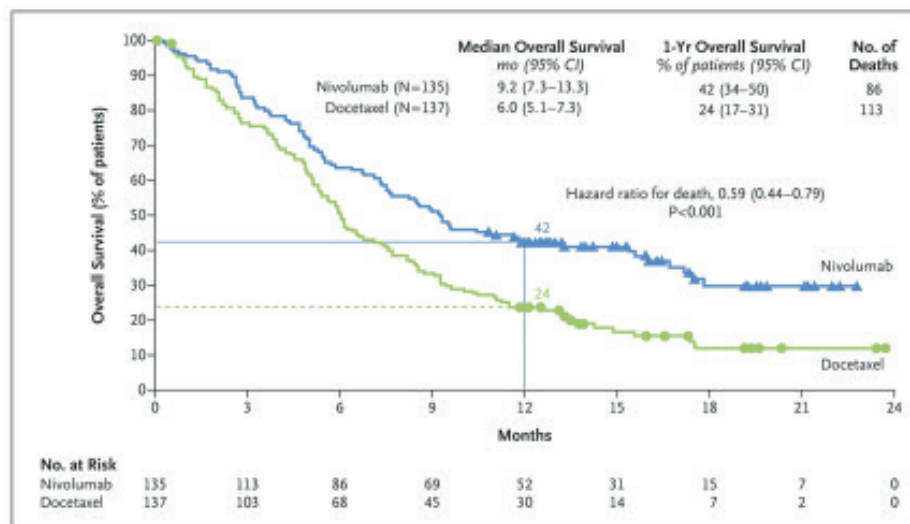
Hodi et al.
Abstract #3008
ASCO 2008

Ce mélanome métastatique traité par anti CTLA-4 montre combien c'est remarquable. Il faut toutefois attendre plus d'un an pour avoir une réponse complète.

En effet, l'anti CTLA-4 met du temps à se mettre en place, avec des mois sans évolution et seulement 25 % des patients sont guéris. Toutefois avant 2010, l'espérance de vie avec des mélanomes métastatiques n'était que de quelques mois.

De même jusqu'à maintenant, le cancer du poumon n'avait pas de traitement réellement efficace. Avec un anti PD-1, on observe le même résultat : la réponse met également du temps à se développer mais 30 % des patients peuvent être guéris.

Kaplan-Meier Curves for Overall Survival in Squamous Cell Non Small Lung Cancer.



Brahmer J et al. N Engl J Med 2015;373:123-135



Quels sont les patients qui vont répondre à l'immunothérapie ?

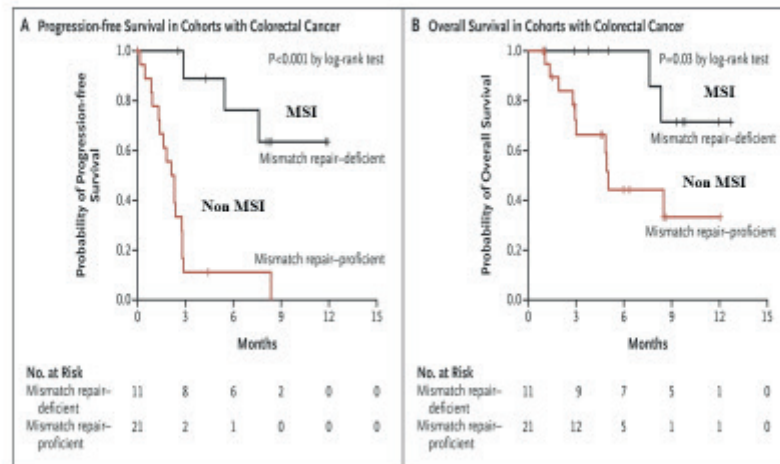
En principe, pour répondre à l'immunothérapie, il faut qu'il y ait des lymphocytes T à réactiver comme cible. Ainsi en observant les tumeurs répondant à PD-1, elles comportent une forte infiltration de lymphocytes T.

Or, comme dans les gliomes, les tumeurs neuroendocrines n'ont pas de lymphocytes, de ce fait l'immunothérapie n'a pas d'effet.

Tony RIBAS l'a très bien démontré dans le mélanome : par un traitement anti PD-1, chez les patients présentant des lymphocytes T dans la marge d'invasion. Les lymphocytes T potentiellement cytotoxiques s'activent, pénètrent au sein de la tumeur et peuvent la détruire.

Outre les lymphocytes, pour que le système immunitaire fonctionne et soit réactivé, il faut des antigènes dans les cellules tumorales. Plus les cellules présentent des mutations, plus il y a des chances d'en avoir.

Clinical benefit of pembrolizumab treatment according to mismatch-repair status in patients with colorectal cancer

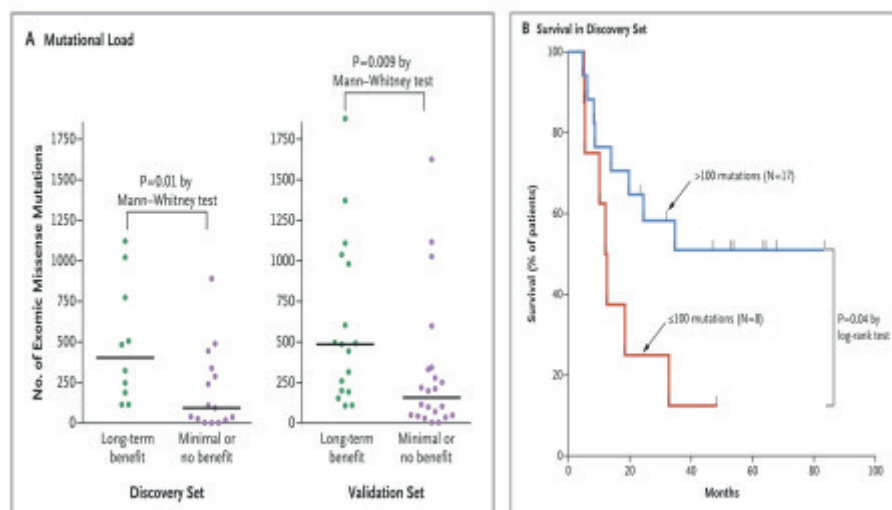


Le DT, et al. *N Engl J Med* 2015;372:2509–2520.

Une publication récente a montré que 80 % des patients répondent, quand ils présentent le défaut des gènes de réparation de l'ADN, que ce soient des cancers colorectaux ou d'un autre type. Sur le graphique, la survie globale sans progression est de 60 % pour ces patients, alors que tous les autres ont rechuté.

Ce n'est pas absolu, mais plus les mutations sont nombreuses, plus les réponses sont favorables. Sur le graphique suivant, pour les mélanomes traités par CTLA-4 : s'il y a 100 mutations par tumeur, il y a 50 % de survivants sept ans plus tard. Dans le cas contraire tous ont rechuté.

Mutational landscape of tumours according to clinical benefit from ipilimumab treatment



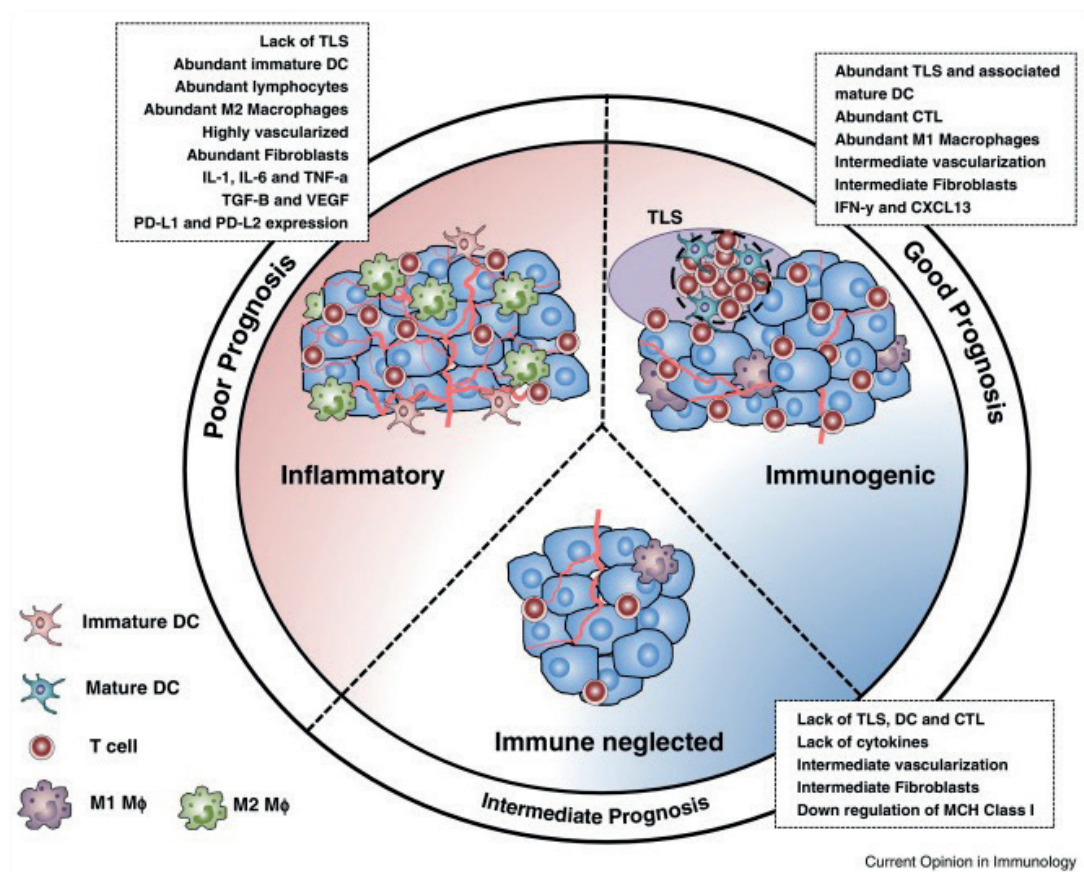
A Snyder et al, *N Engl J Med*, 371, 2189-2199, 2014

RÉPONSES IMMUNITAIRES ANTITUMORALES

Nous sommes dans le cas classique d'immunologie : il faut des lymphocytes T, des mutations et que le système fonctionne. Nous pouvons prévoir, pour chaque type de cancer, mélanome, poumon, colon MSI, en fonction des mutations et des potentiels néo-antigènes des cellules tumorales, ceux qui répondront à l'immunothérapie.

A l'opposé, pour la maladie de HODGKIN avec très peu de mutations, pas de complexe d'histocompatibilité MHC classe 1, à la surface, pas de lymphocyte T infiltrant, 90 % des patients meurent.

Nous classons les tumeurs dans la roue de la fortune immunologique en trois grandes catégories



Les tumeurs de bon pronostic qui sont immunogéniques contiennent des cellules tumorales avec des néo-antigènes, des cellules dendritiques matures, des lymphocytes T, des CD8, des structures lymphoïdes tertiaires et une signature d'interféron gamma.

Les tumeurs négligées ou « les déserts immunitaires » ont un pronostic intermédiaire car ils ne contiennent pas de cellule immunitaire. Nous avons vu un exemple dans le cancer colorectal.

Les tumeurs inflammatoires ont un très mauvais pronostic : elles ont des lymphocytes T à l'intérieur, mais c'est complètement désorganisé. Elles n'ont pas de structures lymphoïdes tertiaires. Elles ont de nombreux macrophages M2. Elles sont vascularisées. Elles sont remplies de cytokines pro-inflammatoires, de fibroblastes. Tout cela empêche la réaction immunitaire de se mettre en place.

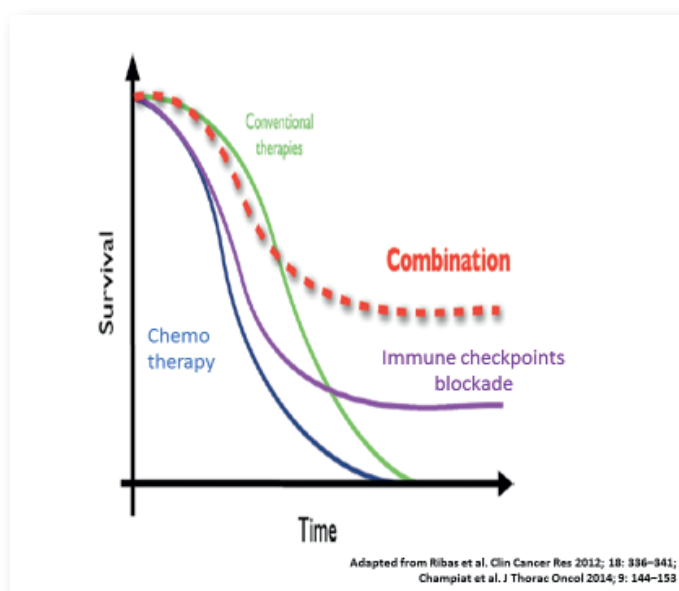
Selon la tumeur, les approches d'immunothérapie doivent être différentes.

Si nous avons une tumeur immunogénique, il faut la traiter avec un ou deux « *anti-checkpoints* » et peut-être un vaccin pour diriger la réponse.

Si nous n'avons pas de lymphocytes T, il faut en apporter avec le système « CARs T-cell, » (transfert adoptif de lymphocytes) avec des anticorps spécifiques. Ce point sera développé par Michel SADELAIN.

Dans les tumeurs inflammatoires, il faut d'abord éteindre l'incendie avec des anti-angiogéniques, des anti-suppresseurs avant de traiter avec des « *anti-checkpoints* ».

Sur le graphique classique suivant sont comparées les survies suivant les traitements avec les chimiothérapies ou la radiothérapie.



Les traitements classiques font disparaître une partie importante de la tumeur, mais *in fine*, à part pour les cancers du testicule et les cancers hématologiques, sur le long terme, on ne gagne pas beaucoup d'années de vie. Dans les « *checkpoints* », cela met du temps à se mettre en place, mais de nombreux patients semblent guéris.

Habituellement, je termine sur ce point mais quelques publications récentes appellent à la prudence.

Non seulement, il y a des résistances primaires à l'immunothérapie car seuls 20 à 30 % des patients y répondent positivement, mais il s'installerait des résistances secondaires car des patients qui ont répondu positivement rechutent.

Parmi ces résistances, certaines sont inattendues. Dans un article, Antoni RIBAS, décrit des mutations de JAK1 et JAK2 qui sont des molécules de signalisation en réponse à l'interféron gamma. Quand il n'y a pas de réponse à l'interféron gamma, il n'y a pas d'action sur la cellule tumorale. Il a aussi présenté un cas plus inquiétant de mutation de Beta-2-microglobuline et il y en aurait d'autres.

La Beta-2-microglobuline permet l'expression membranaire des molécules HLA de classe 1.

Quand vous n'avez plus de Beta-2-microglobuline, il n'y a plus de possibilité de présenter un néo-antigène à un lymphocyte T. Dans ce cas, vous avez créé une cellule au sein de votre patient qui n'est absolument plus contrôlable par cette réponse immunitaire T mémoire.

Quelle peut être la raison de ce type de résistance ?

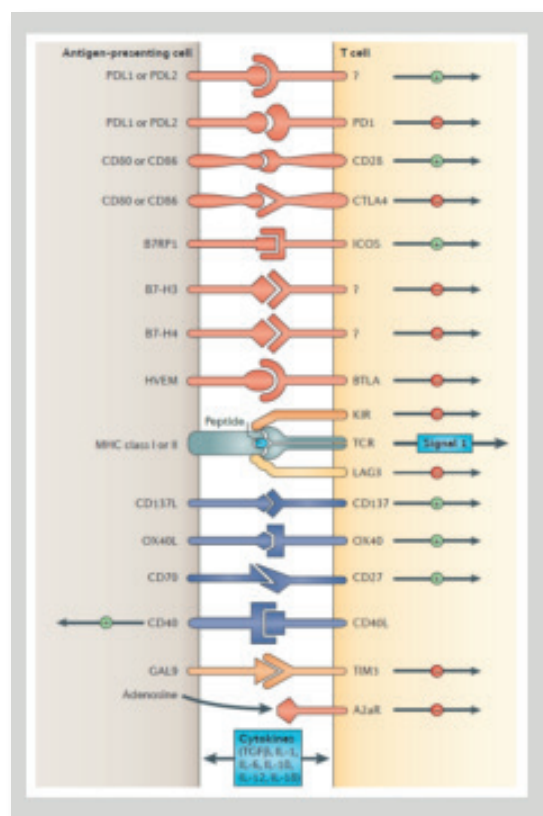
Selon mon interprétation, elle pourrait être liée au temps nécessaire à ce que l'effet se manifeste. Pendant ces quelques mois, la tumeur, déjà présente depuis quelques années, aurait le temps de s'adapter. La question est de savoir s'il s'agit d'un phénomène très rare ou relativement fréquent.

Y a-t-il des résistances à toute la classe de traitement dans la machinerie antigénique ? Le problème est que nous n'avons pas de bons modèles animaux développant des tumeurs à croissance lente pour étudier ces questions.

Il faut traiter d'emblée avec des approches combinées et revenir à la recherche fondamentale :

- Ne pas traiter pour rien des tumeurs qui ne répondraient pas,
- Développer les modèles précliniques pour répondre à ces questions de l'immunocompétence,
- Étudier les réactions primaires et secondaires,
- Combiner les immunothérapies avec des chimiothérapies et des radiothérapies pour tuer le plus rapidement possible le maximum de cellules en même temps qu'est induite cette réaction immunitaire.

Cette diapositive vous montre que nous ne sommes qu'au début de l'histoire. Je vous ai parlé de deux molécules. Il y en a de nombreuses autres rien que pour les « checkpoints ».



Les résultats que je vous ai présentés sont ceux de Jérôme GALON, Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN, Jérémie GOC, Étienne BECHT, Nicolas GIRALDO avec l'aide de beaucoup de collaborateurs : pathologistes, informaticiens et chirurgiens.

Je vous remercie de votre attention.

(Applaudissements)

► **Sébastien AMIGORENA.** - Merci beaucoup pour ce très bel exposé. Nous avons le temps pour quelques questions.

► **Moshe YANIV.** - Merci pour cet exposé extraordinaire. Vous n'avez pas parlé des tumeurs viro-induites avec la présence d'antigène. Ces tumeurs expriment une très faible concentration de HLA dès le début. Existe-t-il un moyen de s'attaquer à ces tumeurs ?

► **Wolf Hervé FRIDMAN.** - Oui, je n'en ai pas parlé car je subodore qu'Éric TARTOUR va développer ce point. Effectivement, les tumeurs viro-induites devraient être très sensibles à la réaction immunitaire, puisqu'elles ont des antigènes viraux codés par le virus exprimés à la surface.

Une meilleure démonstration de la puissance du système immunitaire pour contrôler les tumeurs est le cas des virus EPV, plus encore que les papillomavirus.

Suite à une mononucléose infectieuse, un virus EPV quiescent se trouve dans nos lymphocytes B. S'il n'y avait pas de réaction immunitaire puissante dans des zones pas impaludées, un lymphome de BURKITT ou un cancer du nasopharynx postérieur se serait déclaré.

Éric TARTOUR pour sa thèse a travaillé sur le cancer du col de l'utérus et le *shift* dans la réaction immunitaire au fur et à mesure que le cancer avançait.

Grosso modo, à partir du moment où la production d'interféron gamma diminuait la tumeur échappait à la réaction immunitaire,

elle n'avait presque plus de MHC classe 1, développait souvent des MHC classe 2, donc induisait une réaction immunitaire déviée aussi dans l'environnement. Les patientes récidivaient ou mourraient dans les deux ans qui suivaient.

En revanche, tant qu'il y avait ce contrôle du MHC classe 1, de la présentation d'antigènes potentiellement viro-induits, il y avait un très bon contrôle naturel de la tumeur.

Quand la pression immunitaire est très forte, les mécanismes d'échappement sont de deux types : régulation négative des présentations, mais aussi production de facteurs déviant la réaction immunitaire, évolution d'une réaction de type cytotoxique contrôlée vers une réaction inflammatoire chronique, qui n'est pas capable de contrôler la tumeur.

► **Gérard ORTH.** - Vous avez cité Lewis THOMAS. Il a été fasciné par le phénomène de la régression des verrues. Il a observé un enfant avec le visage couvert de verrues et il en a vu disparaître une vingtaine d'un seul coup. Visiblement, il y avait des signes cliniques d'inflammation. Une verrue plane est une lésion viro-induite qui peut se transformer en tumeur. Ces tumeurs bénignes, mais aussi des lésions précurseurs des cancers du col, induisent une réaction immunitaire.

Lewis THOMAS voulait créer l'institut de la verrue, car il estimait que, dès lors que nous comprendrions comment une verrue régresse, nous aurions compris comment le cancer sera vaincu. C'est un visionnaire.

Lors de votre exposé sur l'immunité anti-tumorale. Chacun a pu voir les succès et les exceptions. Il y a la non-présentation des néo-antigènes, la mise en place de mécanismes suppresseurs.

► **Wolf Hervé FRIDMAN.**- Tout à fait. C'est très amusant à voir que ce soit dans les verrues qui peuvent devenir malignes ou dans les lésions dysplasiques du col qui deviennent à leur tour malignes, nous avons une réponse TH1 cytotoxique qui évolue vers d'autres réponses. Sous la pression de la tumeur, l'activité du système immunitaire est déformée et déviée.

Le deuxième point est que la régression est la règle jusqu'à un certain temps. Si nous étions tous bicenténaires, nous aurions tous un cancer. Je suis persuadé que grand nombre d'entre nous ont déjà des cancers naissant sans que nous le sachions.

Selon l'expérience de Bob SCHREIBER, tant que notre système immunitaire est en forme le cancer est l'exception ; mais quand il commence à ne pas aller très bien, les cellules font des erreurs et nous ne les contrôlons plus.

► **Marc BONNEVILLE.**- Dans votre modèle, vous décrivez des réponses adaptatives protectrices, des réponses inflammatoires chroniques pro-tumorales. Comment imagineriez-vous la transition de l'une à l'autre ? Par rapport aux données récentes suggérant des mutations dans la réponse à l'interféron au niveau des tumeurs, est-ce une des voies majeures qui pourraient conduire à l'évolution vers un environnement plutôt inflammatoire pro-tumoral ? Plus globalement, des tumeurs intrinsèquement non répondeuses à une signalisation interféron sont-elles intrinsèquement non répondeuses aux immunothérapies ?

► **Wolf Hervé FRIDMAN.**- Cela dépend lesquelles. Au regard des travaux de Bob SCHREIBER, l'équilibre est la phase clinique

où le cancer est contrôlé par le système immunitaire. L'interféron joue un rôle majeur, y compris au niveau de la cellule tumorale. Quand la capacité de répondre à l'interféron est bloquée, il y a un échappement par rapport à la phase d'équilibre.

J'imagine que le contrôle de la tumeur par le système immunitaire et par des immunothérapies « *anti-checkpoints* », va être dépendant de l'induction de lymphocytes T CD8, mais nous ne voyons pas tellement de zone d'apoptose dans une tumeur après une immunothérapie majeure ni tout ce qui accompagne cette réponse TH1 et donc la capacité de répondre à l'interféron. C'est un point tout à fait important que nous commençons à peine à entrevoir.

En revanche, si nous faisons des « *CARs T-cell* » comme Michel SEDELAIN ou des anticorps anti-tumeur, c'est un autre type d'immunothérapie où nous aurons un autre type de réponse.

Les « *anti-checkpoints* » sont l'immunothérapie la plus « physiologique ». Il s'agit de réactiver un mécanisme existant pour lequel la capacité de la réaction immunitaire d'être induite et d'être augmentée par l'interféron gamma est tout à fait majeure.

Le deuxième point d'échappement est ce que j'appelle la chronicisation de l'inflammation, ce qu'Antoni RIBAS appelle l'*innate resistance* : soit parce qu'il n'y a pas d'antigène, soit parce que la tumeur échappe, en produisant des facteurs pro-inflammatoires, de plus en plus d'IL6, etc... Cela chronicise cette inflammation et étouffe toute velléité du système immunitaire de contrer la tumeur localement.

(Applaudissements)

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Éric TARTOUR

Hôpital européen Georges Pompidou, Université Paris-Descartes, Inserm

► **Sébastien AMIGORENA.** - *Éric TARTOUR est chef de service à l'hôpital Georges Pompidou et directeur d'un laboratoire de recherche aux Cordeliers. Il a eu des contributions très importantes dans le domaine de l'immuno-monitoring, à savoir essayer d'analyser comment les réponses immunitaires chez les patients se mettent en place et dans celui de la vaccination, principalement dans le cadre de cancers viro-induits. Nous nous réjouissons de vous écouter.*



► **Éric TARTOUR.** - Je vais vous faire un point sur la vaccination thérapeutique, qui est une des stratégies d'immunothérapie. Aujourd'hui, elle est un peu en retrait par rapport aux traitements par blocage de « checkpoints ». Je vais essayer, toutefois de vous convaincre qu'il y a des pistes d'amélioration possibles.

Classiquement nous distinguons les vaccins prophylactiques qui préviennent l'apparition de la maladie et les vaccins thérapeutiques qui s'adressent aux personnes déjà atteintes par la maladie.

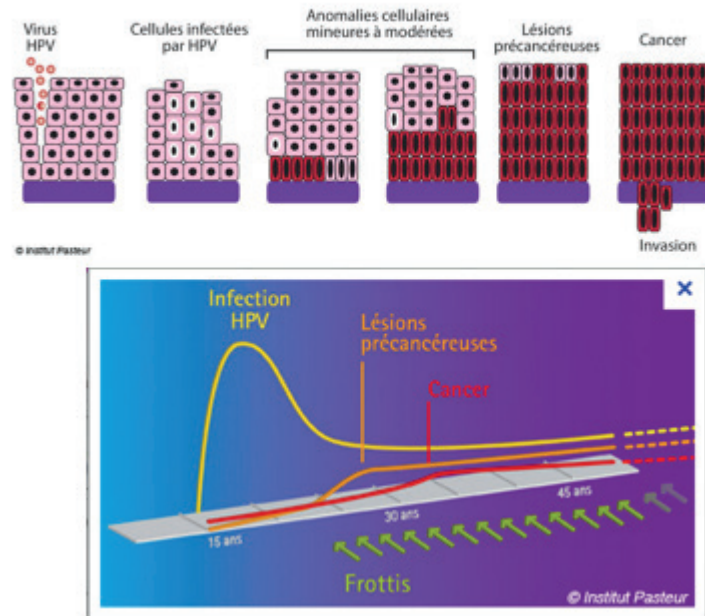
Ainsi dans le cas de tumeurs viro-induites, quand le virus rentre dans l'organisme, la première protection s'opère par des anticorps : il s'agit de vaccins prophylactiques. En revanche, une fois que le virus est intégré dans la cellule, les anticorps sont censés être beaucoup moins efficaces et il faut faire appel à des lymphocytes T cytotoxiques. C'est la vaccination thérapeutique.

Avant de développer la vaccination thérapeutique, je vais vous montrer sur l'exemple du papillomavirus oncogénique (HPV), comment prévenir le cancer par des vaccins prophylactiques.

Le papillomavirus oncogénique va infecter des cellules épithéliales. Dans 90 % des cas, l'organisme est capable de s'en débarrasser. Pour 5 à 10 % des cas, il va persister entraînant une immortalisation de la cellule et des lésions pré-néoplasiques. Au bout de 15-20 ans, il y aura un développement cancéreux.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Développement de cancers après infections par le papillomavirus



Il s'écoule donc beaucoup de temps pour essayer de le prévenir. Les premiers vaccins prophylactiques du papillomavirus sont apparus il y a dix ans. Ils sont très efficaces avec peu d'effets secondaires.

En Australie, la prévalence de l'infection HPV chez des adolescentes était de 15 à 20 % semblable à celle de tous les pays développés. Après 7 à 8 années de campagne de vaccination prophylactique au cours desquelles 90 % des adolescentes ont été vaccinées, la prévalence de l'infection HPV est tombée à 2 %.

Des études finlandaises et suédoises ont confirmé, dans les populations vaccinées, la baisse des lésions pré-neoplasiques. Les vaccins prophylactiques sont efficaces et entraînent une diminution de la fréquence de ces cancers dans tous les pays.

En France, contrairement à ces pays où 90 % des adolescentes sont vaccinées, le taux de vaccination est seulement de 13 à 14 % à cause d'un vrai problème sociologique de la perception du vaccin...

Un autre exemple significatif concerne le virus de l'hépatite B.

À Taïwan, dans la population, la prévalence de ce virus était de 90 %. Dès que le vaccin a été disponible, dans les années 70, le gouvernement a organisé une campagne massive de vaccination. Vingt ans après, le taux de cancer du foie à Taïwan a été diminué de deux tiers. Seulement des deux tiers car il y a d'autres causes de cancer du foie dont le virus de l'hépatite C. Comme aujourd'hui, il existe des traitements très efficaces contre ce virus de l'hépatite C, nous allons avoir à Taïwan une diminution drastique des cancers du foie.

Ce ne sera pas le cas en France, où le taux de vaccination contre l'hépatite B est de moins de 20 %. On estime que la vaccination contre l'hépatite B pourrait prévenir chaque année 690 000 morts soit par cirrhose soit par cancer du foie.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Ce préambule était pour indiquer qu'en parallèle d'une recherche d'un vaccin thérapeutique, des efforts peuvent être faits avec les vaccins prophylactiques pour diminuer très rapidement et très efficacement l'incidence de beaucoup de cancers viro-induits.

En termes de fréquence, il est admis que les cancers liés au papillomavirus représentent 5 à 7 % des cancers incluant les cancers ORL, du col de l'utérus, du vagin, du pénis. En associant ces deux vaccins prophylactiques, nous aurions un impact majeur de santé publique.

Pourquoi chercher des vaccins thérapeutiques ?

Dans les années 90, le groupe de Thierry BOON a identifié au niveau moléculaire des cibles d'antigènes exprimées par la cellule tumorale et reconnues par le système immunitaire anticorps et lymphocytes T.

Sans entrer dans les détails, il y a deux grands groupes d'antigènes :

Les antigènes spécifiques de différenciation de tissu : ils ne sont pas des antigènes spécifiques de la tumeur. Ils se trouvent dans un tissu donné, aussi bien dans les cellules normales que dans celles tumorales. Dans ce groupe, il existe cependant des gènes surexprimés par la tumeur et exprimés à bas bruit par les cellules normales.

L'autre groupe est celui des antigènes « spécifiques de tumeurs » comprenant les antigènes « cancer testisé » et les antigènes mutés. Les antigènes « cancer testis » sont retrouvés seulement dans les cancers et pas dans les cellules normales, sauf quelquefois dans les cellules germinales. Cela pourrait être un peu inquiétant, mais heureusement, les cellules germinales qui expriment ces antigènes n'expriment pas de complexe majeur d'histocompatibilité HLA de classe I.

Pourquoi développer des vaccins thérapeutiques contre le cancer

Il existe des antigènes associés aux tumeurs reconnus
naturellement par le système immunitaire

Antigène de différenciation

Ag exprimé par le cancer et le tissu normal correspondant

Mélanome : Mart1, gp100, tyrosinase
Prostate : PSA, PAP, PSMA

Antigène de type « Cancer-Testis »

Ag exprimé par les cellules tumorales et les cellules germinales

MAGE 3 : mélanome, K du poumon, K vessie
NY-ESO-1 : mélanome, cancer de l'ovaire

Antigène muté

Ag exprimé sous forme mutée par la cellule tumorale

P53 50% of cancers
Ras : 15-20% of cancers,
BRCA1/2: 5-10% breast cancer

Antigène surexprimé par la tumeur

Exprimé à faible niveau par les cellules normales

Her2/neu : cancer du sein, K ovaire, poumon, rein
Muc1 : adénocarcinome
Survivine, télomérase

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Le nombre d'antigènes mutés qui ne sont exprimés que par les cellules tumorales explosent. Avec les techniques de séquençage massif des tumeurs, nous pouvons, pour chaque cancer, déterminer exactement le nombre d'antigènes mutés exprimés par la tumeur. Nous reviendrons sur ce point dans la deuxième partie.

Comme c'était prévisible, vu qu'une partie de ces antigènes est commune aux cellules tumorales et normales, la réponse immunitaire, aussi bien avec les vaccins qu'avec les anticorps « *anti-checkpoints* » s'accompagne aussi d'une réponse contre des cellules du soi entraînant des phénomènes d'auto-immunité. Cela se traduit par une réponse immunitaire contre la cellule tumorale, mais aussi, par exemple, contre le mélanocyte avec une dépigmentation de la peau.

Lien entre réponse anti-tumorale et auto-immunité

Vitiligo (dépigmentation cutanée par destruction des mélanocytes chez une patiente atteinte de mélanome et traitée par immunothérapie)



➡ Correlation entre l'efficacité clinique de l'immunothérapie et le développement de manifestations cliniques d'auto-immunité (thyroïdite, vitiligo...).

Pour une vaccination thérapeutique efficace, les cellules les plus aptes à exercer cette mission sont les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. En effet, avec les molécules qu'ils sécrètent, ils possèdent la machinerie cellulaire capable de cibler la tumeur.

Dans les modèles précliniques, la capacité à induire ces lymphocytes T CD8 cytotoxiques est associée à un bon contrôle de la tumeur.

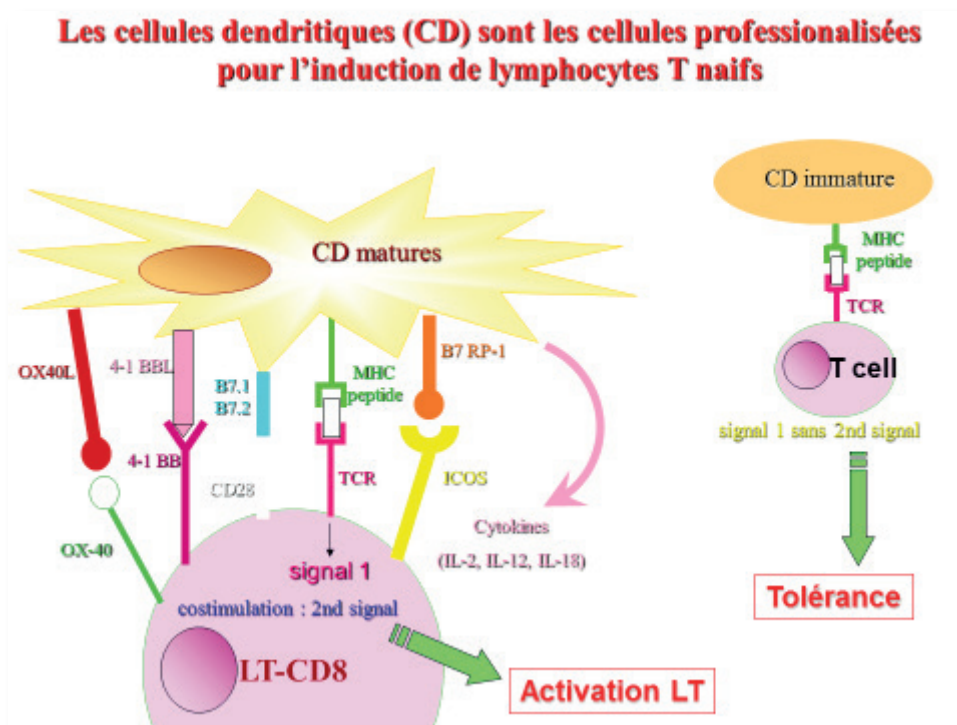
La question était donc : comment induire ces lymphocytes T CD8 cytotoxiques par un vaccin ?

Pour cela il faut arriver à cibler les cellules dendritiques, car en immunologie ce sont les seules cellules de l'organisme capables d'induire des LT-CD8 cytotoxiques à partir de LT-CD8 naïfs (n'ayant jamais rencontré l'antigène).

Il y a eu énormément de travaux soit avec des vecteurs pour cibler ces cellules dendritiques, soit avec des virus recombinants pour introduire l'antigène dans le cytosol des cellules et être présenté par les molécules HLA-classe 1 aux lymphocytes T.

Ces cellules dendritiques sont privilégiées car elles expriment beaucoup de molécules HLA et de co-stimulation. Il est connu qu'il ne faut pas seulement la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T pour induire ces CD8, mais aussi des molécules de co-stimulation considérées comme un second signal.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES



Lorsque nous avons une cellule épithéliale (ou cellule dendritique immature qui n'exprime que les molécules HLA) nous allons plutôt faire de la tolérance et pas de l'activation.

Les premières données montrent qu'effectivement, nous sommes capables d'induire ces CD8 et avoir un impact clinique. Ce sont les travaux de développement du vaccin thérapeutique PROVENGE. Les cellules dendritiques ont été injectées directement aux patients.

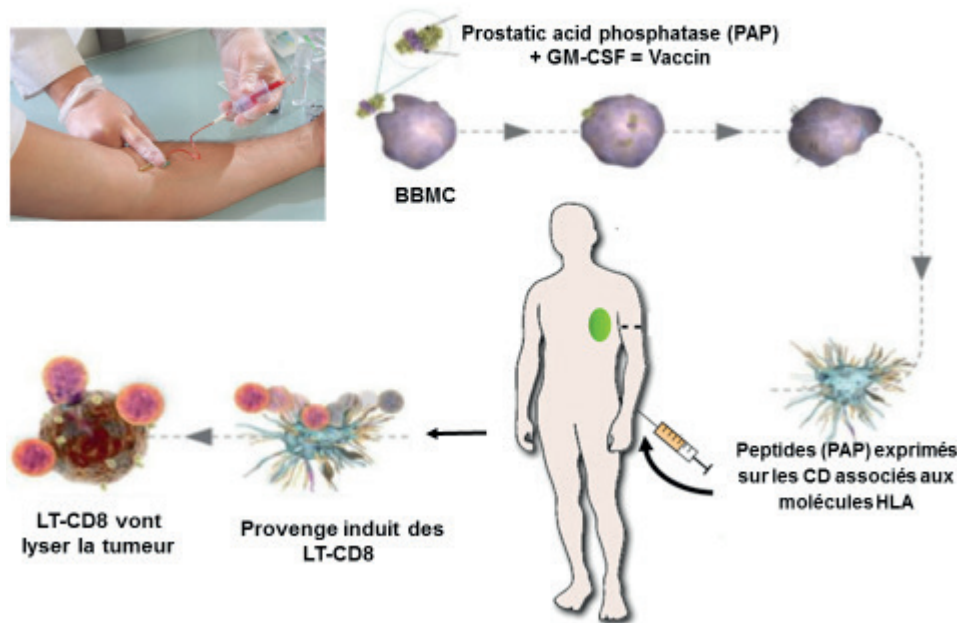
Des cellules sanguines mononuclées ont été traitées par un vaccin qui contenait du GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et un antigène, la phosphatase acide prostatique. Il s'agit d'un antigène de différenciation exprimé par des cellules normales de la prostate et aussi des cancers de la prostate. Le GM-CSF favorise la différenciation vers les cellules dendritiques.

Une fois générées, ces cellules dendritiques exprimant la phosphatase acide prostatique, ont été injectées à des patients atteints d'un cancer de la prostate récidivant, mais non métastatique et de faible masse tumorale.

Il a été constaté une amélioration sur la survie des patients vaccinés par rapport à ceux non traités. Au bout de 36 mois, il y avait le double de patients en vie et une survie augmentée de 4 mois.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

PROVENGE® (sipuleucel-T) : 1^{er} vaccin thérapeutique dont l'efficacité a été démontrée chez des patients atteints de cancer de la prostate



Les lymphocytes T CD8 induits n'ont pas été trouvés dans le sang, ils étaient localisés dans la tumeur. Il y avait donc bien eu une induction de lymphocytes T CD8 avec une amélioration de la survie.

Les autorités n'ont pas cru à ce résultat. Ils ont demandé un deuxième essai clinique de phase III, qui a bien confirmé ce premier résultat.

Cette vaccination thérapeutique a un impact réel. Toutefois le coût-bénéfice pose un problème économique. C'est un vaccin qui repose sur la thérapie cellulaire avec un coût de 80 000 à 100 000 dollars pour une survie améliorée de seulement quatre mois. Aujourd'hui, la société à l'origine de ce vaccin a été rachetée et les recherches en vue d'un coût bénéfice-risque plus significatif vont se poursuivre.

Le point intéressant reste la validation de ce concept de vaccination thérapeutique sur le plan clinique avec toutefois un problème économique.

Un autre essai clinique qui valide également ce concept concerne un vaccin thérapeutique contre HPV, pour des patientes atteintes de lésions pré-néoplasiques du col de l'utérus. Ces lésions précancéreuses sont associées au virus HPV qui code des protéines oncogéniques E6 et E7.

Le groupe de TRIMBLE a produit ce vaccin thérapeutique composé d'ADN codant pour E6 et E7. Ils l'ont injecté à des patientes atteintes de ces lésions pré-néoplasiques dans un essai de phase II b en double aveugle randomisé. Pour les patientes vaccinées, aussi bien le taux de régression que le taux d'infection virale sont nettement améliorés par rapport aux patients non traités.

C'est un deuxième exemple d'efficacité vaccinale dont l'indication s'adresse à des patients avec des lésions néoplasiques peu évoluées.

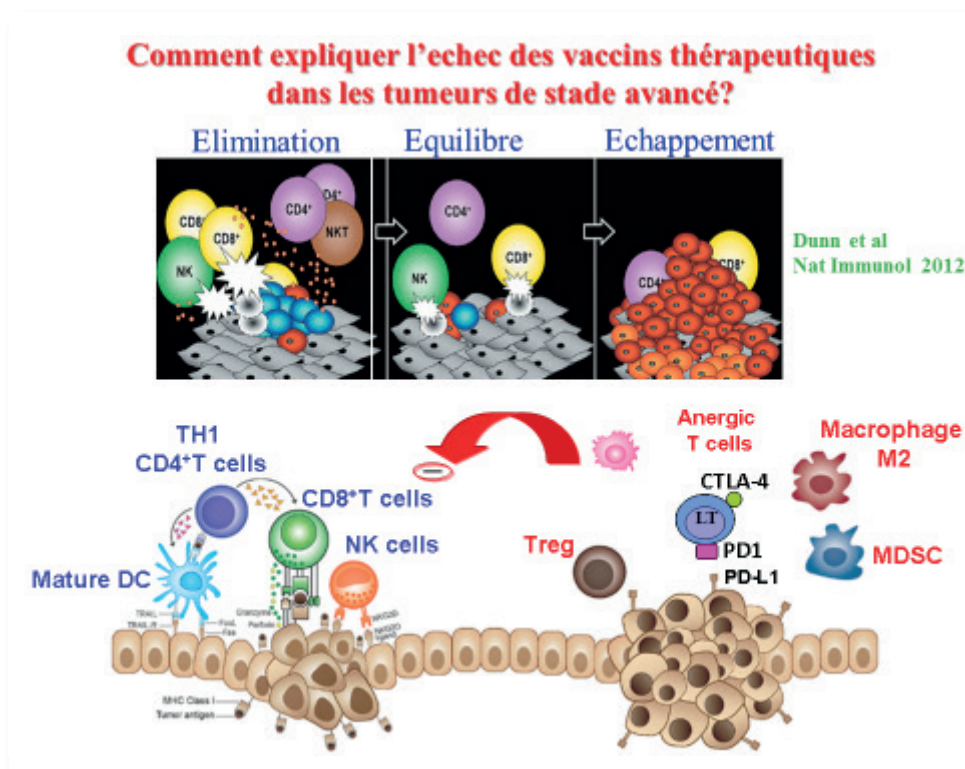
VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Un troisième cas, concerne un vaccin constitué de longs peptides dirigés contre E6 et E7. Appliqué à une petite série de trente-cinq patientes, souffrant de lésions vulvaires pré-néoplasiques grade 3, il a également montré un bénéfice.

En résumé, ces vaccins thérapeutiques pourraient être efficaces pour résorber des masses tumorales peu importantes.

Pourquoi des dizaines d'essais de vaccination administrée chez des patients atteints de tumeurs métastatiques n'ont pas fonctionné ?

Il y a bien sûr la théorie de SCHREIBER des trois E : Elimination, Equilibre, Echappement qui caractérise l'interaction entre le système immunitaire et la cellule tumorale : au début, la cellule immunitaire contrôle, ensuite, il y a un équilibre, puis un échappement.



Si nous vaccinons des patients au dernier stade, nous pouvons comprendre qu'il y a tellement de cellules suppressives, de phénomènes d'échappement que cela ne fonctionnera pas. Cela peut expliquer qu'il est préférable de vacciner à des stades précoces, peu évolués pour provoquer une réponse.

À un stade avancé quelle est la situation ? Les bonnes cellules immunitaires (CD8, NK, TH1...) sont présentes mais aussi toute une série de sous-populations immunitaires (cellules régulatrices, macrophages M2, cellules suppressives...) qui vont inhiber cette réponse immunitaire favorable. Lors d'une vaccination, à ce stade, même si ces CD8 sont induits, il va s'en suivre une inhibition par ce microenvironnement suppresseur.

Au regard de cela, nous pourrions nous dire qu'une immunothérapie ne fonctionnera jamais. Or, nous avons vu qu'avec un anti PD-1, nous étions capables de déséquilibrer le système.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Lors de la vaccination nous induisons les lymphocytes CD8. Dès qu'ils vont pénétrer dans le microenvironnement tumoral, ils vont se mettre à exprimer le PD-1 et s'associer à PD-L1 exprimé par les cellules tumorales, ces récepteurs inhibiteurs qui paralysent les lymphocytes T.

Il va se créer une interaction forte, très étroite entre ces cellules tumorales qui expriment PD-L1 et des lymphocytes T qui expriment PD-1 en paralysant leur action d'où l'intérêt d'inhiber cette interaction par les fameuses molécules anti-récepteur inhibiteur PD-L1.

Il n'y a pas que PD-1 et PD-L1 ; par exemple dans le cas du cancer du rein. Il y a énormément d'autres récepteurs inhibiteurs. C'est un mécanisme général de régularisation de ces lymphocytes T dans le microenvironnement des tumeurs.

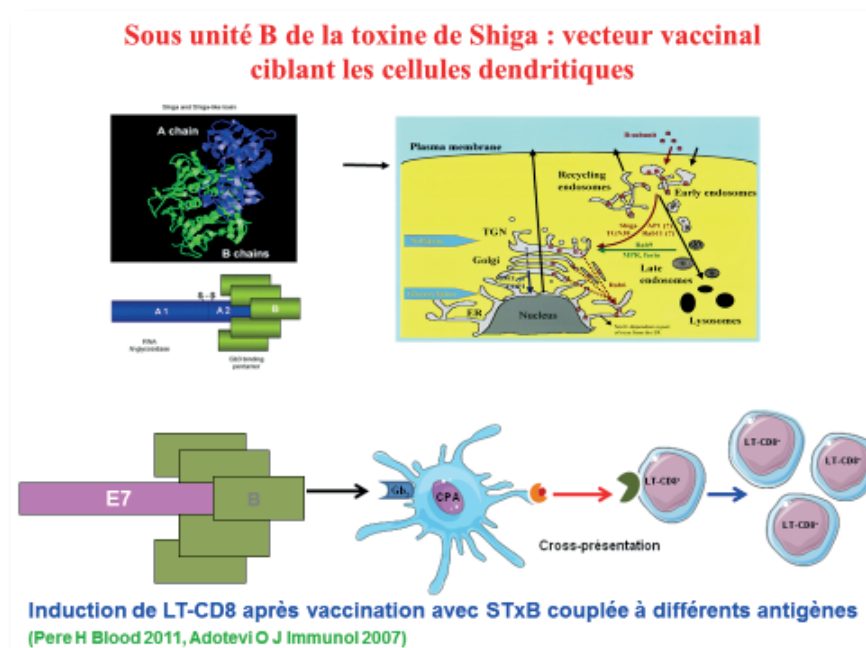
Toutefois, chez des sous-populations de patients qui expriment la molécule de PD-L1, dans le cas du cancer du poumon, il y a clairement un avantage à utiliser ces anticorps plutôt que la chimiothérapie.

Ces molécules anti PD-1 ou anti PD-L1 vont permettre aux lymphocytes T CD8 de proliférer à condition qu'ils soient préexistants. D'où, pour que les traitements anti PD-1/PD-L1 fonctionnent, il faut une réponse immune préexistante, notamment avec des lymphocytes T CD8.

Pour les 70 % de patients atteints de cancer du poumon qui n'ont pas cette réponse naturelle, une possibilité est soit d'administrer des CARs (un transfert adoptif de lymphocytes T chimériques) ou de les traiter par cytokine, ou d'envisager un repositionnement des vaccins anti-cancer.

La stratégie est donc d'induire cette réponse immunitaire lorsqu'elle n'existe pas et ensuite de la combiner car l'introduction des lymphocytes T CD8 dans le microenvironnement tumoral va s'accompagner de l'expression de PD-1 sur ces lymphocytes.

Un vaccin qui cible les cellules dendritiques, avec une sous-unité B non toxique de la toxine de Shigella Dysenteriae (STxB) développé en collaboration avec l'Institut CURIE, a été couplée à la protéine E7 du papillomavirus. Nous avons montré qu'il était ainsi possible d'induire des lymphocytes T CD8.

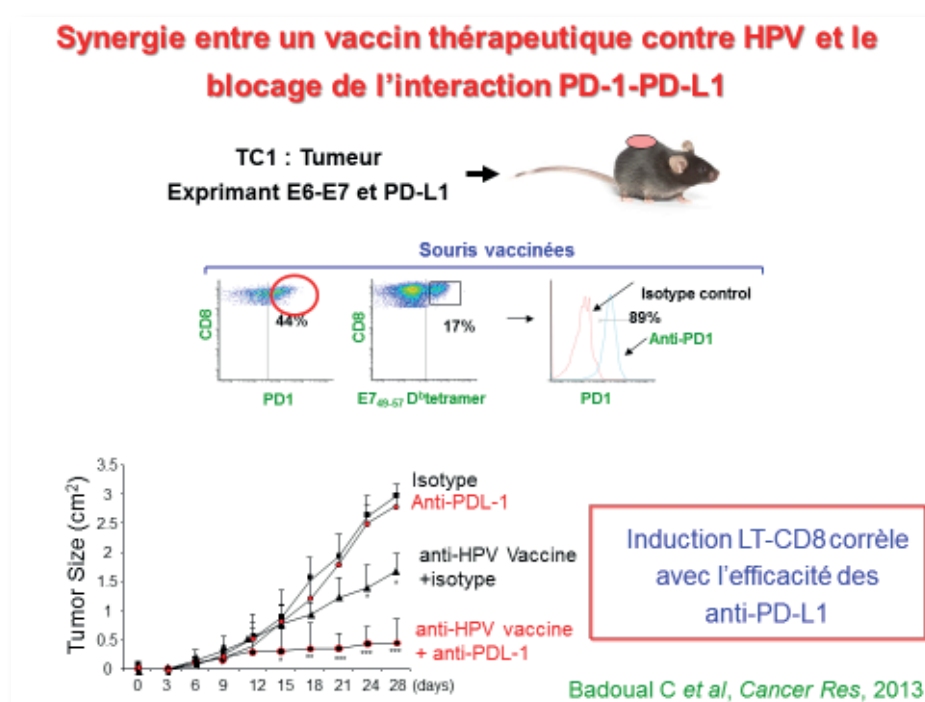


VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Une tumeur TC1 exprimant des antigènes E6 et E7 et aussi PD-L1 a été greffée à une souris. Après cette greffe, il n'y a pratiquement pas de réponse naturelle. L'infiltration par les lymphocytes CD8 est de moins de 5 % ; ils expriment très peu de PD-1 et ne sont pas vraiment spécifiques d'E7. Comme attendu, lors de l'administration d'un anticorps anti PD-L1, il n'y a pas de réponse, donc inefficacité.

Quand nous vaccinons ces souris avec ce vaccin STxB-E7, il se produit une induction de 40 à 50 % de lymphocytes T CD8 spécifiques de la tumeur et 90% expriment PD-1.

Sur le plan thérapeutique, le vaccin seul a un effet partiel. Il est certainement bloqué par l'apparition de PD-L1. Lorsque ce vaccin est associé à un anti PD-1 ou un anti PD-L1, il existe une synergie très importante et une inhibition.



À partir de cette étude, des dizaines de travaux ont confirmé ce résultat : lorsque des vaccins sont associés à des anticorps anti PD-1, nous avons ce type d'effet si la tumeur n'est pas naturellement infiltrée.

Pour une tumeur naturellement infiltrée, l'anti PD-1 seul est efficace. C'est pour cela qu'il y a parfois des travaux qui prétendent que PD-1 suffit.

Aujourd'hui, dans le monde, il y a une trentaine d'essais cliniques de vaccins thérapeutiques associés à différents anticorps anti PD-1/anti PD-L1. C'est un repositionnement de ces vaccins thérapeutiques.

Il est important d'examiner le microenvironnement immunitaire pour corrélérer la réponse avec l'infiltration des lymphocytes.

Toutefois, il n'y a qu'une seule étude, chez des patients atteints de mélanome traités par le PENBROLIZUMAB où le microenvironnement immunitaire a été examiné.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Dans beaucoup d'études, ce sont de simples combinaisons thérapeutiques. À mon avis, c'est beaucoup plus intéressant de regarder l'infiltration avant cette combinaison pour prévoir l'effet du vaccin.

Wolf Hervé FRIDMAN a parlé des antigènes mutés qui vont induire des lymphocytes T CD8 dans les tumeurs. Un bon modèle est le cancer du côlon par défaut de réparation de l'ADN qui entraîne beaucoup de mutations et beaucoup de lymphocytes T CD8. Ces patients répondent bien aux anticorps anti-PD-1/PD-L1.

Dans le cancer du côlon sporadique, le plus fréquent hélas, il n'y a pas beaucoup de lymphocytes T CD8.

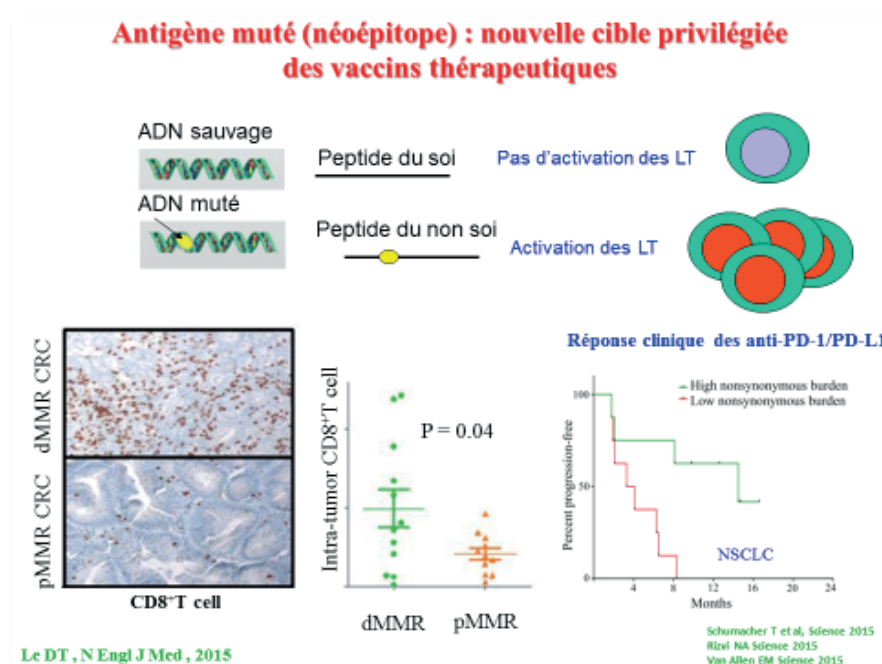
C'est assez logique de déduire que les antigènes mutés sont une bonne cible pour les vaccins, ils permettent d'activer des lymphocytes T. Il y a énormément de travaux pour montrer que, dans différents modèles, lorsque les anticorps anti-PD-1 fonctionnent, c'est souvent parce qu'il y a eu une induction de lymphocytes T CD8 contre des antigènes mutés.

La stratégie classique, développée par différents groupes dans le monde, est de séquencer la tumeur et d'identifier toutes les mutations. Cela peut varier entre 100 et 150.

Ensuite, le plus difficile, est de prédire les antigènes qui vont être immunogéniques, donc reconnus par le système immunitaire. Il existe une compétition mondiale pour définir le meilleur algorithme informatique pour cela. L'enjeu industriel est important.

M. CARRENO a été le premier à valider le concept d'utiliser ces antigènes mutés chez l'homme dans des stratégies de vaccination. Il a sélectionné des patients atteints de mélanome métastatique qui exprimaient l'allèle HLA A-2, le plus facile pour sélectionner les peptides qui vont se lier.

Il a mis en évidence énormément de mutations. Parmi ces néo-épitopes générés, il a identifié ceux qui pouvaient se lier aux HLA du patient et développé les algorithmes pour prédire les plus immunogéniques. Pour chaque patient, il y avait une dizaine de peptides dérivés de ces mutations.



Des cellules dendritiques ont été ensuite sensibilisées avec ces peptides mutés. Il a montré que ce type de vaccin était capable d'induire des lymphocytes T CD8 chez au moins un tiers de patients.

Ce résultat a entraîné un renouveau des vaccins thérapeutiques avec ces néoépitopes. En moins de 2 ans, 6 sociétés se sont créées, traduisant un grand enthousiasme.

Cependant, ces néoépitopes considérés comme le Graal pour guérir le cancer peuvent développer des mécanismes de résistance comme tous les autres antigènes. Il faudrait pouvoir sélectionner des néoépitopes qui jouent un rôle dans la survie de la cellule, ce qui n'est pas fait systématiquement.

Le développement d'algorithmes est un enjeu très important. Le défaut de cette approche est que la série de peptides mutés est différente d'un patient à l'autre. Il s'agit d'une médecine personnalisée avec les problèmes de coûts qu'elle engendre.

En rapport avec ces mécanismes de résistance, j'avais trouvé un travail intéressant concernant un patient traité par un anti-PD-1 qui avait d'abord répondu positivement, puis avait subi un échappement à ce traitement.

Une série de mutations avait été identifiée initialement. On pensait qu'au cours du temps, le nombre de mutations allait augmenter : car plus on avance dans la maladie, plus les mutations devraient être nombreuses pour échapper au système immunitaire.

Or, c'est l'inverse qui s'était produit. Parmi les mutations, quatre avaient disparu de la tumeur, celles pour lesquelles il y avait eu une réponse immunitaire. L'échappement de la cellule tumorale à l'immunothérapie devait être certainement due à la disparition des mutations...

La sélection des mutations joue donc peut-être un rôle dans la survie.

Par ailleurs nous avons vu qu'il est important d'induire des lymphocytes T CD8, cela d'ailleurs peut se faire avec des cellules dendritiques, mais aussi des virus et de l'ADN.

En pathologies infectieuses, nous savons qu'il est important de les induire surtout localement sur les sites muqueux. Par exemple, le vaccin contre la polio est plus efficace administré par voie orale que par voie sous-cutanée. Dans le premier cas, il est neutralisant, dans l'autre, il n'entraîne qu'une protection partielle.

Nous avons comparé l'immunisation par les voies mucosales à celle par des voies systémiques.

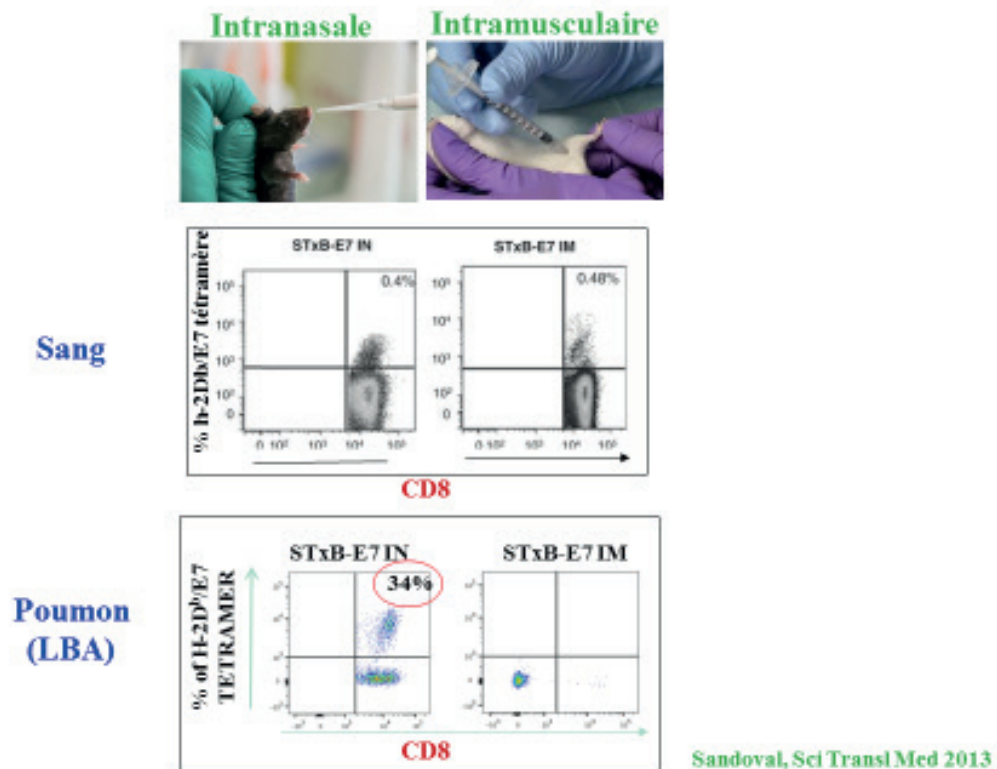
Pour cela, le vaccin STxB-E7 a été administré à des souris, soit par voie nasale, soit par voie intramusculaire.

Dans le cas de tumeurs du poumon et de la sphère ORL, la voie intramusculaire induit des lymphocytes dans le sang mais pas dans le parenchyme pulmonaire ni dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Contrairement, la voie muqueuse induit plus de 30 % de lymphocytes T CD8 muqueux.

Dans le sang, il n'y a pas de différence entre les deux modes d'administration. Si l'on regarde localement, les voies d'immunisation permettent des réponses différenciées.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Influence de la voie d'immunisation et du site anatomique de la tumeur dans l'efficacité des vaccins thérapeutiques anti-cancer



Cela présente un grand intérêt sur le plan clinique.

Pour démontrer cela, des tumeurs avaient été greffées, soit dans la bouche, soit dans le poumon de souris. En l'absence de greffe, il ne se passe rien. Suite à la greffe, une tumeur se développe. Si les souris sont vaccinées par voie intramusculaire, il n'y a aucun contrôle sur le développement de la tumeur. En revanche, si on vaccine par voie muqueuse, la croissance de la tumeur est complètement inhibée.

Dans le cas d'une vaccination par voie muqueuse, le site local présente une infiltration par CD8, alors qu'une vaccination par voie intramusculaire n'induit pas d'infiltration.

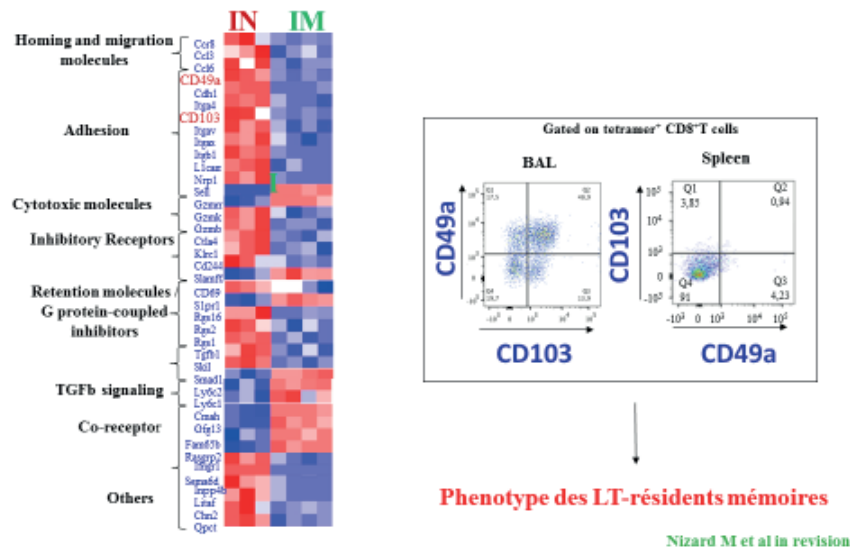
Le sang ne reflète pas toujours ce qui se passe localement au site de la tumeur.

Pour aller plus loin, nous avons voulu voir si les lymphocytes T CD8 du sang après vaccination intramusculaire ou ceux du poumon obtenus après vaccination par voie intranasale étaient identiques. Les lymphocytes T CD8 ont été triés par la technologie des tétramères. Bien qu'il s'agisse de CD8 obtenus avec le même vaccin, ils ne sont pas les mêmes.

Dans le poumon, les lymphocytes présentent une série de marqueurs CD103, C49a avec beaucoup de protéines d'adhésion, de protéines de « *homing* ».

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

Analyse transcriptomique des gènes différentiellement exprimés par les LT-CD8 retrouvés au niveau du poumon avec vaccination nasale ou de la rate après vaccination intramusculaire



Nizard M et al Nat Commun 2017

Les lymphocytes du sang dans la rate n'expriment pas du tout CD49a ni CD103, ni protéine de « homing » à la différence des lymphocytes retrouvés dans le poumon ou le lavage broncho-alvéolaire.

Ce sont des lymphocytes T CD8 résidents mémoires.

Lors d'une infection, si le pathogène va dans le ganglion, il va activer les cellules mémoires centrales. Ces cellules se différencient en lymphocytes T effecteurs qui vont retourner sur le site de l'infection pour détruire le pathogène. Tout cela prend 6 à 7 jours.

Lorsque l'infection reste locale, on génère des lymphocytes T résidents mémoires qui vont rester sur le site et s'il y a une réinfection, ces lymphocytes T CD8 seront la première ligne de défense. On les appelle les lymphocytes T sentinelles.

La réponse est presque immédiate. Eux-mêmes vont recruter d'autres effecteurs.

Dans le cancer, des modèles précliniques ont démontré que ces cellules existent et sont importantes pour l'efficacité des vaccins. Ainsi des groupes essaient d'induire ces lymphocytes T CD8 sur le site de la tumeur et pas seulement dans le sang.

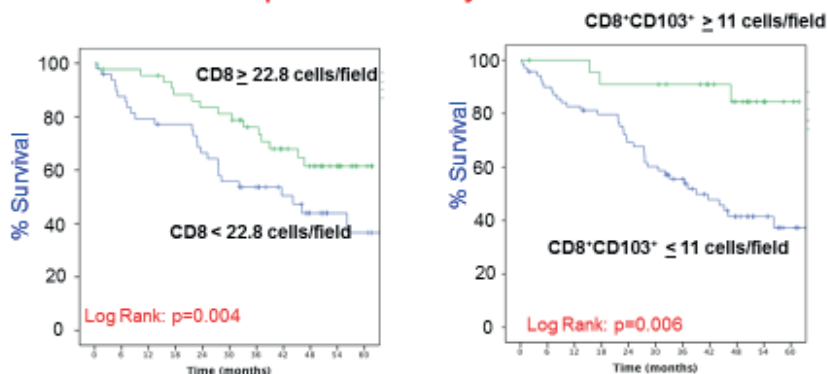
Chez l'homme, dans la tumeur du poumon, des lymphocytes CD8 qui peuvent exprimer CD103, CD49a sont présents.

Sur le plan moléculaire, CD103 est une intégrine qui est le ligand de la E-Cadhérine exprimée à la surface des cellules tumorales. Le fait d'avoir ce type d'intégrine va les rapprocher de la cellule tumorale avec de fortes interactions. Ces lymphocytes T résidents mémoires sont à 80 % au contact de la tumeur ; ce qui peut expliquer une efficacité supérieure.

Les CD8 sont des marqueurs de bon pronostic. Dans une série de cancers du poumon le pronostic est d'autant meilleur que l'infiltration de lymphocytes T CD8 est importante. Lorsque ces CD8 expriment CD103, le pronostic est encore meilleur. Dans une analyse multivariée, ces lymphocytes T CD8 CD103 sortent en priorité. Cela peut s'expliquer par leur contact avec la tumeur.

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

**L'infiltration par les LT-résidents mémoires (CD8⁺CD103⁺T cells (TRM))
est corrélée à une meilleure survie des patients atteints de
K du poumon en analyse multivariée**



Variable	HR	95%CI	P Value
pTNM	8.25	1.9-35.2	0.004
CD8 ⁺ CD103 ⁺ T cells	0.25	0.078-0.854	0.027

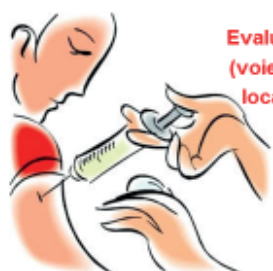
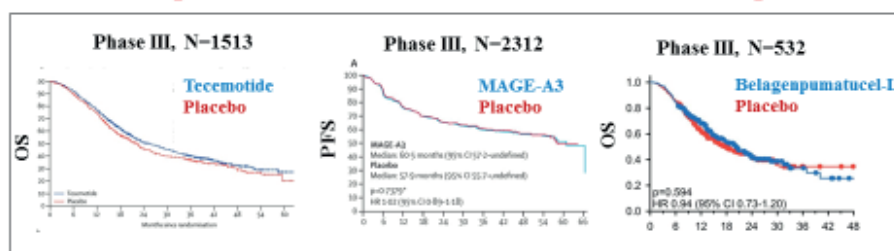
Nizard et al in revision

Nizard M et al Nat Commun 2017

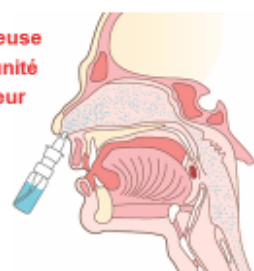
Jusqu'à présent, dans le cancer du poumon, les vaccins thérapeutiques ont été un échec. Nous n'avons eu aucune amélioration ou bénéfice.

Dans tous les cas, ces vaccins avaient été administrés par voie intramusculaire et les patients avaient eu des lymphocytes T CD8 dans le sang. Personne n'a essayé de regarder ce qui se passait au site de la tumeur. D'où l'idée d'essayer de développer ce type de vaccination muqueuse et d'examiner l'induction locale de lymphocytes T CD8.

**Tous les vaccins thérapeutiques dans les K du poumon ont été
administrés par voie IM et ont échoué dans les essais de phase 3**



**Evaluation immunisation muqueuse
(voie nasale) pour induire immunité
locale (TRM) au site de la tumeur**



Tartour/Zitvogel Lancet Resp Med 2013

VACCINS THÉRAPEUTIQUES CONTRE LE CANCER : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES

La majorité des tumeurs sont de localisation muqueuse : colon, poumon, ORL, tumeurs génitales et pour l'instant, tout est fait par voie systémique et intramusculaire.

Pour conclure, les vaccinations prophylactiques contre des pathogènes associés au cancer pourraient déjà avoir un impact important sur la diminution de l'incidence de certains cancers que l'on peut estimer à 8-10 % ; ce qui n'est pas négligeable.

Un vaccin thérapeutique seul n'a presque plus de sens. Il faudra le combiner par des « *check-points* » ou une autre thérapie levant l'immunosuppression du microenvironnement tumoral.

Les vaccins anti-cancer reposant sur les néoépitopes constituent une nouvelle classe de vaccins en développement. Mais il faut s'attendre à des mécanismes de résistance et il faudra bien sélectionner ces néoépitopes.

Enfin, l'intérêt d'induire ces lymphocytes T CD8, non seulement dans le sang, mais dans le microenvironnement des tumeurs, nécessite de revoir notre façon d'envisager les voies d'immunisation pour ces vaccins.

Ce travail a été conduit au début dans le laboratoire d'Hervé FRIDMAN et actuellement à l'hôpital George Pompidou et au centre de recherche PARCC (Mevyn NIZARD, Fédérico Sandoval, MO Diniz, Helene Roussel, Cécile BADOUAL, Magali TERME, Thi Tran, Soumaya Karaki) en collaboration avec l'institut Curie, l'équipe de Ludger JOHANNES, pour les vaccins. Le suivi des tumeurs peut se faire localement car nous avons dans le centre de recherche une équipe d'imagerie du petit animal avec des PET Scan, des IRM permettant de suivre en détail la croissance tumorale.

(Applaudissements)

► **Sébastien CANDEL.**- Merci. Nous passons aux questions.

► **Moshe YANIV.**- Un des gènes qui est le plus souvent muté dans le cancer humain est P53. Dans de nombreux cas, il se produit une accumulation de P53 mutants. Un vaccin thérapeutique a-t-il été tenté avec des cellules stimulées par les mutants P53 ?

► **M. TARTOUR.**- 50 % des tumeurs sont effectivement mutées par P53. Ces tumeurs sont très infiltrées par les CD8. C'est une cible immunogénique.

À ma connaissance, quelques travaux ont été menés avec des peptides. Ils montraient une réponse faible dans le sang, mais rien sur le plan local ou muqueux. Les derniers travaux montrent leur caractère immunogénique, car ces tumeurs répondent bien aux anti PD-1.

Cela devrait susciter un intérêt puisque naturellement, on répond à cette protéine mutée. Mais pour l'instant, à ma connaissance, aucun travail n'est allé au-delà de la phase I.

► **Moshe YANNIV.**- Le vaccin SIPULEUCEL est-il injecté aux souris après la prise de tumeur ou au même moment ?

► **M. TARTOUR.**- Comme ce sont des vaccins thérapeutiques, ils sont injectés après.

► **Pierre CORVOL.**- Vous avez bien montré l'importance de prédire, par un algorithme, la néomutation la plus susceptible d'être exploitée pour développer un vaccin.

Dans la mesure où les mutations sont nombreuses, ne pourrait-on pas utiliser plusieurs peptides antigéniques plutôt qu'un seul.

► **M. TARTOUR.**- Généralement les équipes combinent une dizaine de peptides. Elles arrivent souvent à une cinquantaine. On pourrait être encore plus précis. Il faudrait avoir la tumeur, faire la spectrométrie de masse. Cela a été fait chez la souris, ils sont arrivés à deux ou trois peptides et ont montré que ceux-ci étaient très importants.

Mais cela paraît peu envisageable chez l'homme.

Aujourd'hui, nous en sommes à 8, 10 peptides mutés. Les vaccins ADN et ARN sont très séduisants car ils permettraient d'avoir une sorte de séquence de peptides dans la même construction. Mais la preuve du concept de vaccins ADN chez l'homme est à faire.

En revanche, les vaccins ARN sont en plein développement suite à la publication d'Ugur SAHIN et on pourrait mettre beaucoup plus de néoépitopes.

► **Marc BONNEVILLE.**- L'utilisation de vaccins sur les tumeurs non infiltrées peut produire la valeur ajoutée la plus importante.

Dans des situations de tumeurs déjà infiltrées, le vaccin a la capacité d'induire des réponses contre des néoépitopes ; peut-il aussi dans ce cas avoir une valeur ajoutée ?

► **M. TARTOUR.**- La logique serait de dire que l'on va s'adresser à des situations d'échec de l'anti-PD-1 seul. On peut augmenter et amplifier le répertoire par un vaccin. Mais si l'anti-PD-1 seul a déjà une efficacité, faut-il en rajouter ? Nous n'avons pas la réponse.

► **Gérard ORTH.**- Cette session est consacrée à l'immunothérapie, mais vous avez largement évoqué l'immuno-prévention. Vous avez cité un chiffre qui m'a effrayé : la couverture du vaccin contre le papillomavirus ne serait que de 13 % en France. J'avais gardé en mémoire 30 % ; ce qui n'était déjà pas très élevé.

On s'oriente maintenant vers 2 injections, mais on pense que même une seule injection

pourrait procurer une immunité assez importante. Il faudrait préciser si votre chiffre de 13 % correspond à une ou deux injections.

► **M. TARTOUR.**- Les chiffres de l'ANSM ne le précisent pas. 13 % sont vaccinées, sans préciser s'il s'agit du schéma vaccinal complet.

► **Gérard ORTH.**- Le vaccin dont vous parlez a vocation de protéger contre 70 % des cancers associés au papillomavirus. Le nouveau vaccin nonavalent pourrait protéger contre 90 % des cancers du col. Vous voyez ce qu'il reste à faire.

Je suis aussi un adepte de la prévention et pour avoir été membre de la conférence de consensus sur le vaccin contre l'hépatite B accusé de favoriser la sclérose en plaques, j'ai pu juger le tort qu'a causé la décision de M. KOUCHNER en 1998 de supprimer la vaccination obligatoire et de faire tomber ce vaccin en déshérence quand on voit son importance.

► **M. TARTOUR.**- Ce sont des problèmes socioculturels.

► **Gérard ORTH.**- Le fait que le vaccin du col contre le papillomavirus n'est pas appliqué est peut-être une lointaine conséquence de cette décision catastrophique.

► **M. TARTOUR.**- De nombreux parents pensent que vacciner leurs filles revient à laisser une sorte de licence sexuelle à leurs enfants. En Inde, c'est un vrai problème.

► **Sébastien CANDEL.**- Merci, Éric.
(Applaudissements).

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Caroline ROBERT,

Hôpital Gustave Roussy Université Paris-Sud

► **Sébastien CANDEL.** - *Caroline Robert est chef du service de dermatologie à l'hôpital Gustave Roussy. Elle a eu un rôle très important dans le développement clinique des thérapies par les anticorps anti PD-1, anti CTLA-4. Elle a placé la France au niveau mondial dans cette avancée thérapeutique. Nous lui devons beaucoup pour la place de notre pays dans l'immunothérapie anti-cancer.*



► **Caroline ROBERT.** - Merci, monsieur le Secrétaire perpétuel, merci Sébastien de m'avoir invitée. Je suis ravie d'être parmi vous.

Au cours des deux présentations de ce matin, de nombreux concepts ont été bien expliqués.

Je vais vous développer l'aspect clinique, le déroulement de ce que nous avons vécu, les spécialistes du mélanome métastatique, au cours des dernières années et comment l'immunothérapie est venue révolutionner notre pratique.

Je vais également évoquer les autres traitements afin que vous ayez une vision complète des offres thérapeutiques et de la façon dont l'immunothérapie s'intègre dans ce nouvel arsenal thérapeutique.

En effet, il y a des résistances primaires et secondaires. Le mélanome, quand il est métastatique, reste une maladie grave et le plus souvent mortelle. Nous avons reculé l'échéance mais nous sommes loin d'avoir résolu le problème.

La photo représente une lésion primitive.



Le mélanome le plus courant dans nos pays de gens à peau claire est le mélanome à extension superficielle SSM pour *superficial spreading melanoma*. Cette lésion ressemble à un grain de beauté, mais ce n'est pas un grain de beauté banal. En quelque temps, il s'étale en superficie avant de franchir la membrane basale et de pénétrer vers les vaisseaux lymphatiques et sanguins pour donner lieu à des métastases.

Il est toujours effrayant pour les patients de réaliser que ces petites lésions sont responsables de la catastrophe qui peut survenir dans environ 20 % des cas. Heureusement, dans la grande majorité, on enlève ce mélanome, on surveille le patient et rien ne se passe. Mais dans 20 % des cas, des métastases se forment, souvent dans les ganglions lymphatiques, dans la peau et un peu partout.

Le plus dangereux est le mélanome nodulaire qui peut parfois ne pas être diagnostiqué car il ressemble à un bourgeon charnu, un botryomycome. Toutefois son débord pigmenté signe la nature mélanocytaire. Il présente d'emblée un potentiel métastatique très important.



Avant l'arrivée de l'immunothérapie et des thérapies ciblées seul un quart des patients survivait au bout d'un an. Nos collègues oncologues qui s'occupaient d'autres cancers reconnaissaient la difficulté de s'occuper de patients métastatiques de mélanome. Actuellement, en tant que spécialistes du mélanome, nous possédons les thérapies les plus efficaces dans le cancer, que ce soit les thérapies ciblées ou l'immunothérapie.

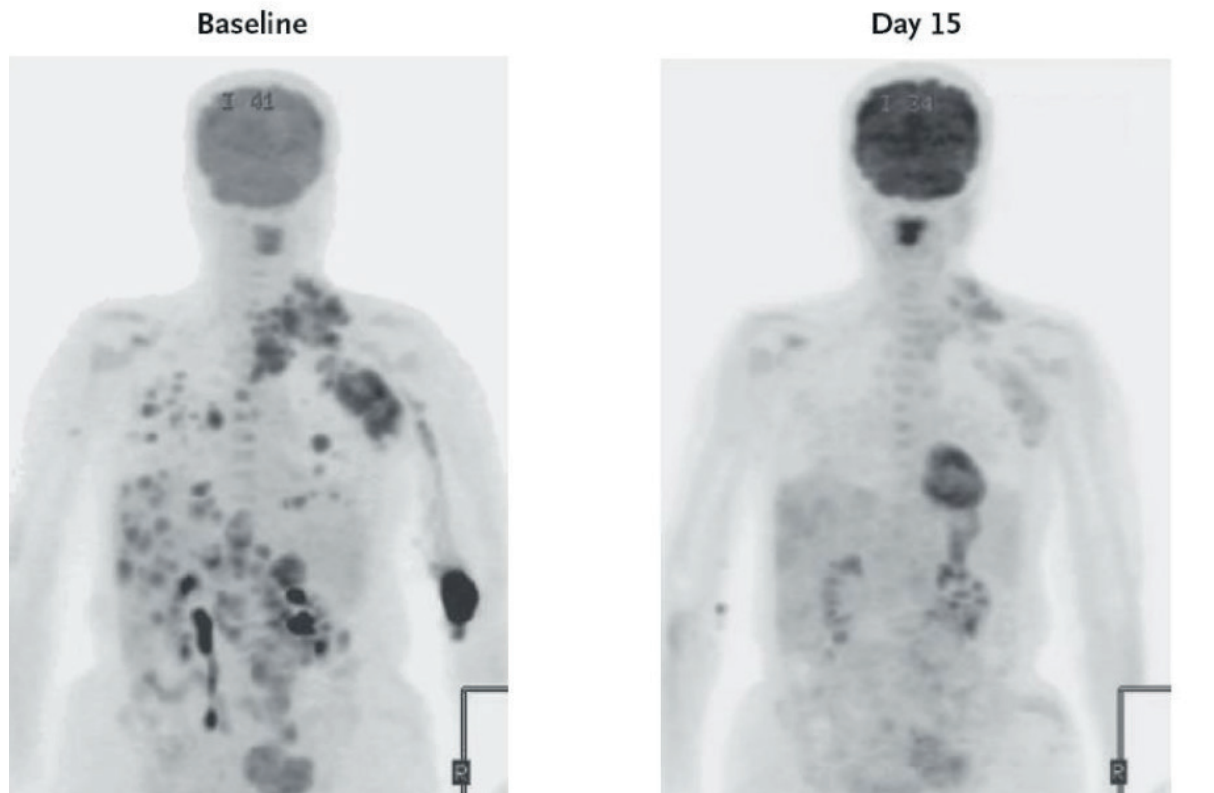
À partir de 2011, nous avons assisté à une accélération des découvertes. Neuf médicaments ou associations de médicaments ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour les patients atteints de mélanome métastatique.

Thérapies ciblées

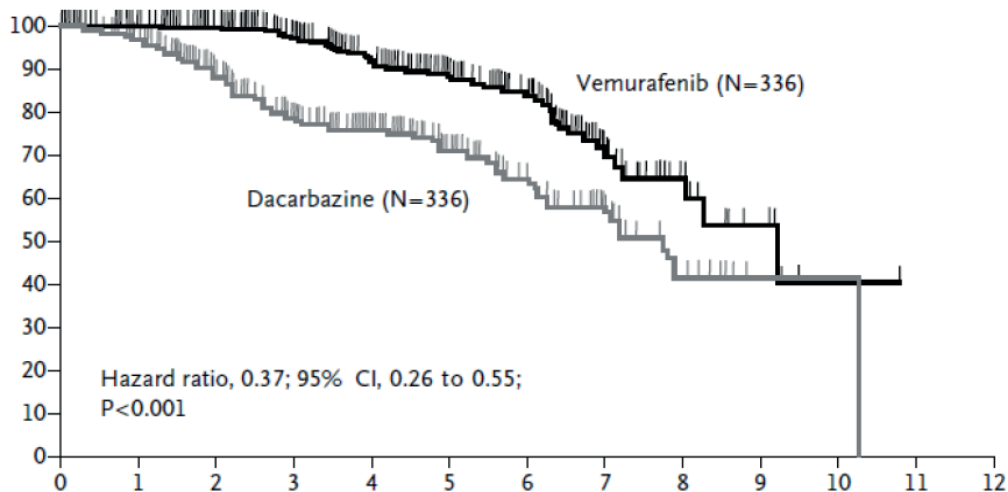
En 2001 on avait découvert que 50 % des mélanomes avaient une mutation récurrente de BRAF, une sérine/thréonine *kinase*. Cette enzyme mutée, au départ connue par un très petit nombre de personnes, est devenue l'oncogène vedette dans de nombreux cancer. Avec le premier anti BRAF, le VEMURAFENIB, nous avons eu l'impression d'un miracle. Sur l'image de PET Scan,

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

ci-dessous, les métastases ont quasiment disparu en 15 jours et cela s'est produit chez 50 % des patients.

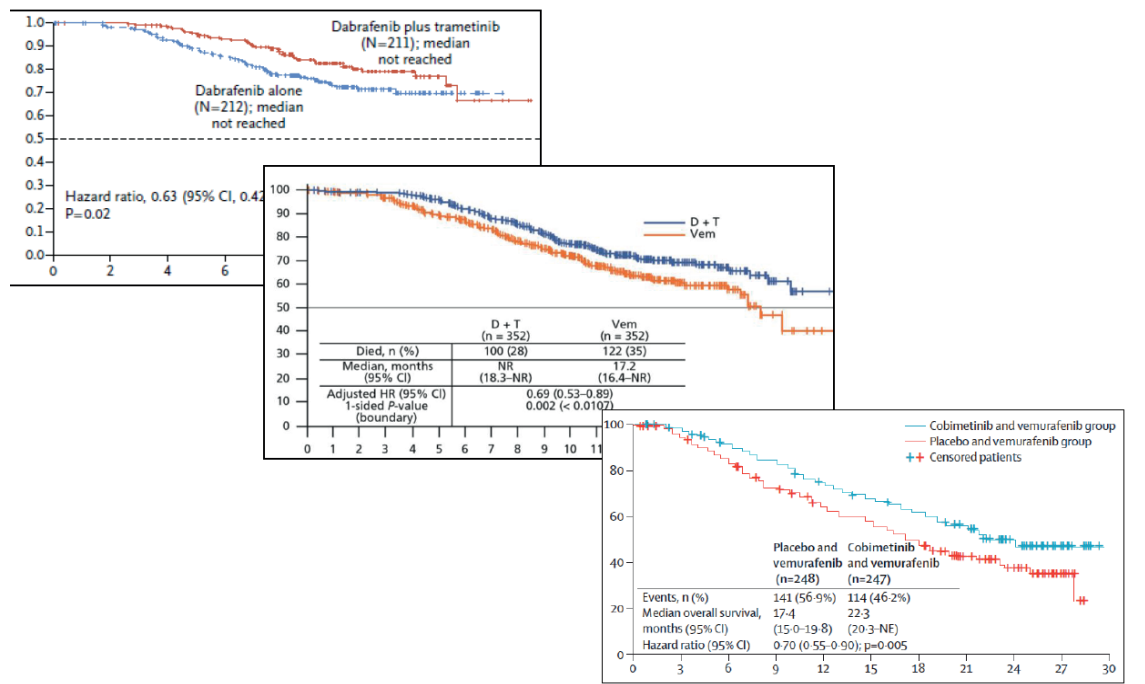


Précédemment il y avait une quasi absence de traitement. Il était pratiqué une chimiothérapie avec la DACARBAZINE. Actuellement, si le bénéfice du VEMURAFENIB est toujours important, il s'avère moindre par le fait des résistances secondaires. La survie sans progression est de 6 mois. À cette date, la moitié des patients ont déjà récidivé. Il y a donc énormément de résistances secondaires sous traitement par anti BRAF en monothérapie.



TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Une amélioration a été réalisée en combinant un anti-BRAF et un anti-MEK. Les protéines MEK1 et MEK2 sont en aval de BRAF sur la voie de biosynthèse des MAPK-kinases. Ainsi on verrouille au mieux cette voie des MAPK-kinases.



Nous avons effectué trois essais randomisés avec des résultats en terme de survie globale qui montrent que, quand on combine un anti- BRAF et un anti-MEK, on fait mieux qu'avec un anti-BRAF seul. Au début de ce traitement, 70 % des patients ont des réponses rapides et importantes et la survie globale médiane est de 2 ans. On passe de 6 mois à 2 ans.

La survie médiane globale avec cette thérapie ciblée est tout à fait équivalente à celle des monothérapies anti PD-1 comme nous allons le voir.

Le problème est que l'on n'ose pas arrêter le traitement car le risque de récurrence est quasiment certain dans un laps de temps assez court. Des patients sont traités depuis 5-6 ans par cette bithérapie qui est bien supportée; ils sont en réponse complète. Ce n'est pas à négliger et nous allons l'utiliser en combinaison avec les immunothérapies.

Cependant, les résistances sont multiples et nous essayons de les déjouer.

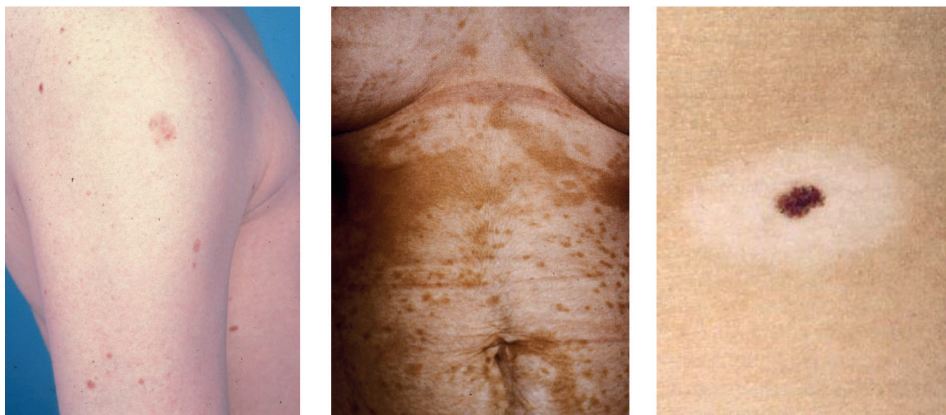
Nous travaillons sur ce complexe d'initiation de la traduction qui est en aval de la voie des MAPK-kinases et de la voie PI3-kinase. Celle-ci est également très importante dans la biologie de la cellule tumorale. Nous avons montré dans l'équipe que je codirige à Gustave Roussy, qu'en agissant sur ce complexe d'initiation de la traduction, on déjouait la plupart des mécanismes de résistance démontrés jusqu'alors. Cette initiation de la traduction se révèle donc une cible intéressante.

Immunothérapie

L'immunothérapie s'est vraiment développée avec la découverte d'un anticorps l'IPILIMUMAB. anti CTLA-4

En préambule quelques exemples pour démontrer que le système immunitaire peut agir sur les mélanocytes tumoraux normaux

Je vous montre, à gauche, l'épaule d'un jeune homme qui est décédé de son mélanome. Au départ, il avait sur l'épaule un fantôme de mélanome et sa petite amie disait : « je me souviens, cette lésion était plus foncée et elle a été enlevée ».



Il n'y avait plus de mélanocytes, il restait des mélanophages, c'est-à-dire des macrophages remplis de pigments, des lymphocytes, de la fibrose. Ce mélanome de la peau avait donc complètement régressé.

Cependant lorsqu'il est arrivé en soin, il avait déjà un gros ganglion métastatique sous le bras et des métastases sont rapidement apparues ailleurs...

La semaine dernière, j'ai vu une autre patiente métastatique avec un fantôme de mélanome. Il y a eu une régression totale sur la peau, mais malheureusement le système immunitaire n'est pas suffisamment efficace ou équipé pour agir où se trouve les métastases. Nous avons aussi des patients qui arrivent métastatiques mais sans mélanome retrouvé, sans histoire de lésion enlevée.

Éric TARTOUR nous a parlé du vitiligo. C'est une maladie bénigne qui existe en dehors du mélanome, mais on l'observe parfois chez nos patients. (Image du centre) Il résulte d'un dépassement de la réponse immunologique.

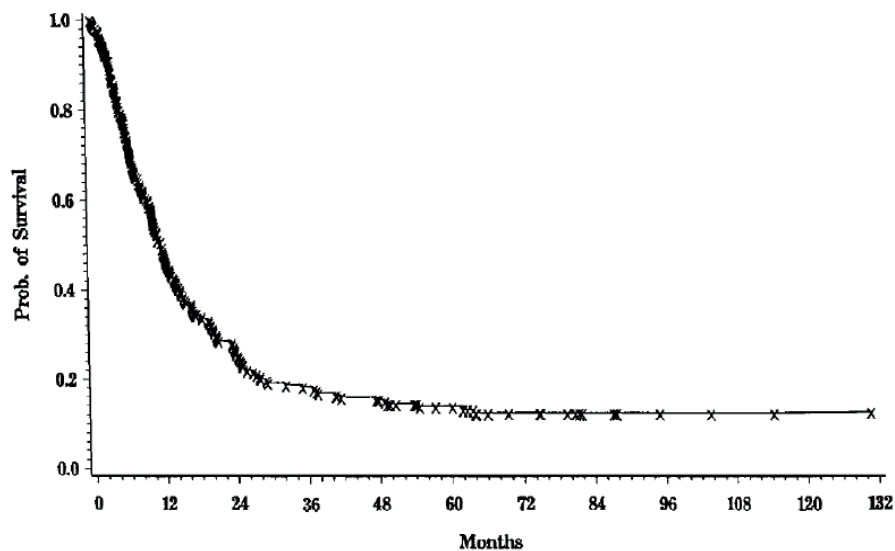
L'halo-nævus (image de droite) est un phénomène que l'on observe en dehors de tout mélanome. Il s'agit aussi d'une réaction immunologique localisée autour d'un nævus pigmentaire ou parfois d'une métastase de mélanome.

Le cancer du rein et le mélanome étaient les deux cancers qui ont bénéficié le plus d'efforts de recherche en immunothérapie au laboratoire et en clinique sans grand résultat jusqu'au récent développement des anticorps.

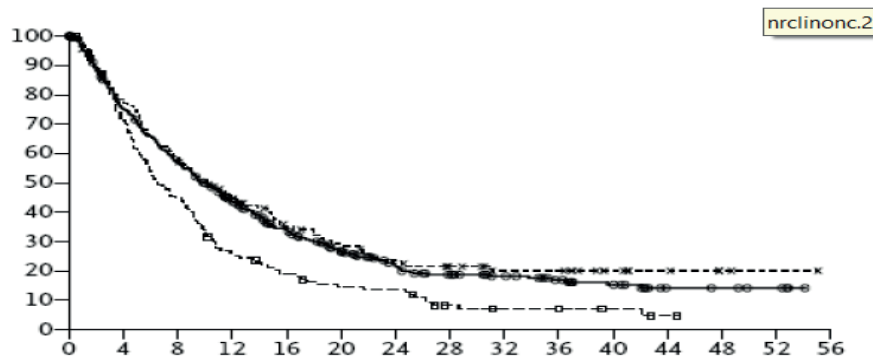
TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les États-Unis bénéficiaient de l'interleukine 2 à fortes doses, traitement extrêmement toxique car des patients décèdent suite au traitement. Mais la courbe de survie de l'interleukine 2 est intéressante car elle ressemble beaucoup à celle de l'IPILIMUMAB, si ce n'est que pour ce dernier, le plateau est plus haut à cause d'une meilleure efficacité. On parle beaucoup du plateau ou de la fin de la courbe. Avec l'IPILIMUMAB, bien qu'il soit plus haut, nous avons la même allure de courbe avec initialement le décès de nombreux patients. Mais des patients ont été guéris avec l'interleukine 2.

C'est bien la preuve que l'immunothérapie peut fonctionner.



**Pre-treated-pts
+/- gp100
HLA-A2
3mg/kg
Re-induction possible**



TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

C'est avec les anticorps monoclonaux anti CTLA-4, anti PD-1 et anti PD-L1 qu'un grand progrès a été réalisé. A ce sujet des explications très claires ont déjà été données, je vais être brève.

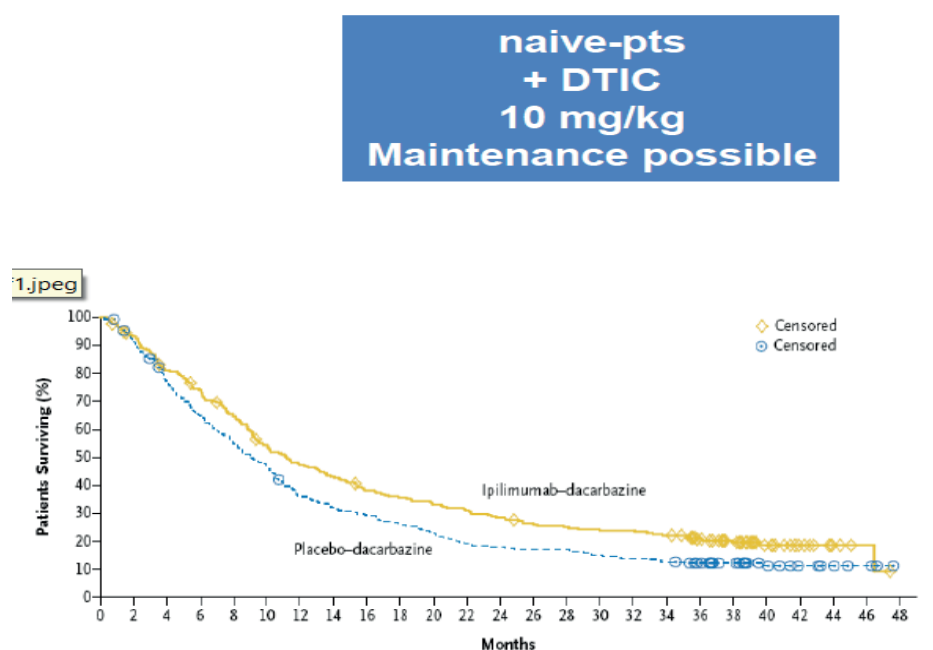
Considérons toutefois un antigène du mélanome, il est porté par les cellules de Langerhans via le liquide lymphatique afférent qui arrive dans la zone corticale T dépendante du ganglion sentinelle. Il pourra rencontrer des lymphocytes naïfs qui patrouillent entre le sang et ces zones au cas où on leur présente un antigène. S'ils n'en trouvent pas, ils repartent avec le sang.

Excepté les zones tertiaires dont parlait Hervé FRIDMAN, dans le mélanome, avec l'anticorps qui marque les *high endothelial venules*, des zones ganglionnaires n'ont pas été observées dans les métastases. En règle générale, les lymphocytes T sortent au niveau des zones T dépendantes et en présence de l'antigène, il y a présentation, costimulation, sécrétion de cytokines, prolifération et au bout de 2 jours, il faut calmer le processus. CTLA-4 va alors apparaître avec plus d'affinités pour les molécules de costimulation sur la cellule présentatrice d'antigènes et va arrêter cette prolifération et la sécrétion de cytokines. Le lymphocyte a acquis sa mémoire. D'autres molécules d'adhésion vont lui permettre d'aller plus efficacement à l'extérieur, notamment dans les zones inflammatoires et dans les métastases où il peut, si on lui présente son antigène, être à nouveau activé et réagir jusqu'à ce que d'autres molécules qui auront comme rôle de freiner cette réaction, comme PD-1 sous l'influence de l'Interféron, apparaissent à la surface et interagissent avec ces ligands.

On connaît beaucoup plus PD-L1 que PD-L2 car les anticorps marchent moins bien sur PD-L2. PD-L1 est exprimé sur les cellules tumorales sous l'influence de l'interféron, parfois en dehors de cette influence ou par d'autres cellules du microenvironnement. Cette interaction entraîne une désactivation du lymphocyte. L'anticorps aura pour rôle de la bloquer

Avec les anticorps anti CTLA-4, on peut également avoir chez l'homme une action en périphérie par le biais d'une déplétion en lymphocytes T régulateurs dans les métastases.

Bloquant ces freins, il ne faut pas être étonné d'avoir une activation immunologique. Elle est non spécifique et explique la toxicité qui peut être rencontrée.



Un essai a permis la mise sur le marché de l'IPILIMUMAB, médicament que l'on administre par voie intraveineuse en 4 injections séparées de 3 semaines à la dose de 3 mg par kilo. Le protocole d'administration ne repose pas sur des éléments extrêmement scientifiques. Ce n'est pas comme des antibiotiques que l'on peut doser dans le sang et réaliser un antibiogramme. On n'est pas certain d'avoir le schéma optimal.

Nous venons d'avoir le résultat d'un essai avec 10 mg par kilo. Il est plus efficace que 3 mg mais plus toxique.

Maintenant on utilise beaucoup les combinaisons de l'IPILIMUMAB avec les anti PD-1. Nous ne savons pas ce que nous allons faire de ce résultat de 10 mg/kg. Il démontre un effet dose avec l'IPILIMUMAB.

Ces courbes ressemblent à l'IL-2 car nous perdons beaucoup de patients au début.

Des essais ont été réalisés avec l'IPILIMUMAB plus le vaccin, un peptide dérivé de GP 100, le vaccin seul et l'IPILIMUMAB seul. Le vaccin n'ajoute ni efficacité ni spécificité, alors qu'initialement on pensait qu'on activerait le système immunitaire.

Nous avons également combiné l'IPILIMUMAB à une dose forte de chimiothérapie en espérant que la lyse cellulaire de quelques cellules par la chimiothérapie pourrait apporter un bénéfice. En fait, cela n'a pas ajouté grand-chose, si ce n'est de la toxicité hépatique.

L'autorisation de mise sur le marché a donc concerné la monothérapie, 3 mg par kilo pour 4 injections en intraveineuse.

Cela ne va pas sans effets secondaires qu'il a fallu appréhender. Nous n'avions pas l'habitude de ces effets secondaires de type immunologique.

Il s'agit de réactions cutanées et sur la muqueuse digestive. En fait, on crée des maladies de Crohn, des réactions inflammatoires du tube digestif. Au début du développement de ce médicament, des perforations digestives se sont produites. En effet, les ulcérations peuvent être très profondes et si elles ne sont pas traitées tôt, elles peuvent être fatales et nécessitent des interventions en urgence. Il faut alors arrêter le traitement, injecter de fortes doses de corticoïdes, voire des anti-TNF pour calmer le système immunitaire.

Les atteintes peuvent aussi être endocriniennes. L'hypophyse peut aussi se retrouver gonflée dans sa selle turcique. On induit parfois de grandes insuffisances hypophysaires qui sont en général définitives. Les patients doivent prendre des hormones toute leur vie. S'ils répondent au traitement et s'ils sont guéris, nous pensons toutefois que c'est supportable.

Les effets neurologiques sont ceux qui nous font le plus peur. Ils sont totalement imprévisibles. Heureusement, ils sont très rares. Les patients développent des polyradiculonévrites d'apparition rapide. Un patient a passé 4 mois en réanimation pour une paralysie respiratoire associée à d'autres nerfs et a failli mourir de son traitement par IPILIMUMAB.

Heureusement, cet effet secondaire est très rare, mais possible. Il faut que les prescripteurs de ces médicaments soient vigilants car nous n'avons pas encore connaissance de tous les effets secondaires possibles.

Avec l'IPILIMUMAB, les effets secondaires sont considérés comme graves dans 25 % des cas. Il faut faire un travail d'information des patients et de tous les médecins en relation avec eux car les corticoïdes ne sont pas le premier traitement auquel on va penser lorsqu'on consulte pour

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

une diarrhée. Il faut informer toute la communauté médicale sur les effets secondaires de ces nouveaux médicaments.

Le bénéfice de l'IPILIMUMAB apparaît dans le pourcentage de patients qui vont survivre. Il est d'environ 25 % avec un plateau à 3 ans. Quand un patient a survécu et répondu à l'IPILIMUMAB à 3 ans, les chances sont très élevées qu'il soit encore vivant à l'horizon de 5 à 10 ans. Mais les taux de réponse sont mauvais. Ils sont de l'ordre de 10 à 15 % et la durée sans progression ne rend pas compte de l'efficacité du médicament. La chute de la courbe au début, avant le plateau, dure 3 mois. La plupart des patients à leur première évaluation vont déjà être en progression. Ce plateau est vraiment important.

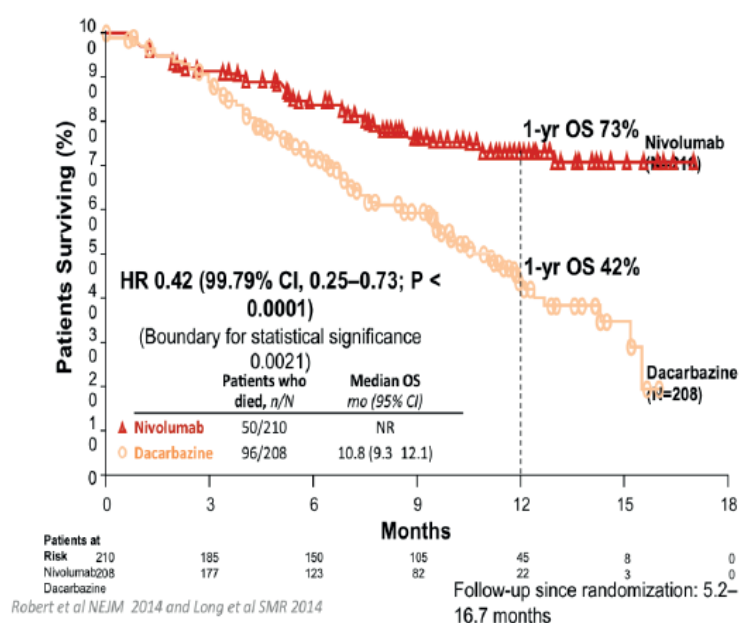
Avec les anti-PD-1, nous avons une efficacité supérieure et une moindre toxicité.

Ils ont été développés très rapidement. Des phases I avec le PEMBROLIZUMAB ont été lancées sur 107 patients puis 655 patients, ce qui est unique. D'habitude, les phases I concernent des petits groupes de patients avec recherche de toxicité et de doses d'efficacité.

Les laboratoires MSD et BMS ayant immédiatement noté ces résultats spectaculaires, avec des amendements, ont pu augmenter les cohortes. Ils ont ainsi réussi à enregistrer le PEMBROLIZUMAB sur la base de phase I ; ce qui est exceptionnel.

Nous obtenons 30 à 40 % de réponses objectives. Nous ne sommes pas au niveau des thérapies ciblées, mais cela commence à être très valable. La survie sans progression est d'environ 6 mois et à deux ans, 50 % des patients sont en vie. Les taux de survie médiane sont donc semblables à ceux avec les thérapies ciblées combinées les plus efficaces.

Des phases III ont été conduites très rapidement et se sont d'ailleurs chevauchées avec les phases I. Une phase III a comparé le NIVOLUMAB à la chimiothérapie. Ces patients n'étaient pas mutés pour BRAF. La différence est tellement énorme dans cet essai que quand nous avons pu obtenir, par autorisation transitoire d'utilisation, l'accès à un autre anti PD-1, il n'était plus possible éthiquement d'inclure les patients dans cet essai.



TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Cette différence extrême a définitivement éliminé la chimiothérapie en première intention de traitement chez les patients atteints de mélanome métastatique.

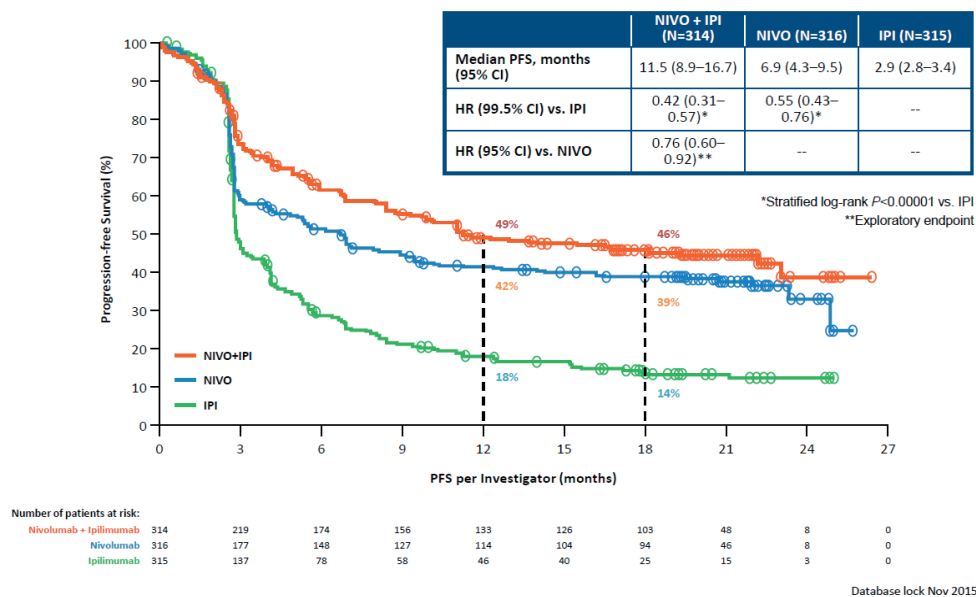
Le vrai contrôle n'était plus la chimiothérapie mais l'IPILIMUMAB. L'IPILIMUMAB a été comparé au PEMBROLIZUMAB à deux doses différentes. Avec le NIVOLUMAB et le PEMBROLIZUMAB, nous n'avons pas l'impression d'avoir des effets de dose. Nous avons testé plusieurs doses sans observer de différence significative. D'ailleurs, on a tendance à donner une dose de 200 mg de PEMBROLIZUMAB décorrélée du poids.

Il apparaît une différence tout à fait significative et qui s'est maintenue au cours du temps. Elle est moins grande qu'avec la chimiothérapie. Nous allons prochainement avoir les résultats à trois ans. Il sera important de voir l'effet après 3 ans. Aurons-nous le même plateau qu'avec l'IPILIMUMAB ? C'est toute la question.

Ces deux anticorps n'agissent pas exactement au même endroit dans le corps ni sur les mêmes sous-types lymphocytaires. Il est donc logique de penser qu'en les associant, nous pouvons obtenir un effet synergique.

Une phase I publiée très rapidement par l'équipe de Jedd WOLCHOK a montré des résultats encourageants. Le taux de réponses est autour de 50 % et l'allongement de la survie sans progression approche un an versus 6 mois pour les anti-PD1 seuls. Toutefois, la toxicité est assez alarmante sur près de 60 % des patients qui présentent des effets secondaires graves.

Néanmoins, une phase III a été enclenchée très vite combinant IPILIMUMAB plus NIVOLUMAB, NIVOLUMAB seul et l'IPILIMUMAB seul. Comme BMS est propriétaire des deux médicaments, il a été facile de mettre en place cet essai rapidement.



Nous avons les résultats de survie sans progression mais pas encore les résultats de survie globale. Nous les attendons avec beaucoup d'impatience.

Le bénéfice n'est pas énorme, 7 % de plus de patients n'ont pas de progression à 18 mois. Mais les taux de réponses sont de plus de 50 % et l'allongement de la durée de survie sans progression est significatif.

Malheureusement, nous avons affaire dans 60 % des cas à des effets secondaires violents qui apparaissent très rapidement. La toxicité de l'IPILIMUMAB est très rapide et très forte. Après une injection de cette combinaison, des patients, 15 jours après, ont avec 40° de fièvre, une hépatite grave...

Il faut informer les patients du risque qu'ils prennent quand ils débutent ce traitement.

Céline BOUTROS et Emilie LANOY ont réalisé un important travail de recensement de tous les effets secondaires rapportés dans les essais pour plus de 100 patients. Les effets les plus fréquents sont diarrhée, fatigue, nausée, prurit, éruption cutanée. Puis, surviennent rapidement des effets secondaires de type auto-immun.

Nous remarquons qu'avec les anti PD-1, les colites sont beaucoup moins fréquentes. Elles sont de forme différente, plutôt des colites microscopiques ou collagènes. Nous observons moins de colites de type Crohn.

En revanche, il y a parfois des pneumopathies immuno-allergiques, observées très rarement avec l'IPILIMUMAB. Dans les premiers essais de phase I, ces patients souffraient de cancers du poumon. Il n'est donc pas anodin que la cible soit pulmonaire, mais il y a eu 3 décès de pneumopathie immuno-allergique. Au tout début, nous avons craint que le poumon soit le site des effets secondaires de l'anti PD-1 comme le colon pour les anti CTLA-4.

Heureusement, cette manifestation reste rare, mais des patients sont essoufflés. Il faut bien l'expliquer aux médecins qui les traitent : bien les ausculter, leur demander s'ils sont essoufflés, ne pas hésiter à leur faire des lavages.

Des patients ont des lésions organisées de pneumopathie qui deviennent ensuite interstitielles avec des images plus évidentes de toxicité.

Au début, il faut être vigilant car cela peut ressembler à des nodules tumoraux. En croyant qu'il s'agit d'une progression, on peut arrêter le traitement et en donner un autre, alors qu'ils répondent mais avec cet effet toxique. Il ne faut pas hésiter à faire une biopsie des lésions, même quand elles sont pulmonaires. Malgré le nombre élevé de patients présentant des effets de toxicité, il y a eu très peu de décès.

Les réponses ne semblent pas affectées par l'arrêt du traitement.

Il est obligatoire chez 40 % des patients pour toxicité. Toutefois, les durées et les taux de réponse ne sont pas affectés pour la petite cohorte de 35 patients qui ont dû s'arrêter par rapport aux 95 patients ayant reçu la combinaison.

Nous avons l'expérience, les uns et les autres, de patients en réponse complète après avoir reçu une ou deux injections de ces combinaisons mais pour lesquels il a fallu arrêter pour toxicité. C'est fantastique. Ils n'ont plus à subir le traitement et continuent à répondre. Bien sûr, il aurait été préférable qu'ils ne fassent pas une hépatite de grade élevé, mais c'est extrêmement intéressant. Cela nous incite à optimiser les doses et à mieux sélectionner les patients.

Une petite parenthèse sur un effet secondaire qui n'est pas très grave, même si les patients ne sont pas très contents de devenir tout décolorés : suite à une étude prospective, le vitiligo est rapporté dans à peu près 7 à 8 % des cas de patients qui reçoivent un anti-PD-1.



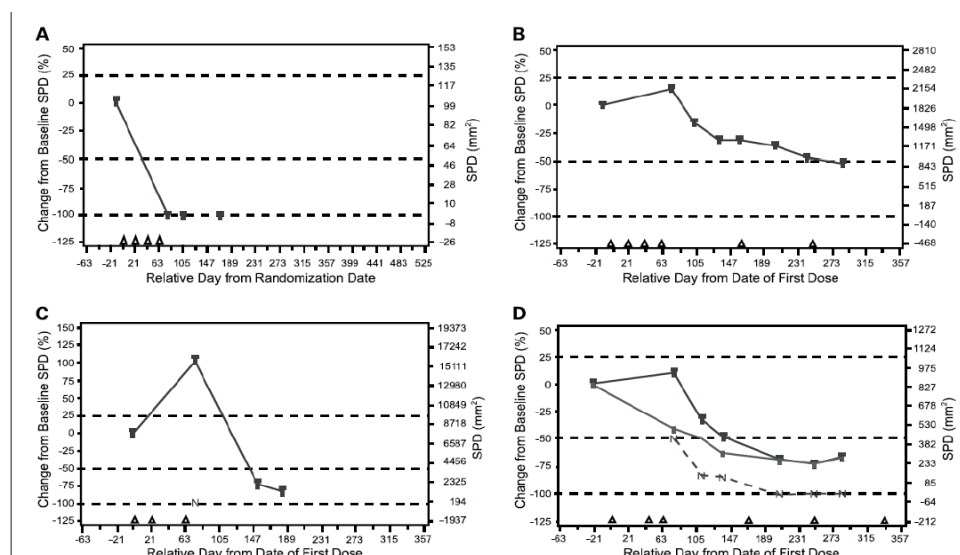
Nous avons l'impression que c'était plus fréquent car nous avons suivi les 70 patients inclus dans l'essai de phase I. Tous ont été vus déshabillés par des dermatologues. Le vitiligo avait été observé sur 25 % des patients. En plus, il est corrélé à la réponse au traitement.

Sur la survie, cela ne ressort pas, car la série est trop petite. Nous avons maintenant des résultats de collègues qui retrouvent ce lien entre l'apparition du vitiligo et la réponse au traitement. Ainsi quand les patients sont un peu catastrophés, cela nous permet de leur dire que l'apparition d'un vitiligo est peut-être un bon signe!

Nous ne l'observons pas avec le cancer des poumons. Il n'y a pas de vitiligo ou très peu chez les patients traités pour d'autres cancers que le mélanome.

Autre nouveauté, en plus de ces effets secondaires, ce sont les cinétiques de réponses : lorsque nous évaluons les patients, nous déterminons des lésions cibles, nous comptons un certain nombre de métastases et les radiologues additionnent la taille des métastases en centimètres. A partir de cela, nous représentons graphiquement la pente de diminution ou d'augmentation.

Nous avons observé, dans certains cas, des réponses avec une augmentation initiale voire l'apparition de nouvelles lésions. Cela a été l'occasion d'éditer de nouveaux critères d'évaluation appelés « *Immune-Related Response Criteria* », prenant en compte, au moins lors des premières évaluations, de nouvelles lésions ou des augmentations de taille avant de déclarer que le traitement progresse dans la bonne voie.



Avec l'IPILUMUMAB, nous avons environ 10 % des répondeurs avec cette progression initiale. C'est difficile pour les patients et les médecins de savoir jusqu'où aller. Évidemment, il y a les effets secondaires. S'ils ne sont pas rédhibitoires, nous nous autorisons à continuer, si le patient est d'accord et en bon état général.

Des critères nouveaux viennent d'être édités qui vont peut-être nous aider. Avec les anticorps anti PD-1, nous voyons ce genre de pseudo-progression. Nous n'avons pas la certitude du mécanisme : est-ce juste le délai d'action, qui est plus long, car l'action est indirecte ? Est-ce du fait d'un infiltrat inflammatoire initial qui rend compte de l'augmentation de volume ? Cela n'a pas toujours été bien analysé. Si on fait des biopsies, on va trouver des lymphocytes et des cellules tumorales. En l'absence de grands nombres, ce sera difficile d'interpréter.

Une patiente, présentant une lésion au niveau du pli de l'aîne avait été traitée dans la phase I. Après 4 mois, quand elle nous demandait si nous étions sûrs de l'efficacité du traitement, nous étions un peu embêtés pour lui répondre. Nous n'avions pas d'alternative. Elle n'était pas vraiment accessible à d'autres traitements. Dans son foie, les métastases augmentaient de taille également. Elle a été courageuse et elle est actuellement en réponse complète. C'est un exemple manifeste de ces progressions initiales sous traitement.

Encore une nouveauté concernant ces thérapies : La décision d'arrêter le traitement.

Spécialistes du mélanome, quand nous écrivons des protocoles, nous indiquons faire le traitement jusqu'à toxicité, retrait selon le souhait du patient, décision médicale. Nous n'avions jamais pensé à écrire : jusqu'à réponse complète !

Nous avons examiné les 655 patients inclus dans l'essai de phase I avec le PEMBROLIZUMAB. Nous avons présenté à l'ASCO les résultats à 3 ans : 40 % des patients sont vivants. Nous avons analysé plus précisément les 15% de patients en réponse complète.

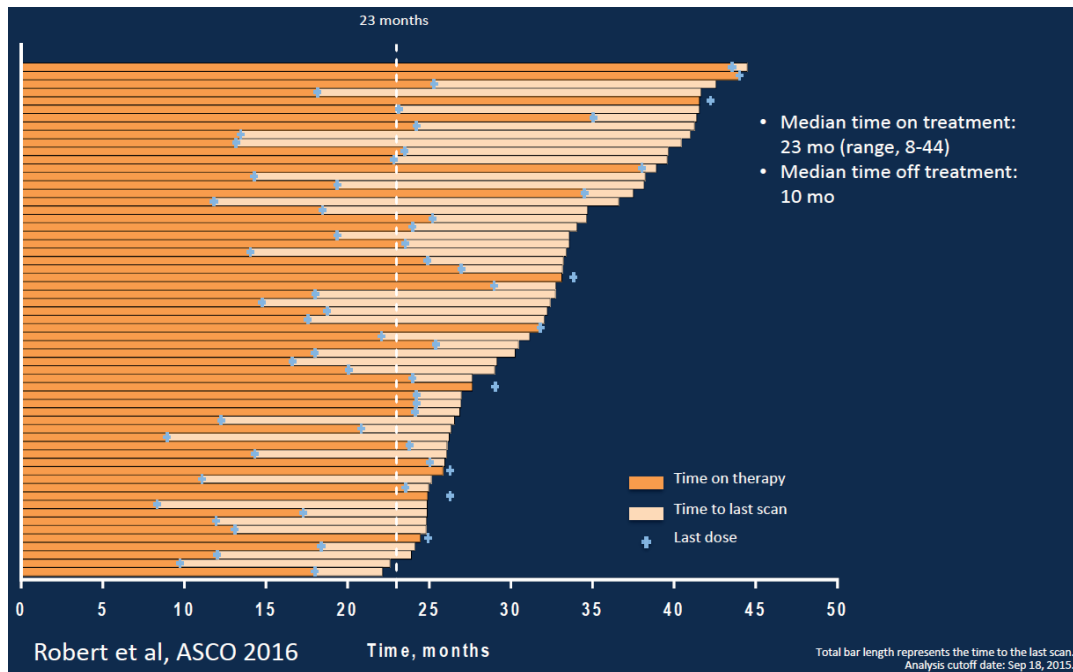
De ces 15 %, après 3 ans de recul, 89 % soit 95 sont encore en réponse complète. Qu'en est-il de la prise du médicament ? 19%, soit 18 malades, prennent toujours leur médicament. 17% (16 patients) ont arrêté : 9 pour effets secondaires, 2 seulement pour progression et les autres ont été perdus de vue. 64% soit 61 patients, la grande majorité, ont arrêté et sont simplement en observation.

Comment cela s'est-il déroulé ?

Certains patients nous ont dit : « J'en ai assez de venir toutes les trois semaines, je vais bien, cela fonctionne, je n'ai plus envie de poursuivre ce traitement, je pense que je suis guéri ». Nous étions bien embêtés, car nous ne savions pas si après un arrêt, le médicament allait fonctionner à nouveau.

Nous avons discuté avec MSD et nous sommes arrivés à l'accord suivant : si un patient récidivait, MSD fournirait le médicament, car il n'était pas accessible à l'époque. Un patient avait reçu le médicament pendant au moins 6 mois, avec une réponse complète. Elle avait été confirmée par deux scanners successifs. Nous avons décidé d'utiliser cela comme critères. Nous avons informé tous les centres et ainsi 61 patients ont arrêté.

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX



Sur ces « *swimming graft* » (lignes de piscine) chaque patient est représenté par une barre horizontale. En orange le temps sous traitement. En plus clair, celui sans traitement. Le temps médian de traitement est de presque 2 ans et celui d'arrêt du traitement de 10 mois. Au terme de ces presque 3 ans de recul, deux patients ont récidivé : un a été remis sous traitement et a répondu ; l'autre n'a pas répondu.

Parmi ces patients, certains sont depuis 3 ans et demi sans traitement alors qu'ils n'avaient pas que des petites métastases cutanées et ganglionnaires. Ils avaient parfois des métastases hépatiques, et d'autres aussi difficiles à traiter ! Ces patients sont-ils guéris ? Je l'espère, mais nous n'en sommes pas sûrs. C'est un énorme espoir de guérison pour ces patients.

Je vous raconte la suite avec la patiente précédente. Elle avait décidé d'arrêter. Malheureusement, un an après l'arrêt elle a récidivé. Cependant, comme il n'y avait qu'une lésion, nous sommes intervenus chirurgicalement. C'était un cancer du poumon non à petites cellules, qui avait peut-être profité de l'arrêt anti PD-1 pour apparaître et se développer. Aujourd'hui, cette patiente est toujours en réponse complète de son mélanome et de son cancer du poumon.

Maintenant se pose la question des biomarqueurs. Comment choisir un traitement ?

Qui a besoin d'une combinaison ? Qui ne va pas répondre à l'immunothérapie et qui a besoin d'emblée de faire un traitement ciblé s'il est BRAF muté ?

La question qui nous est toujours posée est : si vous avez un patient BRAF muté, par quel traitement commencez-vous ? Thérapie ciblée ou immunothérapie ? Nous n'avons pas encore les réponses. Elles ne viendront que par des essais cliniques et ce ne sont pas les petites expérimentations des uns et des autres qui pourront apporter une réponse.

Nous avons déjà cité cet article de l'équipe d'Antoni RIBAS, où un algorithme assez complexe a été créé. Il y avait l'expression de PD-1, de PD-L1, la présence de CD8, la clonalité de ces lymphocytes CD8. Antoni RIBAS m'a demandé quelques prélèvements. Je ne l'ai pas informé si les patients étaient répondeurs ou pas. Il s'est très peu trompé quand il a passé au crible de cet algorithme les probabilités de réponse ou de non-réponse.

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Le facteur le plus prédictif était la présence de CD8 à la marge active de la tumeur. C'est un élément qui n'est pas utilisable en routine.

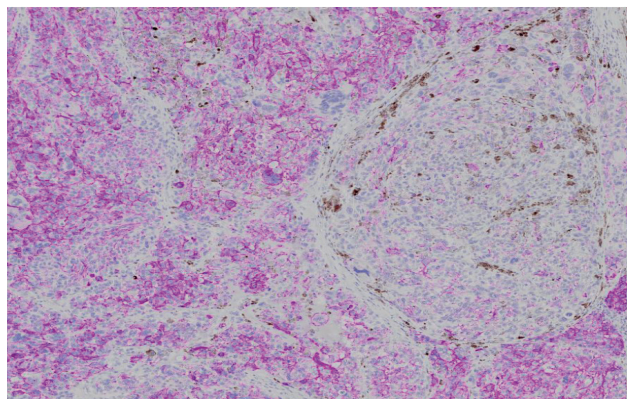
L'expression de PD-L1 a été mise en avant. Si les ligands de PD-1 ne sont pas là, le bloquer ne va pas être très utile. Nous savons que PD-L1 peut être exprimé sur les cellules tumorales ou sur les cellules du microenvironnement.

C'est un peu idéal et souvent très difficile. En rétrospective, quand nous regardons l'expression de PD-L1, plus cette expression est forte, que ce soit sur les cellules tumorales ou sur les cellules immunocompétentes de l'environnement, plus nous avons de réponses positives, sauf que ce n'est pas du tout standardisé et qu'il y a plusieurs anticorps possibles...

Je déplore beaucoup d'avoir eu accès très tard à ces anticorps et que chaque Société les garde pour développer son test compagnon. Nous avons perdu beaucoup de temps pour les comparer et ce n'est encore pas très clair. Certains sont plus efficaces pour marquer les cellules immunitaires, d'autres pour marquer les cellules tumorales. Certains marquent la portion intracellulaire, d'autres celle transmembranaire. Les seuils sont différents.

La plupart des immuno-marquages donnent des résultats en marron, dans le mélanome, il y a de la mélanine brune ce qui fait que c'est très difficile de savoir si nous avons affaire à de la mélanine ou au marquage.

Nous avons utilisé un marquage qui donne un résultat en rose.



Sur la photo de cette tumeur le PD-L1 apparaît en rose. Si vous faites la biopsie à un endroit on trouvera une faible expression de PD-L1. À un autre endroit, il y aura une forte expression. Ce n'est pas homogène, c'est la difficulté dans le cas du mélanome. Heureusement que l'on n'est pas restreint à prescrire le médicament chez les patients qui ont une forte expression de PD-L1, comme c'est le cas pour d'autres tumeurs.

Nous avons fait l'expérience chez certains de nos patients en faisant la biopsie de plusieurs métastases à la fois : l'une est trouvée positive et l'autre négative.

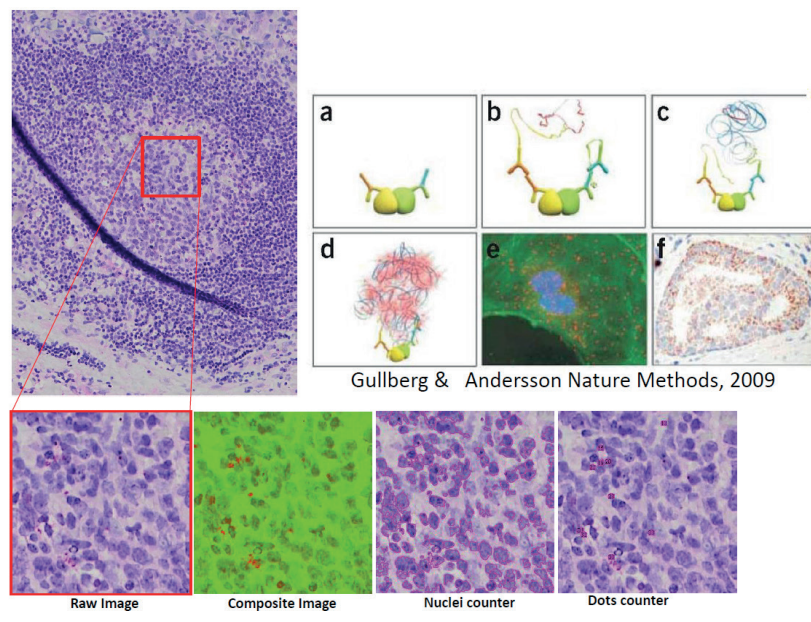
Parfois avec des résultats de PD-L1 négatifs sur une biopsie, nous avons quand même de très belles réponses !

De plus, nous avons analysé rétrospectivement les essais de traitement par NIVOLUMAB ou par la combinaison NIVOLUMAB/IPILIMUMAB, pour voir si l'expression PD -L1 avait une valeur prédictive. Le résultat montre clairement que nous ne pouvons pas nous appuyer uniquement sur ce critère pour décider ou non d'un traitement par anti PD-1.

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

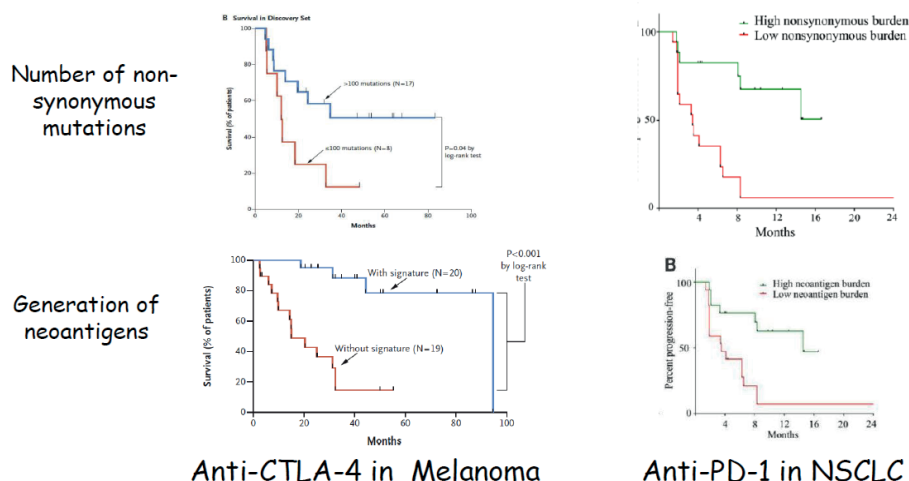
Nous avons mis au point un test : « *proximity ligation assay* » et j'espère que nous allons pouvoir le diffuser plus largement. Il est utilisé dans le cadre du laboratoire quand on veut montrer la proximité de deux protéines.

Nous l'avons adapté à PD-1 et PD-L1. À chaque fois que vous voyez un petit point, cela signifie que nous avons une molécule de PD-1 qui risque fort d'être engagée car elle est très près de la molécule de PD-L1. C'est très fortement prédictif et corrélé avec de très bonnes réponses aux anti PD-1, complètes ou partielles. J'espère que c'est un test qui va pouvoir être développé.



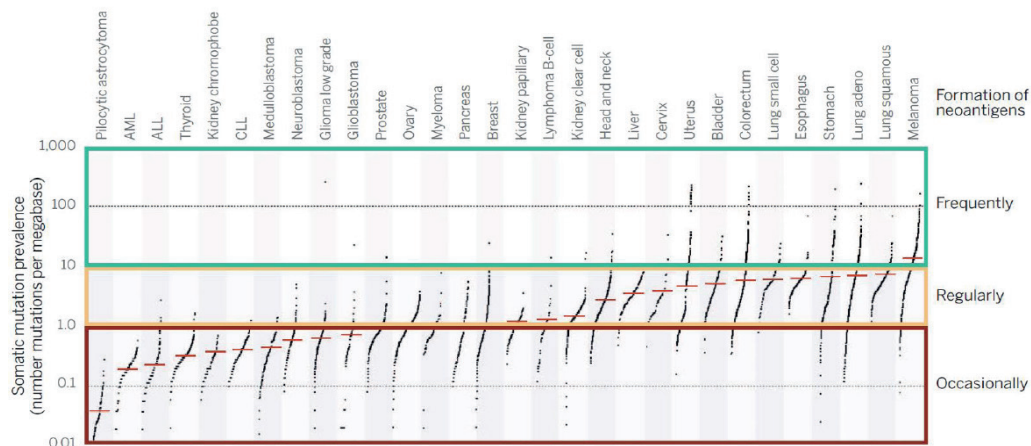
Par ailleurs, en ce qui concerne les néo-antigènes, Wolf Hervé FRIDMAN nous a bien expliqué les travaux de Bob SCHREIBER chez la souris. Ils ont montré que ces néo-antigènes étaient ceux impliqués dans le rejet tumoral et que les lymphocytes spécifiques de ces antigènes sont ceux qui sont réactivés par nos molécules.

Chez l'homme, deux premiers articles : l'un dans le mélanome et l'autre dans le poumon montrent que plus il y a de mutations, surtout si ces mutations peuvent donner lieu à des néo-antigènes, plus nous allons avoir des résultats bénéfiques pour nos patients.



TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les différents cancers peuvent être classés en fonction des mutations somatiques et des néo-antigènes



Sur la figure précédente, à l'extrême droite se trouvent le cancer du poumon métastatique et le mélanome métastatique. Ce sont les cancers hyper mutés qui trouvaient toujours le moyen pour déjouer les traitements classiques à cause de leur haut taux de mutations (tabac, soleil). Maintenant, il s'avère que ce sont des cancers qui répondent bien à la faveur de ces néo-antigènes. Cela ne fonctionne pas dans tous les cas notamment pour le côlon. Pour le poumon, les personnes qui fument répondent beaucoup mieux que les patients qui ne fument pas : la revanche des fumeurs !

Il faut mentionner que ce n'est pas parce qu'une mutation existe que l'ARN va être ensuite traduit. Le taux d'ARN n'est pas représentatif directement du taux de protéines. C'est régulé de façon complexe. Il ne faut pas juste s'appuyer sur un taux de mutations. Il faut analyser la transcription et la traduction. C'est un travail important qu'il n'est pas possible de réaliser en routine aujourd'hui.

Il y a en plus ce phénomène d'« *immunoediting* ». Si un clone lymphocytaire T réagit contre un clone muté, dans le meilleur des cas ce dernier va disparaître, mais comme il y en a d'autres, la tumeur va pouvoir échapper avec ces autres clones. Ce n'est pas si simple, d'autres articles nous montrent que les mutations ne vont pas être toutes très intéressantes...

Dans les cancers, des mutations clonales peuvent donner lieu à des mutations subclonales. Un article très intéressant, dans *Sciences*, montre pour le cancer du poumon, à partir de biopsies faites à différents endroits de tumeurs extrêmement hétérogènes, les mutations subclonales ne donnent pas lieu à des lymphocytes très puissants pour aller détruire ces clones. Cela encore pour illustrer la complexité du phénomène.

Dans beaucoup de cancers, nous regardons si les néo-mutations sont associées à une meilleure réponse. Par exemple dans le cancer génito-urinaire traité par PEMBROLIZUMAB, il existe un recouvrement énorme, c'est encore au niveau du concept à démêler avant de pouvoir l'utiliser en pratique.

Quelques mots concernant le microbiote digestif et le cancer. Beaucoup d'excellentes équipes travaillent sur le microbiote, notamment Laurence ZITVOGEL en France. Chez la souris, il y

a des résultats assez impressionnants. Chez l'homme, c'est un peu plus difficile. Il y a peu d'études.

Nous venons de finir une étude qui a duré six ans : nous avons prélevé les selles des patients avant et au cours des traitements par IPILIMUMAB. Nous avons trouvé qu'il n'y avait pas de modification de la flore au cours du traitement. Nous avons trouvé qu'un certain microbiote était associé non seulement au risque de colites, mais aussi à la réponse. L'association n'est pas extrêmement forte. C'est un facteur parmi d'autres, mais il peut être intéressant et nouveau.

Je finirai cette présentation par l'histoire d'un patient.

Un médecin, qui venait juste de prendre sa retraite a été diagnostiqué avec un mélanome catastrophique avec de multiples métastases pulmonaires et cérébrales. Il m'a demandé, bien au courant de la gravité en tant que médecin et ayant dirigé un service pendant plusieurs années: « *Cela vaut-il le coup ? J'aime la montagne* ». J'ai bien compris sa question. Je lui ai répondu : « *Je crois que cela vaut le coup* ».

Je pense que je n'aurais pas fait la même réponse il y a quelques années

Il n'était pas muté. Il a été traité par IPULIMUMAB. Il n'a pas répondu. Il a ensuite été traité par un anticorps anti PD-1. Il a répondu sur certaines métastases, notamment surrenaliennes. Il a subi de multiples opérations et radiothérapies.

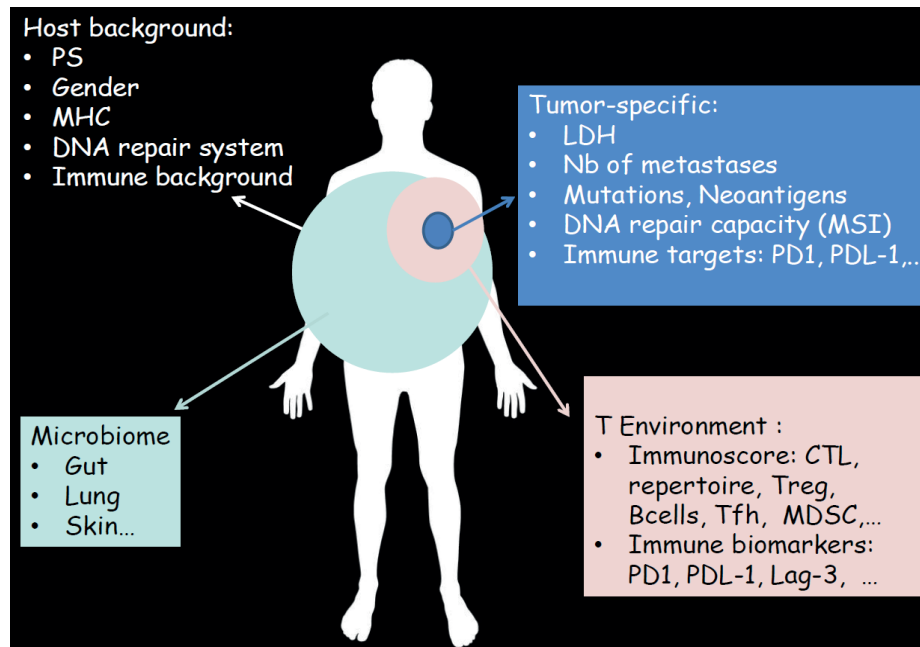
Je mentionne tout cela pour dire aussi que globalement nous avons progressé dans la prise en charge des mélanomes métastatiques grâce aux espoirs suscités par ces nouvelles thérapies. Les chirurgiens avec qui nous travaillons ne vont plus nous dire : « *Non, c'est un mélanome métastatique, j'ai autre chose à faire* » et les radiothérapeutes : « *Je ne fais que trois lésions et de trois centimètres maximum* ».

Cet homme a eu dix ou quinze séances de radio-chirurgie. Deux après la découverte de son mélanome métastatique, il est en vie et sans lésion visible. C'était impensable avant la découverte des anticorps. C'est parce que nous avons ces médicaments que nos collègues ont changé aussi leur façon de traiter les patients.

C'est vraiment très différent. Je n'arrête pas de dire à mes internes : « Vous ne vous rendez pas compte de ce que vous vivez maintenant ». En fait, ils ne se rendent pas compte, car ils n'ont pas vécu ce passé qui n'est pas très lointain.

Je ne pense pas que ce soit de la science-fiction : Dans quelques années nous arriverons à intégrer des données spécifiques de la tumeur, de l'environnement tumoral, peut-être des données sur le microbiome, des données génétiques sans doute, tout cela pour savoir comment traiter nos patients. Faut-il combiner thérapie ciblée, faire des séquences avec les immunothérapies ? Nous sommes au début. Je continue d'être très étonnée de voir les résultats avec un anti PD-1 seul. Nous pouvons voir des réponses durables. Maintenant, je pense que nous n'allons faire que mieux.

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX



C'est une révolution thérapeutique avec un réel espoir de guérison pour certains patients. La meilleure preuve de cela est de voir ce que nous faisons. Des jeunes femmes me demandent de garder leurs ovocytes. Avant, je trouvais toujours un moyen le plus délicat possible de les détourner de cette idée. Autant, pour les hommes, c'est facile. Autant, pour les femmes, c'est quand même une intervention chirurgicale, une stimulation hormonale. Maintenant, je le fais, car je me dis qu'elles vont peut-être guérir. Je trouve que c'est le meilleur exemple de ce que nous ressentons en tant que cliniciens.

Maintenant, il faut continuer les efforts pour des marqueurs prédictifs.

Il faut se rappeler aussi qu'il y a des patients pour lesquels il n'y a pas de progrès.

Des patients ont des LDH élevés (enzymes lactico-déshydrogénases). Ces enzymes ne reflètent certainement pas seulement la masse tumorale et le turnover cellulaire. C'est vraiment une image indirecte du *switch* métabolique de certaines tumeurs. Ces cancers vont aller très mal. Que ce soit en immunothérapie ou en thérapie ciblée. Un patient avec des LDH élevés, c'est vraiment un très mauvais pronostic.

Ceux qui arrivent avec de très nombreuses métastases cérébrales sont aussi des patients extrêmement problématiques. Il faut continuer les efforts pour eux.

Je finis en vous montrant les visages radieux de mes collègues en clinique. Nous ne sommes pas si nombreux que cela en tant que médecins. Il y a les attachés de recherche clinique, les assistantes médicales. La recherche clinique nécessite beaucoup de personnes pour remplir tous ces classeurs...

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Au-dessous, vous avez l'équipe de recherche. Stéphane WAGNER, juste derrière moi, dirige également un laboratoire à CURIE, il est expert dans tous ces contrôles de l'initiation de la traduction. Nous sommes en train de montrer aussi que l'expression de PD-L1 et d'autres ligands immunitaires est également soumise à régulation post-transcriptionnelle.

(Applaudissements)



► **Sébastien CANDEL.** - Merci beaucoup. Nous allons passer aux questions.

► **Jean-François BACH.** - D'abord, félicitations pour avoir démêlé aussi brillamment une situation complexe.

Ma première question concerne les effets secondaires auto-immuns. J'ai cru comprendre que les maladies auto-immunes observées n'étaient pas les mêmes avec les deux anticorps. L'insuffisance hypophysaire est plutôt avec anti CTLA-4 et avec l'anti PD-1 notamment, des diabètes de type 1 d'après plusieurs rapports.

Serait-il possible d'associer la nature des effets secondaires auto-immuns, je ne parle pas de toxicité, mais seulement des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires de l'intestin qui relèvent de la même physiopathologie, avec la nature de la réponse et donc de l'indication éventuelle de l'anticorps ?

► **Caroline ROBERT.** - C'est effectivement un sujet important. C'est vrai que ce n'est pas le même spectre de toxicité : thyroïde avec les anti-PD-1, hypophyse avec l'IPILIMUMAB. Pour le digestif, c'est également très différent.

Aujourd'hui, je ne pense pas que nous puissions, avec le profil ou le risque auto-immun des patients, choisir le médicament. Il faut regarder dans les facteurs génétiques. Nous en connaissons qui prédisposent au vitiligo. Est-ce que ces patients avec ces polymorphismes ou ces mutations vont aussi être ceux qui vont répondre ?

Aujourd'hui, *a priori*, ces essais n'ont pas inclus de patients avec une maladie auto-immune ou des prédispositions auto-immunes. Ils étaient plutôt exclus.

Parfois nous n'avons pas le choix. Pour quelqu'un qui va mourir de ses métastases, nous prenons plus de risques. Il nous arrive ainsi de traiter des patients qui ont déjà une maladie auto-immune à peu près contrôlée dans leur histoire par les traitements.

Je ne peux pas en dire plus. En revanche, tout récemment une publication mentionne que les effets secondaires du NIVOLUMAB de type auto-immun sont quand même associés à la réponse au même titre que le vitiligo. Jusqu'à présent, ce n'était pas très clair.

► **Jean-François BACH.** - Nous avons des données en laboratoire avec une souche de souris pure qui montre que, chez un même individu, la nature des manifestations auto-immunes induites par une sorte de dérégulation n'est pas la même suivant les cellules régulatrices en question.

Ma nouvelle question porte sur l'économie de la santé. Nous voyons bien l'extension des indications de ces anticorps monoclonaux aux mélanomes mais également à d'autres cancers. Quel est le coût de la prise en charge de ces malades ? N'allons-nous pas nous retrouver dans des situations où nous aurons des difficultés à assumer ces coûts, ce qui serait terrible ?

Le coût relativement élevé est-il justifié étant donné l'extension des indications car le prix avait été fixé alors que les indications n'étaient pas aussi importantes ?

► **Caroline ROBERT.** - J'ai toujours du mal à répondre à ces questions, car je ne suis pas économiste de la santé. Je ne m'y connais pas assez pour répondre.

Évidemment, ces médicaments paraissent très chers. Quels sont les budgets impliqués pour le développement de ces médicaments ? Je ne sais pas.

Il est vrai que maintenant ils ne vont pas être donnés seulement aux mélanomes métastatiques qui ne sont pas très fréquents. Nous avons à peu près 2 000 patients par an. Pour le poumon et d'autres cancers du fait qu'il y a beaucoup plus de patients concernés il va falloir très probablement baisser les prix pour pouvoir tous les traiter.

Je ne me sens pas très à l'aise pour répondre sur le prix des médicaments.

► **Jean-François BACH.**- Le prix de revient du médicament est infiniment plus bas que le prix de vente. Je sais bien qu'il faut amortir les dépenses de recherche. Cela va être un vrai problème d'économie de la santé. Je tiens à le dire de façon forte.

► **Caroline ROBERT.**- Un point rejoint un peu vos deux questions : combien de temps traiter avec un anticorps anti PD-1 ? Je parle des patients en réponse complète pour lesquels nous avons arrêté : c'est 15 %, ce n'est pas la majorité des patients, même si nous n'avons envie de ne retenir que cela.

Pour la plupart des patients, nous ne savons pas trop. Nous continuons. Ils sont stables. Ils ne progressent pas. Là, j'ai envie de dire aux industriels : il faut nous aider. Cela fait trois ans que j'essaie de mettre en place un essai arrêter versus continuer. Là, nous le donnons *ad vitam aeternam* alors que je suis intimement persuadée qu'au bout d'un an, il n'y a plus de bénéfice.

Le risque d'effets secondaires augmente. D'ailleurs, un patient a développé un diabète de type 1 après trois ans de traitement. Je ne sais pas s'il l'aurait développé en l'absence de traitement, peut-être pas...

J'aimerais qu'on m'aide à faire pression sur les laboratoires pour, bien que ce ne soit pas leur priorité, on puisse faire un essai « *arrêt versus continuer* ». C'est important. C'est un problème non seulement de santé mais aussi économique.

► **Éric TARTOUR.**- Il y a toute une discussion en ce moment sur des patients qui progresseraient plus vite sous anti-PD-1. On le rapporte moins dans le mélanome que dans les autres cancers.

► **Caroline ROBERT.**- Je pense que c'est vrai, il y a des hyper-progresseurs, même dans le mélanome. C'est difficile, car nous avons tellement de cas où les patients, traitement ou pas, progressent très vite. Un patient qui a une maladie agressive, nous n'allons pas nous

arrêter, donc nous n'avons pas beaucoup de recul. En tout cas, il y a des patients à qui cela ne fait rien. C'est vrai. Je me demande s'il n'y en a pas qui progressent même encore plus vite, peu nombreux, mais peut-être que cela existe.

► **Marc BONNEVILLE.**- Cela me fait penser à certaines publications d'il y a quelques années qui suggéraient que, dans certains cas, l'Interféron gamma pouvait être un facteur de pronostic délétère. On est peut-être dans des situations où il peut y avoir des effets paradoxaux de réponse pro-inflammatoire.

► **Caroline ROBERT.**- Oui.

(Applaudissements)

CAR T-CELLS : COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNÉRIQUE

Michel SADELAIN
Center for CEL Engineering,
Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York

► **Jean-François BACH.**- Michel SADELAIN est à la fois médecin et scientifique. Il a fait ses études de médecine en France. Après un séjour au Canada, il a rejoint le MIT. Maintenant, il est au prestigieux Sloan Kettering Institute.

Sur la base de cette double formation, il poursuit des études d'ingénierie cellulaire d'un haut niveau scientifique et s'implique également dans des essais cliniques dont il va nous parler.

Sa venue parmi nous est un plaisir particulier et en plus tout à fait opportune.



► **Michel SADELAIN.**- Je voudrais d'abord remercier Sébastien AMIGORENA, Monsieur le Secrétaire Perpétuel de l'Académie et la Fondation Mérieux pour l'invitation. C'est un très grand plaisir et un honneur d'être ici.

Je voudrais aussi remercier Jean-François BACH pour un fait qu'il ignore. Il y a plusieurs années, quand j'étais encore à Paris, c'est grâce à lui que j'ai pu faire mes premiers pas en immunologie en m'inscrivant dans un de ses cours de maîtrise de biologie humaine. Il était ouvert à l'époque aux internes en médecine. Aujourd'hui je vais vous présenter la suite de l'histoire.

Ce qui m'inquiète le plus c'est de m'exprimer en français. La dernière fois que j'ai donné une conférence dans la langue de Molière, c'était en 1995 à l'Institut Pasteur.

Je vais vous parler de la possibilité d'utiliser les lymphocytes comme médicament. Nous venons de voir qu'en oncologie, il y a encore peu de médicaments qui sont à la fois curatifs et vraiment efficaces et sûrs.

Une des clés pour réconcilier les impératifs parfois contradictoires de l'efficacité et de l'absence de toxicité c'est la spécificité : si un médicament est absolument spécifique, il pourra alors distinguer les cellules tumorales des normales.

Le système immunitaire est naturellement capable de distinguer des cellules différentes avec une finesse extraordinaire ; avec, en plus, parfois, des réponses prolongées. Pour cela, j'utiliserai le terme de pharmacologie « *long-acting* ».

Il manque souvent l'efficacité dans la durée je l'appellerai « *potency* ».

Il y a plusieurs années, nous avons pris une voie basée sur l'ingénierie génétique qui visait vraiment à augmenter la « *potency* » des lymphocytes T.

Il y a eu trois raisons fondamentales pour vouloir reconstruire des lymphocytes :

- **La première** est de permettre aux lymphocytes de reconnaître la tumeur : ce n'est pas toujours le cas. En effet, il y a les néo-antigènes dont nous avons beaucoup parlé ce matin. Mais, il y a aussi des tumeurs qui sont moins immunogéniques. Le répertoire des lymphocytes n'est pas infini. Aussi vaste qu'il soit, il est parfois limité et peut diminuer dans les conditions des maladies chroniques, y compris le cancer.

La raison pour construire des lymphocytes T synthétiques est de leur permettre de reconnaître non seulement les complexes des HLA, des peptides, mais aussi des structures telles que les sucres, les carbohydrates ou les glycolipides qui peuvent être aussi des cibles intéressantes sur les cellules cancéreuses. Pour cela, il faut leur introduire une catégorie différente de récepteurs, appelés CARs (Chimeric Antigen Receptors).

Ces CARs reconnaissent les antigènes d'une façon différente par rapport aux récepteurs physiologiques et ils sont indépendants du HLA. Comme vous l'avez entendu ce matin, un des mécanismes échappatoires des tumeurs vis-à-vis des réponses immunitaires est l'absence d'expression du HLA, ce qui prive tout lymphocyte d'un ligand. Avoir des récepteurs alternatifs qui fonctionnent indépendamment du HLA peut alors être intéressant.

En faisant toujours référence à la reconnaissance des tumeurs, idéalement, nous voudrions pouvoir cibler les cellules souches, c'est à dire les cellules initiatrices des cancers. Ce n'est pas facile, mais c'est peut-être une des clés pour avoir un traitement curatif.

- **La deuxième** raison est d'augmenter la « potency » des lymphocytes T.

- **La troisième** consiste à pouvoir fabriquer en quantité suffisante des lymphocytes T rapidement accessibles aux malades sans avoir recours, par exemple, à un vaccin qui peut fonctionner mais demande du temps. C'est l'étape que j'appellerai « supply ».

Il y a deux approches possibles: Aujourd'hui on opère avec des lymphocytes autologues, mais, dans le futur, on peut imaginer qu'il y aura des banques ou des pharmacies de lymphocytes. Ils auront été modifiés de telle sorte qu'ils pourront être compatibles avec plus d'un hôte.

La CAR thérapie et surtout le CD19 CAR thérapie, le prototype pour cette approche, n'est pas seulement de l'immunologie ; elle est à l'intersection de l'immunologie et de l'ingénierie génétique. C'est une forme d'immuno-pharmacologie qui a donné lieu à la création de nouveaux récepteurs pour les antigènes.

La CAR thérapie c'est tout un ensemble depuis l'étude des cibles, aux capacités de production appropriées pour cette technologie, tout cela pour une application clinique dans un contexte réglementaire assez compliqué.

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

CAR therapy: assembling the parts

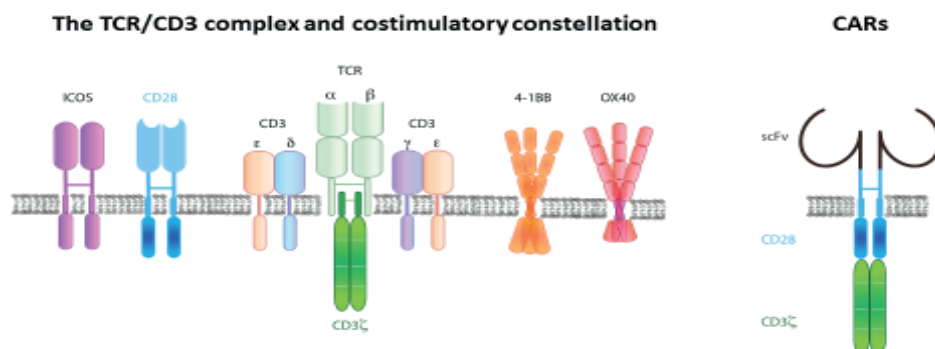


La structure du TCR/CD3, le récepteur par lequel les lymphocytes T reconnaissent l'antigène se compose de deux chaînes qui reconnaissent le complexe HLA peptide mais ne sont pas capables d'initier l'activité des lymphocytes T.

Ce complexe TCR/CD3 est le gardien des réponses immunitaires. Quand le TCR est engagé sur un complexe, la réponse immunitaire peut débuter, mais elle ne sera pas suffisante. Il faut l'intervention d'un certain nombre d'autres molécules co-stimulatrices. Elles appartiennent à deux familles fondamentales : les immunoglobulines (prototype CD2) et les récepteurs du TNF.

Plusieurs de ces molécules sont déjà des cibles dans l'immunothérapie actuelle avec des anti-corps, mais, pour organiser une réponse immunitaire effective, il faut engager à la fois plusieurs de ces composants. C'est ce qui nous a poussés ainsi que d'autres groupes, il y a 15-20 ans, à créer des récepteurs artificiels.

Physiological and synthetic receptors for T cell engineering



Sadelain, Riviere & Brentjens, *Nat Rev Cancer*, 2003
Sadelain, *AACR Education Program*, 2014

Un « CAR » de deuxième génération, tel que représenté a trois composants canoniques :

- Une portion d'immunoglobuline scFv, capable de reconnaître toute structure sur la surface des cellules tumorales. Cela n'a rien à voir avec la reconnaissance du complexe HLA.
- Il y a une portion CD3 Zêta. Elle permet l'activation des lymphocytes.
- Cela ne suffit pas, il faut un troisième composant critique qui est un co-stimulateur.

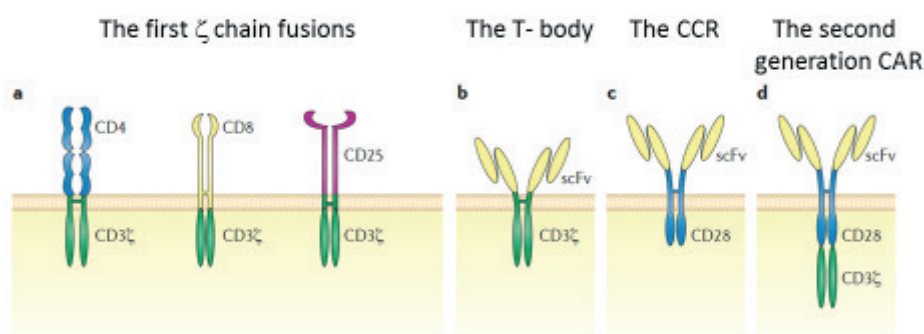
Voici le bref historique du cheminement qui nous a conduit à ce CAR

La chaîne CD3 Zêta a été clonée en 1991 par trois groupes, ils n'étaient pas sûrs d'avoir un cDNA complet, car ils n'avaient qu'un domaine transmembranaire. Ils ont créé des fusions avec CD4, CD8, CD25 et ils les ont introduites dans des lymphocytes T leucémiques. Ils ont utilisé des anticorps pour lier ces fusions et en faisant cela, ils ont découvert que la chaîne Zêta était suffisante pour activer les lymphocytes T.

Par ailleurs, en Israël un chercheur, Zelig ESHHAR, a introduit le scFv qui peut se lier à n'importe quel antigène. C'est ce qu'il a appelé un « *T-body* » et que j'ai appelé plus tard la première génération d'un « Chimeric Antigen Receptor. » Au MIT, nous avons découvert comment introduire les gènes dans les lymphocytes primaires, c'est-à-dire de vrais lymphocytes T et non des cellules leucémiques. Nous avons rapidement réalisé que ces récepteurs n'étaient pas suffisants pour permettre une réponse immunitaire. Pour cela, il faut que le lymphocyte T puisse être en contact avec l'antigène plusieurs fois pour continuer à se multiplier et garder tous ses attributs fonctionnels.

Dans les années 90, nous avons créé des récepteurs de co-stimulateurs. Dans le cas du CD28, ils reconnaissent un antigène tumoral. Nous avons fusionné les deux pour créer la deuxième génération de CAR.

CAR Evolution: The first chapters



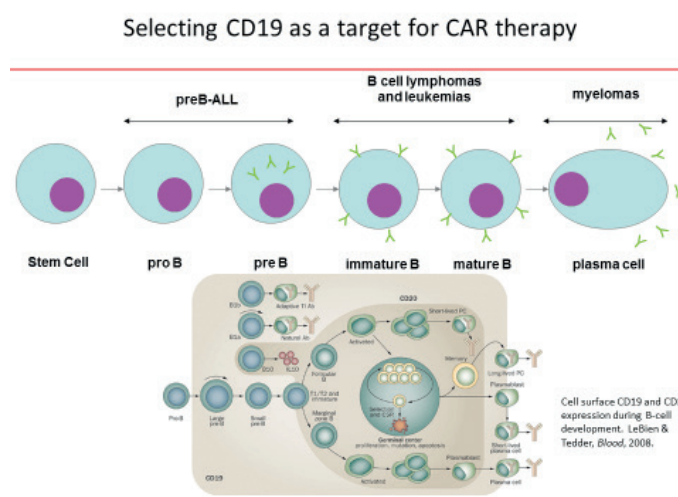
Stegen, Nat Rev Drug Dev, 2015

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

Une fois que ces molécules sont conceptualisées, nous pouvons créer un cDNA recombinant, l'introduire dans un vecteur rétroviral et l'utiliser pour placer ce cDNA sur un chromosome d'un lymphocyte T. Celui-ci va exprimer le CAR et acquérir la capacité de reconnaître l'antigène sur les cellules tumorales.

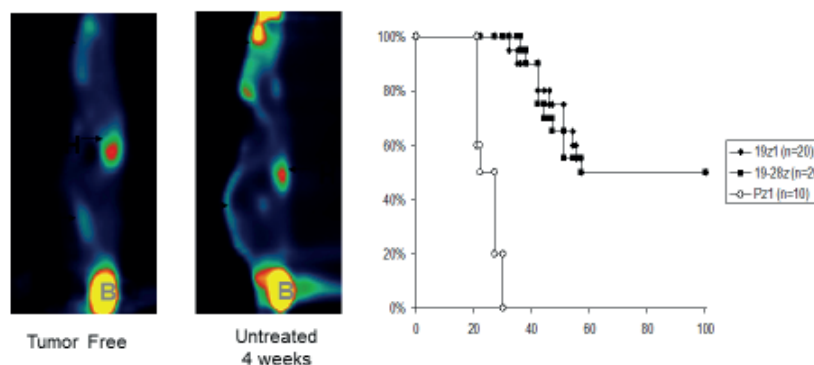
L'antigène que nous avons choisi est la molécule CD19. Elle est à la surface des lymphocytes B. CD 19 est présente dans presque toutes les leucémies et lymphomes qui dérivent de ce lymphocyte B. CD19 n'est exprimée dans aucune autre cellule hématopoïétique ou autre.

Le CAR T-Cell, reconnaissant C19, induirait forcément un effet secondaire qui serait la destruction des lymphocytes B normaux. Toutefois cela serait cliniquement tolérable car on peut vivre au moins quelques mois sans lymphocytes B.



Cela fait plus de 10 ans que nous avons réalisé la première démonstration. Dans des lymphocytes T humains de donneurs sains ou de patients leucémiques, nous avons introduit un CAR spécifique pour CD19. Dans le modèle souris, la lignée de cellule hématopoïétique, RajiB exprime la molécule CD19.

CD19 CAR T cells eradicate systemic Raji in mice



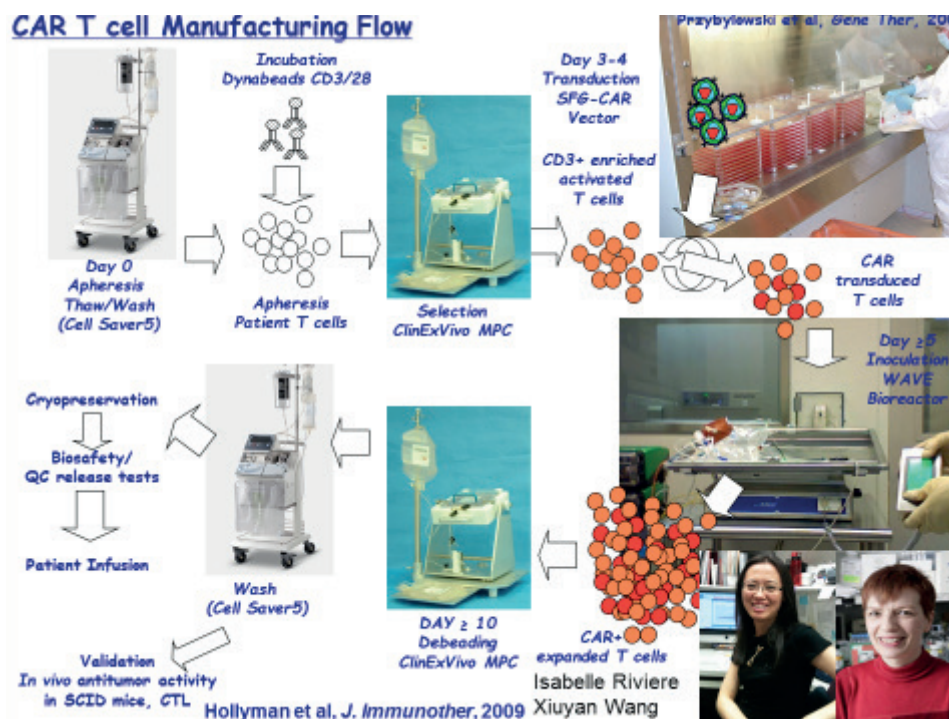
Brentjens et al, *Nat Med*, 2003

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

Dans ce PET Scan, nous observons la distribution de cette tumeur dans les zones hématopoïétiques. Une seule infusion de ces lymphocytes T peut guérir un certain nombre de ces animaux. C'est l'objectif du traitement : Si les lymphocytes T sont efficaces, il suffira de les donner une seule fois.

Pour traduire cela en termes cliniques, il fallait établir les modalités pour manipuler les lymphocytes T des patients. C'est une collègue française qui travaille au Sloan Kettering depuis longtemps qui les a mises au point avec une équipe de 30 personnes. Les lymphocytes T sont collectés à partir du sang périphérique du donneur par aphérèse. Pour les purifier et les activer on utilise des billes en fer couplées avec des anticorps anti-CD3 et CD28. A ce stade, l'activation des lymphocytes est utile pour atteindre la dose prescrite par le protocole et pour faciliter l'efficacité du transfert des gènes.

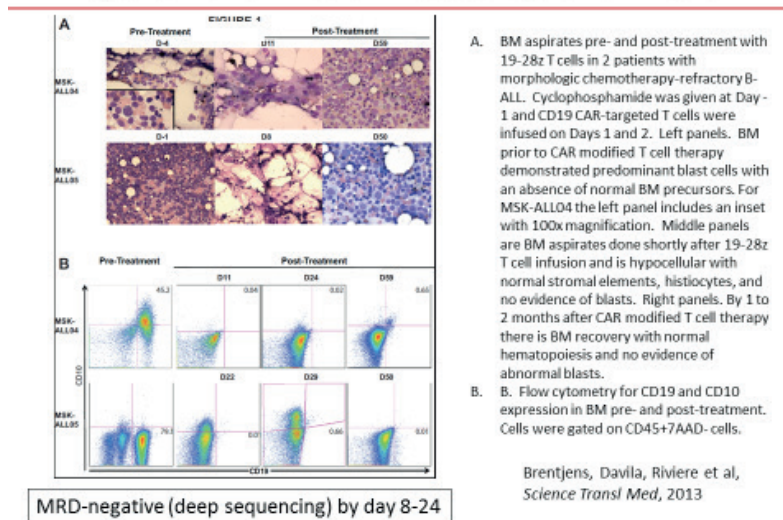
Pour ce dernier nous utilisons des vecteurs rétroviraux. Nous pouvons les fabriquer à Sloan Kettering. Les lymphocytes sont cultivés dans des petits sacs d'un litre. La culture dure 9 à 10 jours. À la fin de ces 9-10 jours, il faut retirer les petites billes métalliques et nous pouvons utiliser immédiatement les cellules ou les congeler pour une utilisation ultérieure.



Je vais mentionner un essai thérapeutique de phase 1, publié en 2013, que nous avons effectué sur la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). Les patients sont des adultes développant une maladie réfractaire aux chimiothérapies avec parfois une rechute après une transplantation de moelle. Pour deux sujets, 4 et 5, les hématologistes ont remarqué qu'il y avait beaucoup de blastes positifs pour CD19 dans la moelle de ces patients

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

Rapid tumor elimination mediated by 19-28z T cells



Pour le sujet n°4, à J 11, J 24, J 59, nous avons remarqué l'absence totale de toute cellule exprimant CD19. Cela veut dire que les blastes et les quelques lymphocytes B qui étaient encore là ont tous disparu.

Notez qu'à J 59, la moelle a un aspect normal. Les neutrophiles et les plaquettes reviennent à la normale chez ces patients. Evidemment, il n'y a pas de lymphocytes B. C'est l'aspect ciblé de cette thérapeutique.

Ce sont des réponses complètes mais c'est plus que cela. Si nous faisons un séquençage à haut débit de l'ADN génomique extrait de la moelle de ces patients, sur le sujet 4, à J 4, pour une dose fixée d'ADN, il y a 2 millions de transcrits correspondant à la leucémie de ce sujet. Au onzième jour, il y en a 1 000, au jour 24 seulement 637 et entre J 24 et J 59, la tumeur devient indétectable.

Le sujet n°5 est encore plus remarquable : il y avait 3 millions de transcrits détectables à J-1 dans la moelle et ils sont déjà indétectables à J 8 et J 29.

Ce sont des réponses complètes au niveau moléculaire.

Nous étions très heureux cette année-là quand en décembre « *Science* » a proclamé que « *cancer immunotherapy was breakthrough of the Year* ». Ils ont avant tout salué l'avancée des « *checkpoints blockade* ». C'est un peu le grand frère de l'immunothérapie. Mais ils ont aussi inclus la technologie des « *CARs therapies* » en couverture.



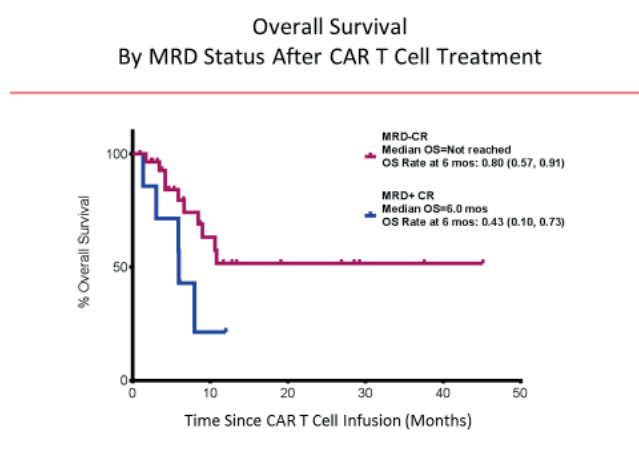
L'année dernière à l'ASCO, nous avons présenté d'autres résultats. Nous en sommes aujourd'hui à 55 patients traités à Sloan Kettering, toujours des adultes réfractaires à toute chimiothérapie. Le taux de rémission complète est de 82 % chez ces sujets. L'induction de cette réponse MRD négative est indétectable par PCR ou par séquençage dans 83 % de ces 82 %, soit pour 60 % des sujets.

Cette rémission complète nécessite 3 semaines en moyenne. Parfois, elle peut être atteinte en 8 jours comme prendre 4 à 5 semaines. Il est important que le lymphocyte T que l'on infuse au patient soit fonctionnel pour au moins 3 à 4 semaines.

Les courbes de survie montrent l'importance de ce résultat. Nous atteignons 5 ans avec nos premiers patients. 80 à 85 % vont en rémission moléculaire. La moitié d'entre eux vont survivre. Nous ne les avons pas encore proclamés guéris.

En revanche, ceux pour lesquels nous détectons une tumeur après infusion vont progresser et mourir de cette maladie.

Des patients répondent mieux que d'autres.



Sur les 55 patients de l'étude, ceux qui ont une maladie de nature morphologique avec plus 5 % de blastes dans la moelle ou ceux qui ont une maladie réfractaire vont décéder de leur maladie entre 2 et 4 mois.

Cette méthode est efficace quel que soit le statut des patients :

S'ils ont une maladie de type moléculaire, il n'y a pas de différence dans le taux d'induction des rémissions complètes.

Pour les patients en rechute après une transplantation de moelle, le taux est le même. Il n'y a pas de différence quel que soit le nombre de chimiothérapies reçues auparavant.

Le statut génétique de ces tumeurs n'a pas d'impact. S'il y a des mutations de P53, facteur connu de mauvais pronostic dans la LAL, il n'y a pas de différence. Si nous prenons l'âge en considération, les jeunes adultes ou les moins jeunes ont la même probabilité d'être en rémission complète.

Grâce à ce prélèvement de lymphocytes T, des patients qu'ils aient 60 ans, ou qu'ils aient subi 3, 4 chimiothérapies ont une bonne chance d'avoir une rémission complète.

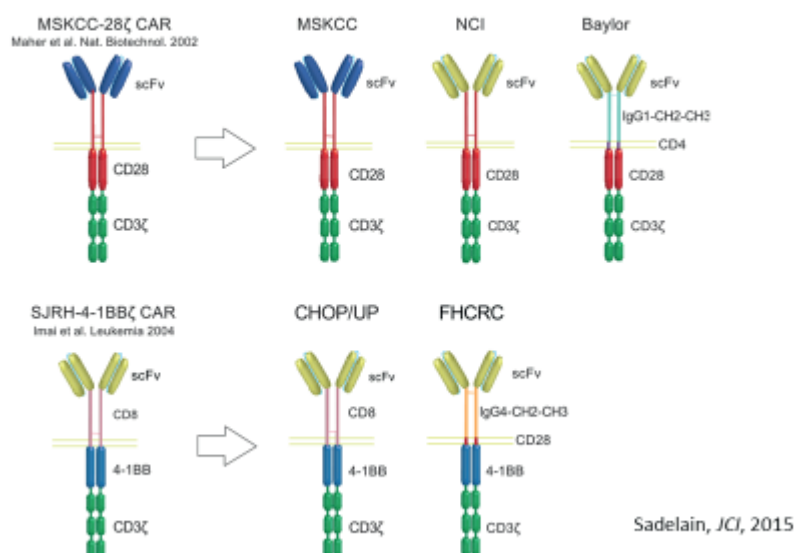
COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

Après la publication de notre article ; le temps de construire un laboratoire GMP pour faire l'essai thérapeutique, d'autres équipes comme celles de Carl JUNE à l'université de Pennsylvanie et Steven ROSENBERG au NCI ont voulu tester cette technologie.

ROSENBERG m'avait demandé la molécule, je lui ai donné la séquence en lui disant qu'il pouvait utiliser un scFv qui était dans le domaine public. Tous les autres groupes l'ont utilisé.

Le domaine co-stimulateur n'est pas limité à CD28. Un grand nombre sont étudiés aujourd'hui. L'autre, aussi très célèbre, est dérivé de 4-1BB.

CD19 CARs: original CARs and variants in clinical trials



Le premier à être publié venait de Carl JUNE. Il a été remis au groupe de Pennsylvanie. C'est la molécule qui a été utilisée à Philadelphie. Un groupe au Texas a fait le variant ci-dessus.

Quand tous ces groupes ont effectué des essais sur la LAL chez les enfants ou chez les adultes, ils ont publié des résultats très comparables, autour de 90 % de rémission complète et cela a contribué à la crédibilité rapide de cette technologie.

Avant de vous parler des directions futures, **j'aimerais formuler deux remarques générales.**

Premièrement, le transfert des lymphocytes T n'a pas démarré avec les CARs, mais il y a plus de 60 ans, un peu par accident dans le cadre des transplantations de moelle. A cette époque on ne savait pas encore qu'il y avait des lymphocytes T dans les moelles allogéniques.

Cela a donné lieu dans les années 80-90 à plusieurs formes de thérapies cellulaires T : LAK (*lymphokine activated killer cells*), TILs (*tumor infiltrating lymphocytes*), DLI (*donor lymphocyte infusion*) et VST (*virus specific T-cells*).

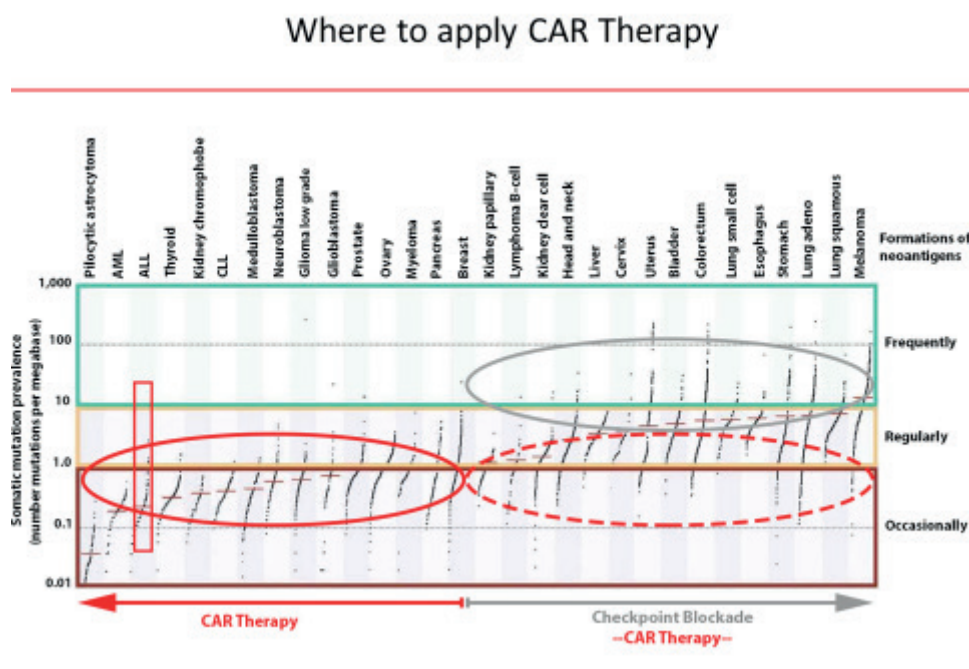
Toutes ces thérapies sont basées sur la possibilité d'identifier et de faire pousser en culture des lymphocytes T naturels que l'on trouve, soit chez le patient, soit chez le donneur compatible pour une transplantation.

Ce que je vous expose aujourd'hui, la CAR CD19 thérapie, est très différente. Elle est basée sur un transfert de gènes, sur le « *gene editing* » et sur l'utilisation de récepteurs synthétiques.

La grande différence est que, plutôt que d'aller chercher des lymphocytes T naturels chez les donneurs ou les patients qui ont la chance d'avoir de bons lymphocytes, nous fabriquons des lymphocytes avec le design et pour l'antigène de notre choix.

Dans quel cas peut-on appliquer cette technologie ?

Cela fait plusieurs fois que vous voyez ce graphique aujourd'hui. C'est dans le cercle gris que l'on voit les meilleures réponses aux anticorps « *checkpoints blockade* ». Selon la théorie actuelle, les chances de succès sont proportionnelles au nombre de mutations, à la probabilité d'avoir une tumeur immunogénique.



Cela ne veut pas dire que les anticorps ne vont pas marcher pour les autres cancers avec une plus basse fréquence de mutation, mais, jusque-là, il faut reconnaître que les résultats n'ont pas été très impressionnants.

Aussi, nous pensons que dans un premier temps il est logique de concentrer la « *CAR therapy* » sur les cancers ayant un taux de mutation plus faible.

Nous ne nous limitons pas à cette catégorie car dans celle des cancers avec habituellement un fort taux de mutation, certains patients en présentent exceptionnellement un nombre limité.

J'aimerais aborder les deux futures approches des CARs

Premièrement, comment améliorer la « *potency* » de ces lymphocytes T car tels qu'ils sont aujourd'hui, nous pensons qu'ils ne seront pas assez efficaces pour s'attaquer aux tumeurs solides.

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

Pour cela, on pourrait faire des combinaisons :

Combiner les caractères CAR T-cells avec des molécules qui affectent le microenvironnement de la tumeur avec les anticorps ou la radiothérapie.

Je ne vais pas discuter de toutes ces combinaisons. Elles méritent d'être évaluées en clinique.

Je vais me restreindre à l'objectif **de concevoir un meilleur CAR**.

Je ne sais pas à quoi ressemblera le CAR du futur ; je vais seulement vous décrire, par exemple, comment nous avons fait un meilleur CAR qui sera testé en clinique au mois d'avril.

Auparavant quelques rappels concernant les événements à la surface des lymphocytes T quand ils reconnaissent un antigène.

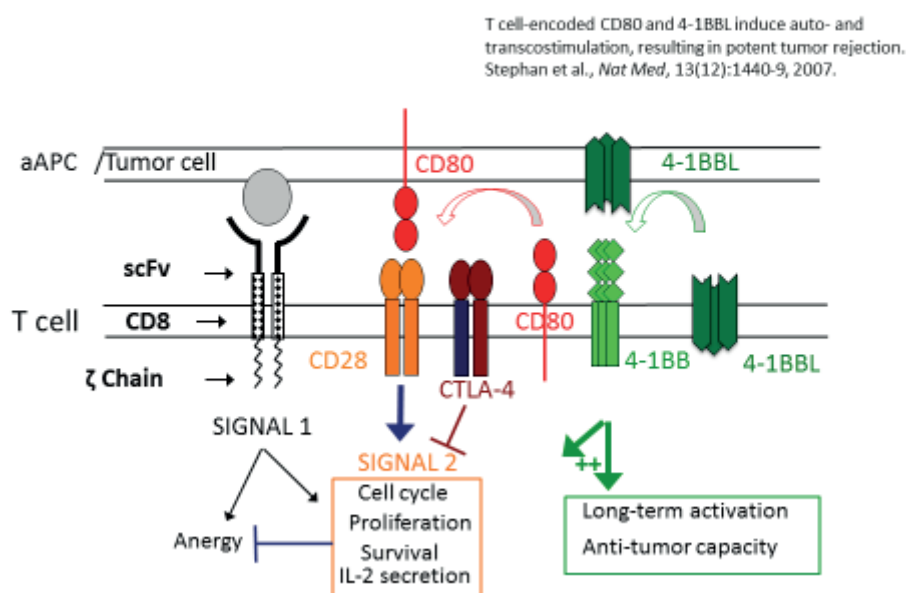
Le CAR de première génération, c'est un Lymphocyte T avec un complexe CD3 et le signal Zeta d'activation des lymphocytes T.

La plupart des lymphocytes expriment de façon consécutive le récepteur CD28. Quand celui-ci trouve un ligand sur la cellule présentatrice de l'antigène, soit CD80 soit CD86, un deuxième signal est délivré au lymphocyte T.

À ce moment, beaucoup de choses changent. CTLA-4 vient à la surface des cellules et inhibe le circuit CD28. Les éléments de la famille TNF, Cytokines, sont induits à la surface des lymphocytes T. Un meilleur signal co-stimulateur est donc délivré à ce lymphocyte T.

La plupart des tumeurs pour s'échapper n'ont pas de ligand CD80 ou 4-1BBL sur leur surface. Il y a quelques années, nous avons étudié une approche basée sur l'expression de ces ligands du mauvais côté de cette synapse entre la cellule cancéreuse et le lymphocyte c'est à dire dans le lymphocyte T lui-même. De cette façon, où qu'aille ce lymphocyte T, les ligands seront présents puisque le lymphocyte T lui-même exprime ces ligands.

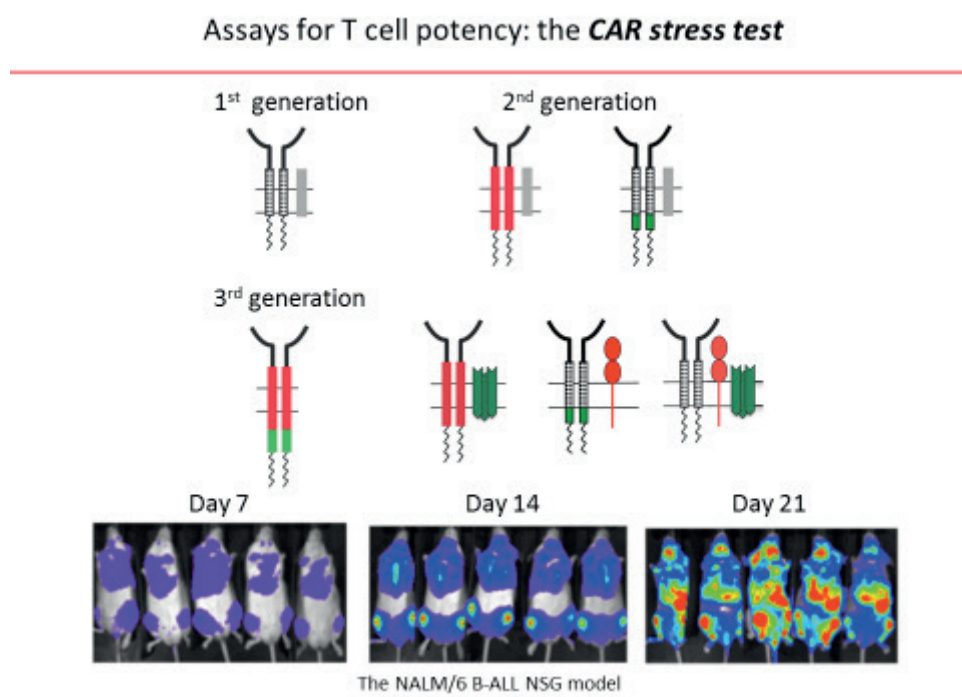
Augmenting CD19 CAR T cell potency through T cell engineering



Pour la deuxième génération dont je vous ai parlé tout à l'heure, deux sont en clinique, l'un avec CD28 et l'autre avec 4-1BB.

Maintenant, la question est celle-ci : pouvons-nous recruter les 3 circuits dans ces lymphocytes T, l'activation, CD28 et 4-1BB ?

Un CAR de troisième génération a été créé où ses parties signalisatrices sont dans la partie cytoplasmique, c'est le CAR de première génération additionné des deux ligands co-exprimés pour CD28 et 4-1BB.



Un essai de « *potency* » a été effectué *in vivo*. Nous appelons cela un CAR stress test.

Dans un modèle de leucémie aigüe, NALM-6, qui tue les souris en 26 jours, nous avons introduit ces lymphocytes T en diminuant la dose jusqu'au point où ils ne sont plus efficaces.

La première génération est inefficace.

A un million de lymphocytes T par souris et plus. Les deux lymphocytes de deuxième génération vont guérir les souris.

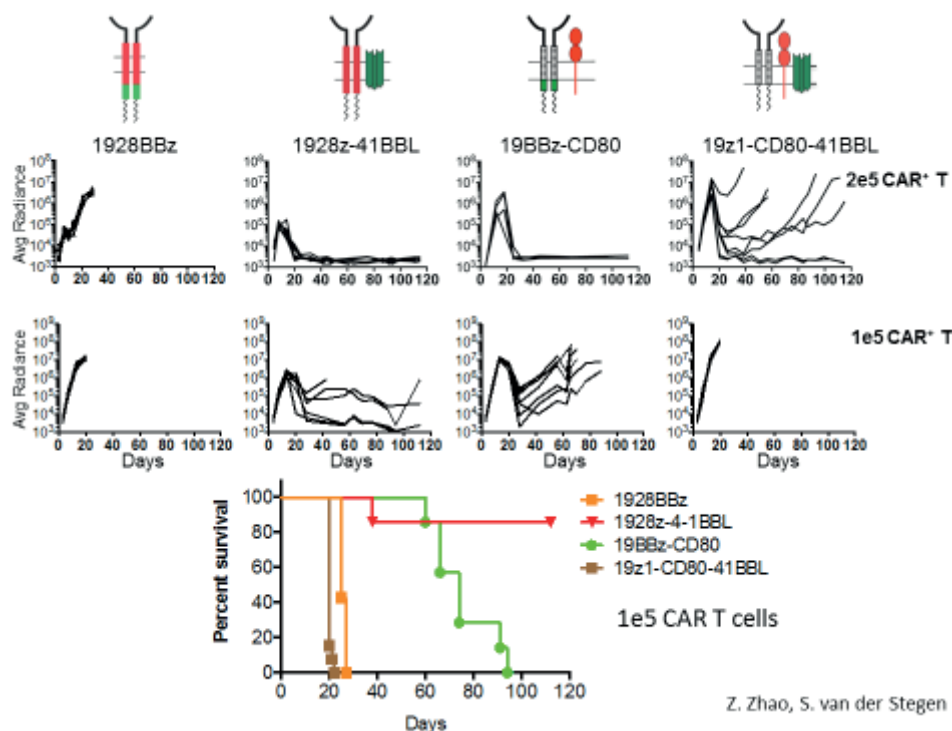
À 400 000 lymphocytes T par souris, cela ne marche plus très bien. Celui avec le récepteur CD28 arrive à avoir quelques rémissions durables. Quand on diminue la dose de ces lymphocytes T, ils ne marchent plus.

Parmi les quatre formules expérimentées, la triple signalisation est très décevante bien qu'elle fonctionnait *in vitro*. Je ne vais pas l'expliquer, bien que ce soit passionnant. Il y a un nombre incroyable de lymphocytes T humains dans ces souris immuno déficientes. Le problème est qu'ils ne sont pas très fonctionnels.

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

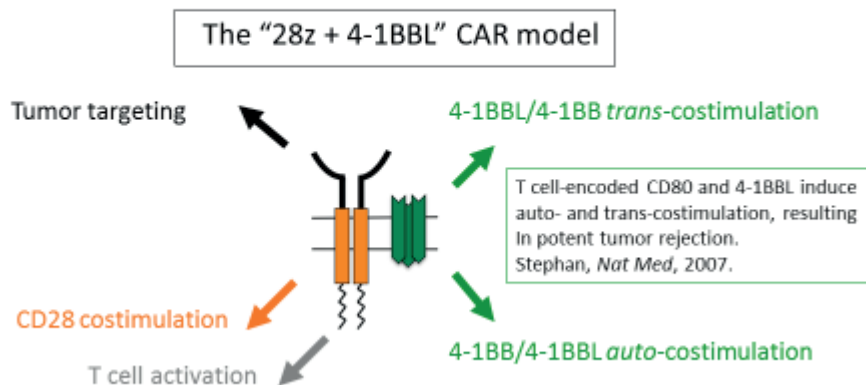
La formule gagnante est 1928z- 4-1BBL. Il y a une progression tumorale avant régression. Il ne faut pas introduire beaucoup de lymphocytes T. Ils doivent d'abord infiltrer la moelle, augmenter en nombre, maintenir leur capacité fonctionnelle pour éliminer la tumeur.

Si on diminue à 100 000 lymphocytes T par souris, cette formule 1928z avec le ligand 4-1BB est toujours la plus efficace. C'est donc celle que nous allons introduire en clinique très bientôt. Nous avons eu l'approbation de la FDA en décembre et j'espère que le premier patient sera infusé en avril.



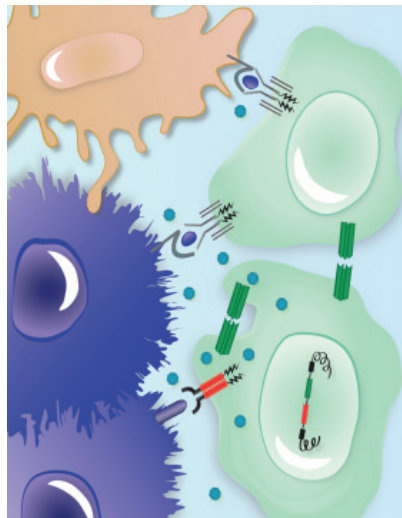
Nous introduisons deux gènes dans le lymphocyte T, le CAR pour cibler le CD19 et l'activation. Le ligand produit une auto-costimulation et une trans-costimulation que je vais vous montrer.

Altering the tumor microenvironment by *trans*-costimulation



Cette image représente un lymphocyte T dans la tumeur. Le vecteur code pour un CAR qui se trouve à la surface du lymphocyte T. Il reconnaît un antigène de surface sur cette tumeur. Cela pourrait être CD19. Le ligand est aussi exprimé de façon constitutive et est capable d'auto-costimulation et de trans-costimulation.

Ce ligand peut agir sur les autres lymphocytes T qui sont dans le microenvironnement des tumeurs. Si ces lymphocytes T sont là, s'ils ont reconnu localement un antigène tumoral, ils vont induire l'expression de 4-1BB et ces cellules CAR T-cells présentent en permanence le ligand pour 4-1BB.



Nous avons montré que ces lymphocytes T expriment l'Interféron-bêta, ce qui n'était pas connu dans les lymphocytes humains. Nous l'étudions en ce moment. Son effet serait bénéfique car cet Interféron-bêta peut ré-induire l'expression du HLA là où il a parfois été diminué et peut aussi avoir des effets positifs sur les cellules dendritiques présentant un antigène dans le milieu tumoral.

C'est la façon dont nous espérons que les CARs fonctionneront. Le CAR n'améliore pas seulement la «potency» des lymphocytes, il devient un régulateur et un modificateur de l'environnement tumoral.

Encore quelques mots concernant **le transfert de gènes dans les lymphocytes**.

Cela fait longtemps que nous avons montré que l'on pouvait introduire des gènes dans les lymphocytes T avec des vecteurs rétroviraux lentiviraux ou des transposons.

Le point commun de tous ces systèmes est une intégration du gène aléatoire. Dans les années récentes, de nouveaux outils sont apparus, ce sont les nucléases ciblées les TALENs et CRISPR-cas9.

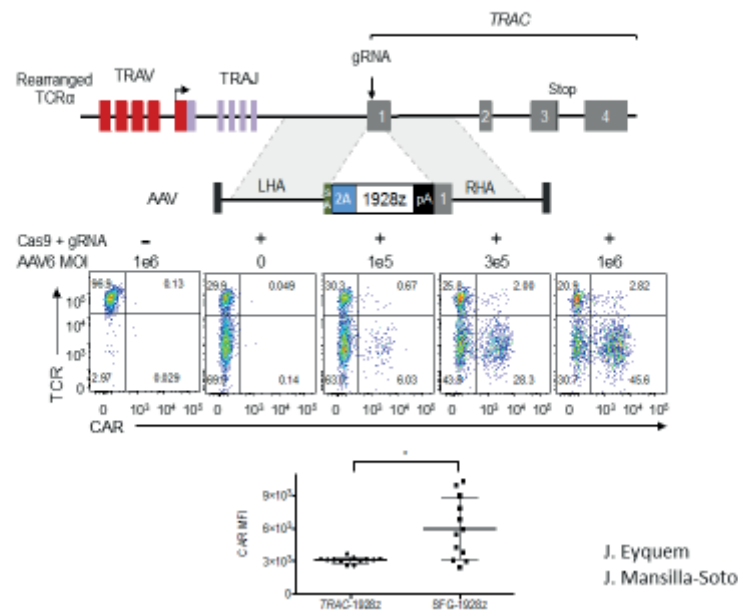
Je vais vous montrer comment nous avons utilisé le système CRISPR-Cas9 pour cibler l'introduction.

Cette nucléase CRISPR peut être utilisée pour éliminer un gène dont on ne veut pas voir l'expression. En combinaison avec l'enzyme Cas9 et un RNA guide (gRNA) le système permet d'introduire un gène à un endroit bien précis. Avec cette technique le CAR a été positionné dans le *locus de la chaîne Alpha constant* du lymphocyte (TRAC). L'ADN

COMBINER LES THÉRAPIES CELLULAIRE ET GÉNIQUE

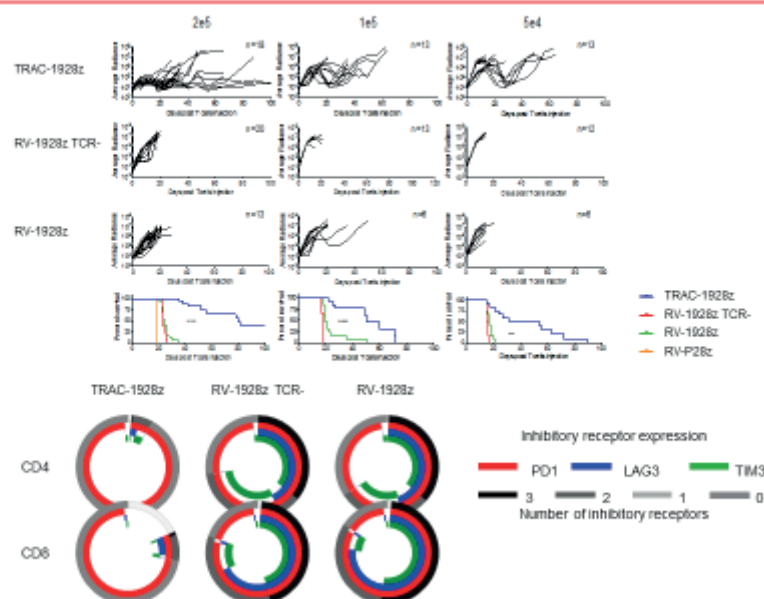
donneur pour la recombinaison homologue qui prend place dans ces lymphocytes T humains est le CAR 1928z. Il faut noter qu'il n'y a pas de promoteurs dans cette construction car nous voulons que le CAR soit exprimé sous le contrôle du promoteur de l'activateur du *TRAC*

CRISPR/Cas9-targeted integration into the *TRAC* locus



Si on pratique une intégration aléatoire des transgènes dans les cellules, il en résulte une expression variable. Par exemple, en clinique chez 8 donneurs, après avoir introduit le CAR avec le vecteur rétroviral, à la surface des lymphocytes T la quantité du CAR était très variable.

TRAC-CAR T cells vastly outperform conventional CAR T cells *in vivo*



Quand il a été introduit dans les *T-cell locus*, dans chaque cas, l'expression du CAR a été identique.

Quatre jours après l'électroporation de la nucléase CRISP, il y a l'expression du CD3 endogène. On a ajouté l'ADN qui code pour le CAR mais il ne se passe rien. Il est incapable de s'intégrer dans le lymphocyte T. Si on ajoute le Cas9 et le gRNA, ces cellules deviennent CD3 négatives ou TCR négatives. Cela veut dire que nous sommes arrivés à détruire le gène endogène du TCR Alpha. À ce stade, en commençant à rajouter l'ADN donneur on constate que dans ces lymphocytes T qui n'ont plus le récepteur endogène, apparaît le CAR. Cela permet une expression régulée. Cela fait un meilleur produit cellulaire.

On a comparé sur des souris les deux introductions des CAR de deuxième génération, celle avec les 55 patients en clinique où le CAR est exprimé dans le TRAC locus et celle du CAR stress test avec les souris où le vecteur rétroviral a été utilisé. Ceci dans le même modèle de leucémie à partir du même donneur des lymphocytes T. Les cellules sont électroporées dans tous les cas.

Avec 200 000 cellules, seuls les TRAC CAR T-cells marchent encore.

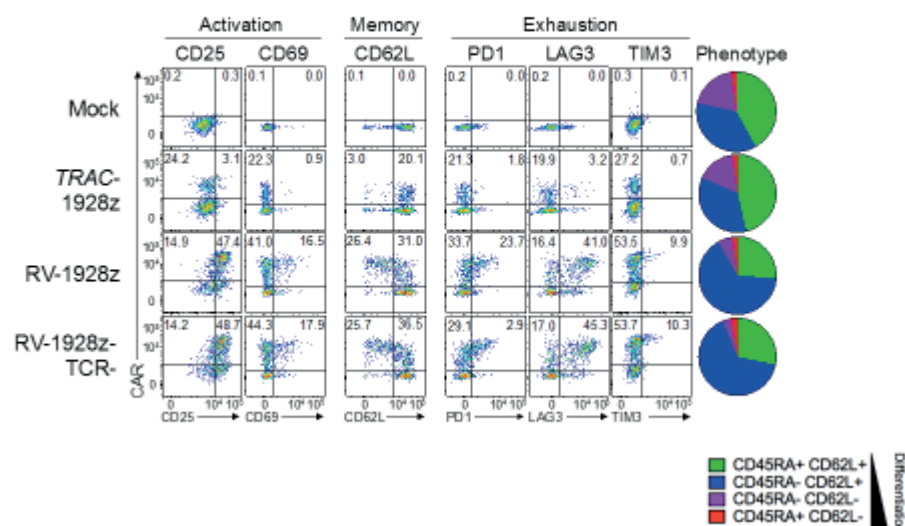
Pourquoi est-ce le cas ?

Nous avons retiré les lymphocytes T de ces souris au 17^{ème} jour et nous avons analysé plusieurs aspects de leurs fonctions, y compris l'épuisement, l'expression des molécules PD-1, LAG3, TIM3 que vous avez déjà vues ce matin.

Dans le cas du lymphocyte T modifié avec un vecteur rétroviral, la fraction de tous les lymphocytes T humains que l'on retire de la moelle de ces animaux expriment les trois marqueurs d'épuisement. Il n'y a presque pas de CARs dans les CD4 et CD8.

À l'inverse le TRAC locus permet d'avoir des lymphocytes T plus efficaces avec une diminution de l'épuisement des lymphocytes.

Tonic signaling is reduced in TRAC-CAR T cells



Quelle en est la raison ?

Dans les lymphocytes T exprimant des CARs, il se produit un phénomène dit de « *tonic signaling* ». C'est la signalisation constitutive en l'absence de l'antigène du CAR. Il y a un peu de signal. Les lymphocytes qui ont le vecteur rétroviral, en culture, expriment CD25, CD69. Ce sont des vecteurs avec des marqueurs d'activation. Elles perdent le CD 62 ligand, elles induisent PD-1, plus de LAG3.

Quand le CAR est sous le contrôle du promoteur TRAC, il n'y a pas de CD25, ni de CD69. Le CD62 ligand n'est pas perdu. Il y a donc un effet bénéfique sur le « *tonic signaling* ».

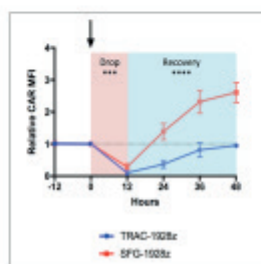
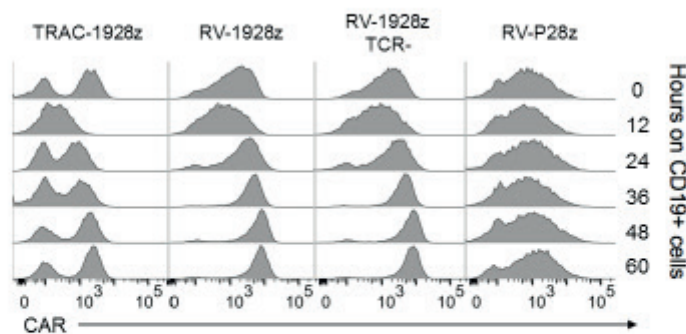
Nous avons également découvert que ces CARs ont une réaction très particulière quand ils voient l'antigène. En opérant in vitro, des lymphocytes T humains ont été électroporés et mis en présence de cellules présentatrices de l'antigène qui ont CD19. Nous avons mesuré l'expression du CAR à la surface de ces lymphocytes T toutes les 12 heures jusqu'à 60 heures.

Dans un contrôle sans CD19, le niveau d'expression du CAR ne bouge pas.

Dans le TRAC locus, nous observons la chose suivante :

- ♦ Un niveau basal au temps 0 ;
- ♦ À 12 Heures, l'expression est très réduite ;
- ♦ À 24 heures, elle n'est pas revenue à la normale ;
- ♦ Il faut 48 heures pour revenir à la normale.

CAR expression is down-regulated upon exposure to antigen



Avec le vecteur rétroviral, il y a cette expression en moyenne plus élevée, une diminution mais incomplète, puis un rebondissement très rapide de l'expression du CAR. Sur une moyenne de 9 expériences, le TRAC CAR diminue et revient lentement à la normale, alors que le CAR rétroviral diminue moins et rebondit trop vite ; ce qui est un attribut du LTR de l'activateur.

Il est à noter qu'il apparaît de nombreuses différences quand on exprime le CAR à partir d'un gène choisi, ce qui n'est pas faisable avec les transferts aléatoires.

En conclusion, dans le champ de l'ingénierie des lymphocytes T :

Nous ne pouvons pas à ce jour guérir des tumeurs solides. Il faut améliorer la fonction de ces lymphocytes et trouver les cibles appropriées. On peut augmenter la « *potency* » de ces cellules. Je vous ai parlé des CAR de deuxième génération et je vous ai montré l'importance d'introduire le CAR dans le locus TRAC.

L'applicabilité de ces techniques n'est pas liée à la HLA. C'est un facteur positif car on n'a pas besoin de connaître la HLA du patient pour y introduire le CAR.

J'ai fait référence à la possibilité d'utiliser des lymphocytes allogéniques. Il y a surtout un énorme besoin pour développer des nouvelles technologies pour faire des lymphocytes T *in vitro*. Aux États-Unis on cherche toutes sortes de nouvelles technologies pour purifier et améliorer la culture de ces cellules.

Augmenter la potentialité extrinsèque de ces lymphocytes T est fondamental J'ai montré l'exemple de trans-costimulation.

La sélectivité est aussi un point important. Ces thérapies s'accompagnent d'effets secondaires que nous devons apprendre à maîtriser.

Pour conclure, les CARs de deuxième génération peuvent augmenter la capacité fonctionnelle des lymphocytes T et les diriger vers des antigènes de notre choix. Dans la LAL et certains lymphomes, la thérapie cellulaire est efficace là où les chimiothérapies classiques ont échoué. Les CAR T-cells peuvent être modifiés avec des niveaux différents de potentialités. Leur persistance peut être modulée.

Les modèles xénogéniques sont imparfaits mais utiles pour comparer au moins la pharmacocinétique de ces lymphocytes T *in vivo*. Les CAR T-cells ne sont pas juste des tueurs de tumeurs mais des outils pour modifier leur microenvironnement.

J'ai beaucoup de gens à remercier : mon laboratoire bien sûr, tous les gens qui sont impliqués dans les essais thérapeutiques. J'aimerais mentionner deux personnes qui travaillent avec moi depuis longtemps, Renier BRENTJENS, chef du service de thérapie cellulaire que nous avons créé et Isabelle RIVIÈRE, chef de notre unité de production de cellules.

Je vous remercie.

(Applaudissements).

► **Sébastien CANDEL.**- Nous allons prendre quelques minutes pour les questions.

► **Jean-François BACH.**- Comment se déroule l'opération dans le temps ? Avez-vous un effet durable ? Faut-il répéter les traitements ? Comment cela se présente en pratique ?

► **Michel SADELAIN.**- La préparation des lymphocytes prend 9 à 10 jours. Le traitement se fait en une fois. Tous les résultats que je vous ai montrés sont issus d'une seule infusion. Les rémissions complètes sont obtenues pour 80 à 90 % de ces patients.

Mais rémission complète ne veut pas dire guérison. Près de la moitié de ces malades vont récidiver. Ceux qui avaient au bout de 4 à 5 semaines une tumeur détectable, vont récidiver et le plus souvent mourir de cette maladie.

Il existe deux types de rechute : celles qui sont positives au CD19 et celles qui sont négatives au CD19. Quand le résultat est positif, nous pouvons donner une deuxième infusion de lymphocyte T. La deuxième infusion fonctionne moins souvent. Le taux de rémission complète sur une deuxième infusion est plus faible, de l'ordre de 40 %, soit la moitié de la première fois.

Nous cherchons à savoir pourquoi la deuxième fois, l'efficacité est réduite. Une des raisons démontrée par Stan REDEL est que des patients présentent une réponse immunitaire contre le CAR causée par les scFv d'origine murine. Tous les nouveaux CARs pour les essais thérapeutiques ont des scFv d'origine humaine.

Une deuxième infusion peut être aussi inefficace parce que les lymphocytes T sont rapidement rejetés. Mais ce n'est pas la seule explication.

On s'intéresse beaucoup au niveau d'expression de CD19, à sa régulation à l'effet de PD-1.

Si la rechute est CD19 négative, il faut envisager autre chose. Un des CARs qu'un groupe a essayé de développer est spécifique pour CD22. Dans ces rechutes qui sont CD19 négatives, on peut donner un CAR CD22. Les essais sont en cours.

► **Marc BONNEVILLE.**- Par rapport à l'antigène CD19 et des stratégies de ciblage dans le cas des tumeurs solides, les antigènes devraient être plutôt du stroma que de la tumeur elle-même. Il semble difficile de trouver des cibles antigénomiques.

► **Michel SADELAIN.**- La technologie est assez efficace dans certaines leucémies aiguës, dans le lymphome et même dans la leucémie B chronique. Les résultats sont assez bons. La question est de savoir si cela va marcher pour d'autres cancers.

Les études préliminaires en cours dans le myélome sont encourageantes. La cible est une molécule qui s'appelle BCMA. Plusieurs autres cibles seront en clinique dans le myélome d'ici à un an.

Pour la leucémie myéloïde aigüe, c'est plus difficile. Nous y travaillons, là les cibles sont moins évidentes.

Le problème pour les tumeurs solides est que les cibles potentielles que nous connaissons aujourd'hui sont aussi exprimées sur des cellules normales. Nous provoquons une aplasie B qui peut être acceptable. Mais si vous attaquez une molécule qui est exprimée dans le rein ou le foie, c'est inacceptable. Le design du CAR devient plus subtil. Il y a des corécepteurs qui augmentent l'affinité des récepteurs inhibiteurs pour protéger les cellules normales. Dans la littérature, 8 ou 9 articles ont des approches intéressantes pour protéger les cellules normales. Le meilleur serait de trouver des cibles spécifiques des tumeurs. Malheureusement, la plupart des néo-antigènes que nos collègues découvrent sont presque toujours des molécules intracellulaires.

Pour l'instant, il n'y a pratiquement pas de néo antigènes connus à la surface des tumeurs.

Le plus paradoxal est qu'il n'y a pas tellement d'information sur la surface des tumeurs. Il y a beaucoup de publications, mais la description complète de la surface des cellules tumorales est encore incomplète. Nous pouvons donc espérer qu'il y aura des cibles, mais c'est un travail de fond difficile. En ce moment nous faisons beaucoup de protéomique sur les banques pour chercher des cibles.

► **Jean-Baptiste LATOUCHE.**- Les CARs délivrés par un système CRISPR-Cas 9 ont une expression bien plus homogène, mais aussi dans une fourchette basse d'expression si l'on compare aux CARs délivrés par des systèmes viraux, même 9 fois plus faible que dans certains cas avec les vecteurs viraux.

Y a-t-il un lien entre cette expression faible et le moindre épuisement ?

► **Michel SADELAIN.**- Je ne suis pas entré dans les détails. L'expression du CAR était effectivement plus faible d'un facteur 2 dans le TRAC que la moyenne de ce que l'on obtient avec des vecteurs lentiviraux ou rétroviraux.

Mais le niveau d'expression de base est très critique. Nous avons mis le CAR dans 9 sites différents. Certains sont un peu plus bas, d'autres plus hauts, d'autres induisent trop vite ou trop lentement. L'histoire est plus complète que ce que j'ai montré là.

Le CAR du *T-cell receptor* naturel, donne un niveau d'expression de base et une régulation d'expression jusque-là inégalée.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

Jérôme GALON

Université Paris-Descartes, Inserm, Université Pierre et Marie CURIE

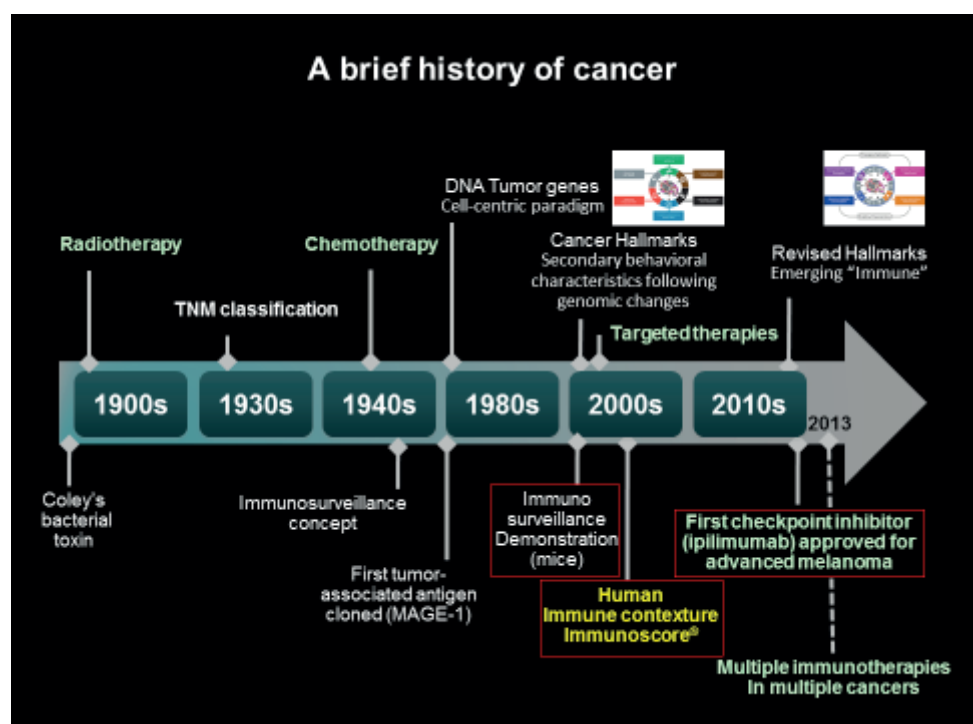
► **Jean-François BACH.**- Nous avons vu ce matin que l'immunothérapie n'était pas aussi efficace sur chaque malade. Il y a de nombreux cas d'inefficacité. Nous avons pu voir à quel point il était important de pouvoir identifier des possibles répondeurs.

Jérôme GALON est directeur de recherche à l'Inserm. Il travaille à quelques centaines de mètres de l'Institut de France, au Centre des Cordeliers, Boulevard Saint-Germain. Au cours de sa brillante carrière de scientifique, il a créé l'Immunoscore qui permet de différencier en catégorie les patients atteints de cancer colorectal. C'est une étape extrêmement importante pour la sélection des malades pour les futurs essais d'immunothérapie.



► **Jérôme GALON.**- Merci beaucoup Monsieur le Secrétaire Perpétuel. C'est un plaisir, un honneur d'être ici. Merci aux Fondations Mérieux et Bullukian de m'avoir invité.

Je vais tout d'abord commencer par un bref historique avec quelques points utiles pour la suite de la discussion.



CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

Dans la partie supérieure du schéma précédent, figure ce qui concerne la tumeur avec, en vert, les thérapies associées : radiothérapie, chimiothérapie et les thérapies ciblées. Je n'ai pas indiqué la chirurgie qui est bien sûr essentielle. Sont également représentés des éléments importants reliés à la tumeur, la classification des cancers avec leurs caractéristiques « *Hallmarks* » proposés par Douglas HANAHAN et Robert WEINBERG dans les années 2000.

Sur le bas, figurent des éléments relatifs au système immunitaire : le concept d'immunosurveillance proposé par Frank MACFARLANE BURNETT dans les années 1950. En fait il a fallu 50 ans de controverses avant d'arriver à sa démonstration chez la souris. Ce résultat a pu être acquis grâce aux souris déficientes pour certains éléments du système immunitaire selon les travaux de Mark SMITH et Bob SCHREIBER.

Lors de mon propos, je vais définir la contexture immunitaire d'une tumeur c'est-à-dire expliciter la relation entre le système immunitaire et les éléments liés à la tumeur.

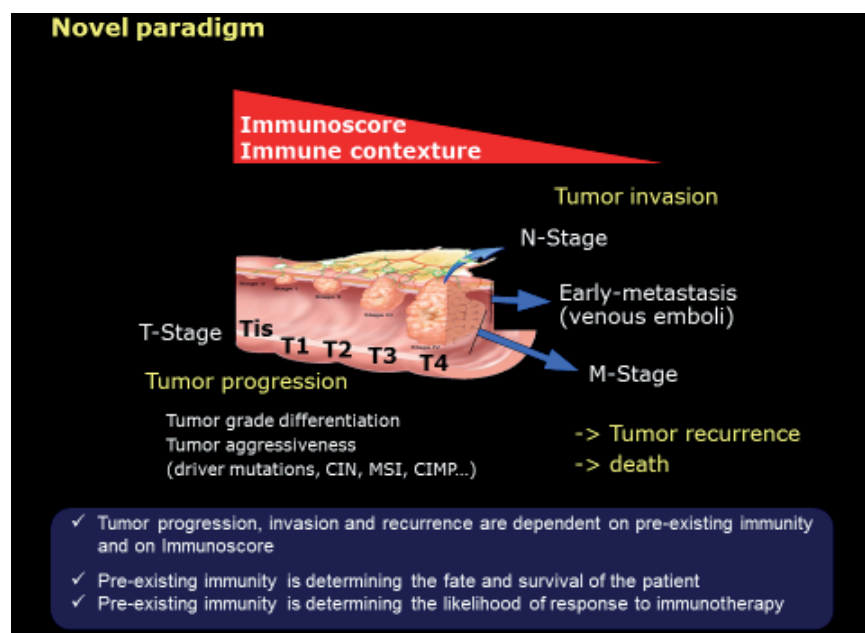
Ce concept d'immunosurveillance, l'importance de la contexture immunitaire et des lymphocytes T ont fait que, depuis très récemment, les « *checkpoints* » et toutes les immunothérapies associées à la modulation de la réponse immunitaire ont pris un essor considérable.

Le cancer, par définition, est une maladie génétique causée par des mutations. Les changements de caractéristiques phénotypiques associés à ces changements mutationnels et à ces altérations génétiques ; ce sont les *Hallmarks* du cancer.

Les éléments essentiels d'un cancer sont la progression de la tumeur définie par le stade T dans l'organe primaire, l'invasion caractérisée par les métastases ganglionnaires ou d'autres et des critères d'agressivité tumorale, de mutation, d'instabilité des chromosomes et des microsatellites.

Ces caractéristiques intrinsèques de la tumeur définissent la gravité du cancer. On a coutume de considérer qu'une petite tumeur à un stade précoce est moins sévère qu'une tumeur plus avancée métastatique.

Je voudrais changer ce paradigme et en proposer un différent qui prend en compte la relation entre le système immunitaire et les caractéristiques de la tumeur.



CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

En fait, tous ces paramètres : progression d'une tumeur primaire, invasion, métastases, la probabilité de récurrence, dépendent de l'immunité préexistante du patient que nous pouvons maintenant moduler avec des immunothérapies.

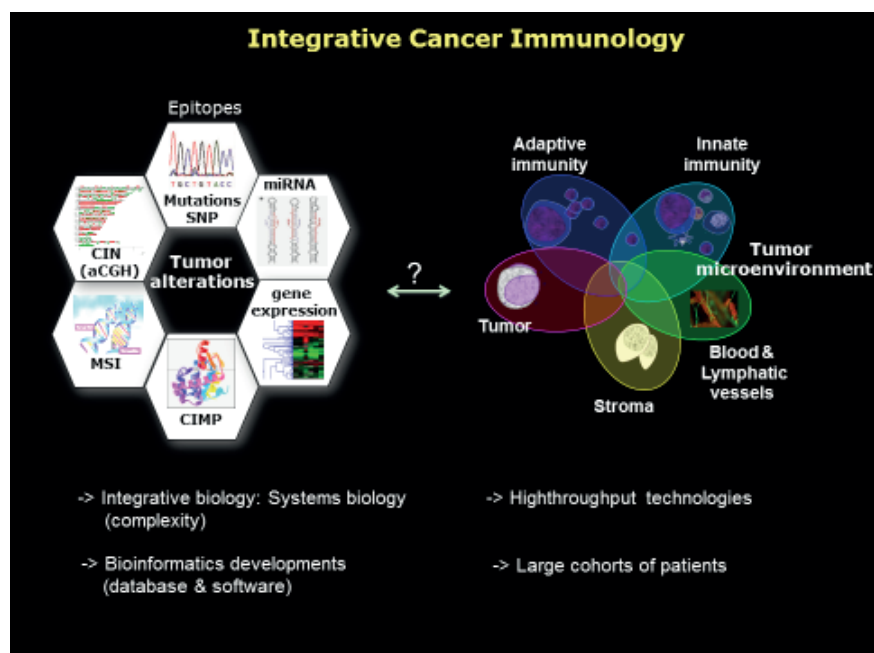
Le devenir d'une cellule tumorale dépend de son interaction avec le système immunitaire et détermine aussi la survie du patient. L'immunité préexistante détermine la capacité d'un patient à répondre ou pas à une immunothérapie. Cela constitue un changement considérable.

A l'origine de nos travaux, l'objectif était d'essayer sur des tumeurs humaines, d'avoir une cartographie la plus fine et la plus détaillée possible, non seulement des caractéristiques intrinsèques de la tumeur mais aussi du microenvironnement tumoral.

Cela sans se concentrer sur une molécule particulière, mais d'essayer, grâce à la bio-informatique, d'avoir une approche de biologie systémique pour comprendre ce qu'est une tumeur.

Au début des années 2000, grâce aux technologies à haut débit, à la biologie des systèmes, à la bio-informatique, des expériences ont pu être réalisées pour caractériser ces tumeurs humaines, leur environnement ainsi que la réponse immunitaire des patients. Il s'agit en fait de caractériser un organe dans toute sa complexité.

Nous sommes sur un tissu réellement très complexe au sein duquel toutes les cellules de l'immunité sont présentes à des degrés divers, avec des densités différentes selon les patients et les tumeurs, avec des niveaux différents d'activation et de différenciation. Toutes les cellules de l'immunité adaptative : lymphocytes CD4/CD8, sous-populations des lymphocytes T mémoire, et les molécules et les cellules de l'immunité innée sont présentes au sein du cancer.



La première question à se poser concerne l'importance à accorder à tous ces infiltrats immunitaires.

Comme cela a été indiqué dans la première conférence, la revue des « *Hallmarks* » du cancer ne parlait absolument pas de la réponse immunitaire.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

Cette réponse immunitaire naturelle observée chez les patients a-t-elle un impact sur la progression d'une tumeur, sur la récurrence et sur leur survie ?

Après avoir analysé un grand nombre de sous-populations de cellules immunitaires, nous nous sommes concentrés depuis plus de dix ans sur l'immunité adaptative. Nous avons démontré et publié que ces cellules étaient essentielles à une survie très prolongée.

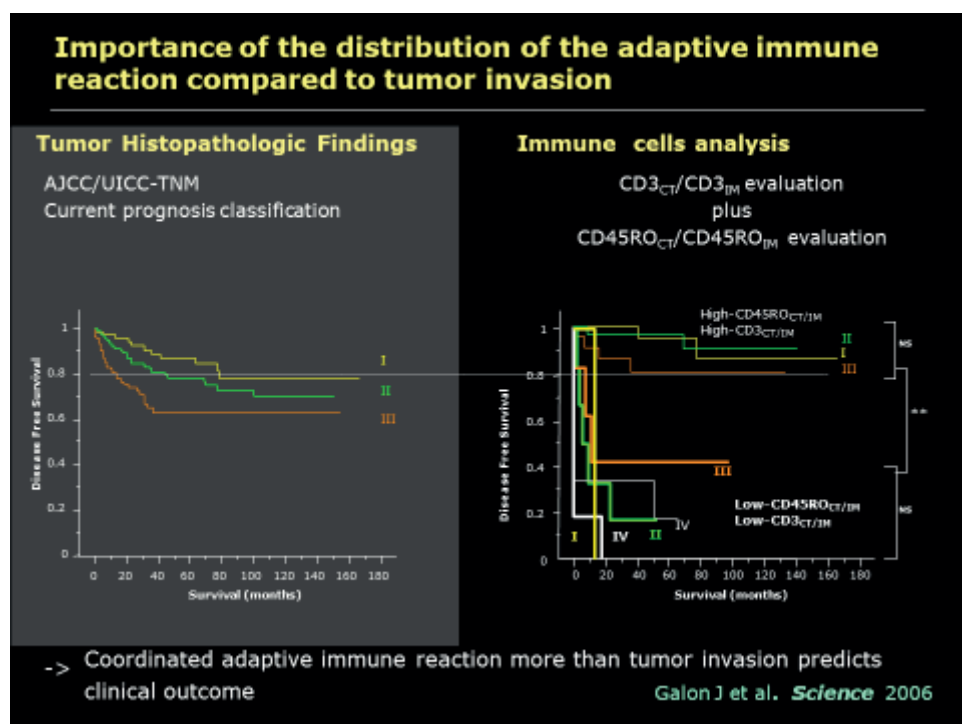
Quelle était donc le fondement de ce concept de texture immunitaire et de ce test Immunoscore ?

Il résulte de la quantification de plus de 6 000 immunohistochimies avec de la pathologie digitale par comptage automatisé de l'ensemble de ces lymphocytes T dans une tumeur.

Un autre point essentiel est que nous nous sommes rapidement rendu compte qu'il y avait des endroits très différents et des réponses immunitaires aussi très différentes selon les régions de la tumeur.

À distance de la tumeur, on peut trouver des structures lymphoïdes tertiaires avec des lymphocytes T et B en grand nombre. Au niveau de la marge d'invasion, là où la tumeur est allée le plus profondément dans le tissu normal, il y a une zone de conflit avec le système immunitaire ; des cellules immunitaires font face à la tumeur. Au centre de la tumeur, on observe un stroma rempli de toutes les cellules immunitaires.

Ces tumeurs ont été analysées sur de très grandes cohortes de patients. Ils ont été suivis pendant 15 ans. Pour ces cancers colorectaux, une comparaison de la survie des patients selon la classification actuelle AJCC/UICC-TNM : en petite tumeur peu avancée, tumeur plus avancée, métastases et la classification par l'analyse des lymphocytes est présentée sur le tableau ci-dessous.



CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

Nous avons réalisé avec de la pathologie digitale la numération et la densité d'infiltrats lymphocytes T mémoire dans deux régions de la tumeur, le centre et la marge d'invasion. Nous avons pu observer de façon frappante que les patients avec de fortes densités de lymphocytes T mémoire dans leur tumeur sont protégés pendant 15 ans. Ainsi plus de 80 % de ces patients n'ont pas récidivé.

Autre point important : ce résultat est valable quel que soit le degré d'avancement de la tumeur. Avec une tumeur au stade 3, le patient est protégé s'il a pu générer cette forte densité de lymphocytes T mémoire dans les deux régions de la tumeur. À l'inverse, les patients qui ont des faibles densités de lymphocytes T mémoire dans ces deux régions vont récidiver extrêmement rapidement quel que soit leur stade tumoral.

Une petite tumeur peu infiltrée par les lymphocytes T cytotoxiques et mémoire, va très rapidement récidiver et le patient va décéder de son cancer.

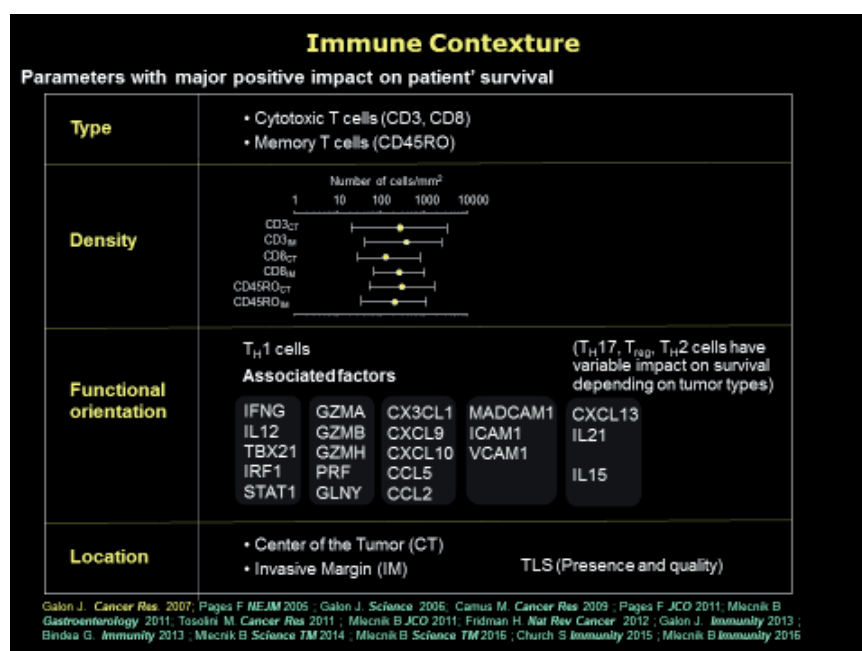
Une immunité adaptative coordonnée, prédit plus la survie du patient et son devenir que les critères d'invasion et de progression tumorale classique,

Le paradigme à ce moment-là était : pour la première fois, une analyse multivariée, qui teste la force des paramètres et leur dépendance, montre que ce test Immunoscore basé sur la densité d'infiltrats des lymphocytes T mémoire dans ces lésions tumorales est significatif.

Au-delà de ce résultat, les critères classiques de progression tumorale, stade T, l'invasion de la tumeur, stade N et le grade de différenciation de la tumeur, deviennent non significatifs dans cette analyse multivariée et sont statistiquement dépendants de l'Immunoscore du patient.

Autrement dit, la réponse immunitaire prédit bien mieux que tous les critères actuels la classification des patients et leur devenir.

Nous avons proposé ce terme de texture immunitaire qui résume l'ensemble de ces critères immunitaires, qui sont associés à la survie d'un patient, en quatre paramètres : la nature (le type d'infiltrats immunitaires), l'orientation fonctionnelle immunitaire de la réponse (en particulier pour les lymphocytes T CD4, une réponse de type TH1), la densité des cellules immunitaires et leur localisation à différents endroits.



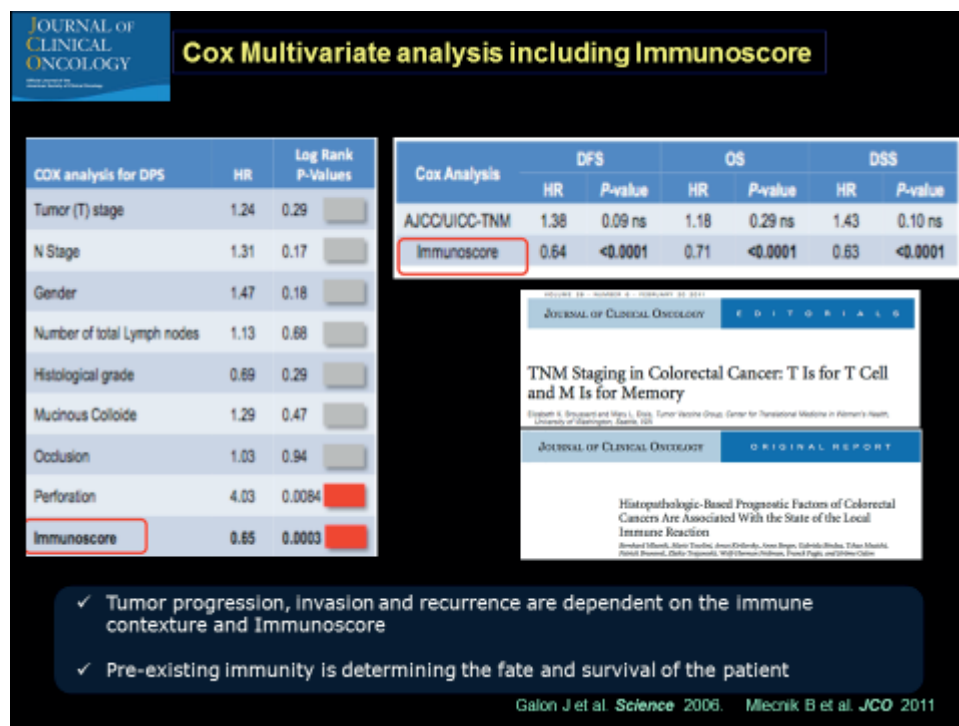
Lorsqu'un marqueur est significatif dans une analyse uni-variée, en général, il ne passe pas la barre de l'analyse multivariée. Nous ne le considérons comme bon marqueur que lorsqu'il est significatif dans une analyse multivariée. Il donne une meilleure prédiction sur le devenir.

Ainsi l'évaluation de la contexture immunitaire avec ce test Immunoscore montre que la progression de la tumeur, l'invasion métastatique sont dépendantes de cette réponse immunitaire. Ce nouveau concept de prédiction supplante le *goal* standard de la classification.

Nous essayons de raffiner cette contexture immunitaire dans ces quatre paramètres : le type d'infiltrat immunitaire, leur densité, l'orientation fonctionnelle de la réponse et leur localisation.

Nous pouvons, avec ce test, classifier des patients en groupe. Dans l'Immunoscore noté 4, il y a une forte densité de lymphocytes T CD8 cytotoxiques et mémoire dans les deux régions de la tumeur et la meilleure survie. Il y a une très bonne relation directe entre l'Immunoscore et la survie, indépendamment du stade (I à III ; I à IV) des cancers.

Dans une étude suivante, nous nous sommes posé la question : pourquoi, dans une analyse multivariée où tous les critères usuellement très significatifs, en introduisant l'Immunoscore dans cette analyse multivariée, deviennent non significatifs ? Seule la perforation pour ces cancers colorectaux reste significativement très péjorative. Le stade T est non pertinent. Le stade N devient aussi dépendant de l'Immunoscore d'un patient.



La comparaison directe entre les classifications TNM standard et celle par Immunoscore montre la performance de cette dernière. La classification, la progression et l'invasion d'un cancer dépendent de cette réponse immunitaire.

Nous avons eu cet éditorial associé à notre publication « T is for T Cell and M is for Memory ». C'était un peu provocateur pour les pathologistes, mais c'était la réalité de notre article. Nous

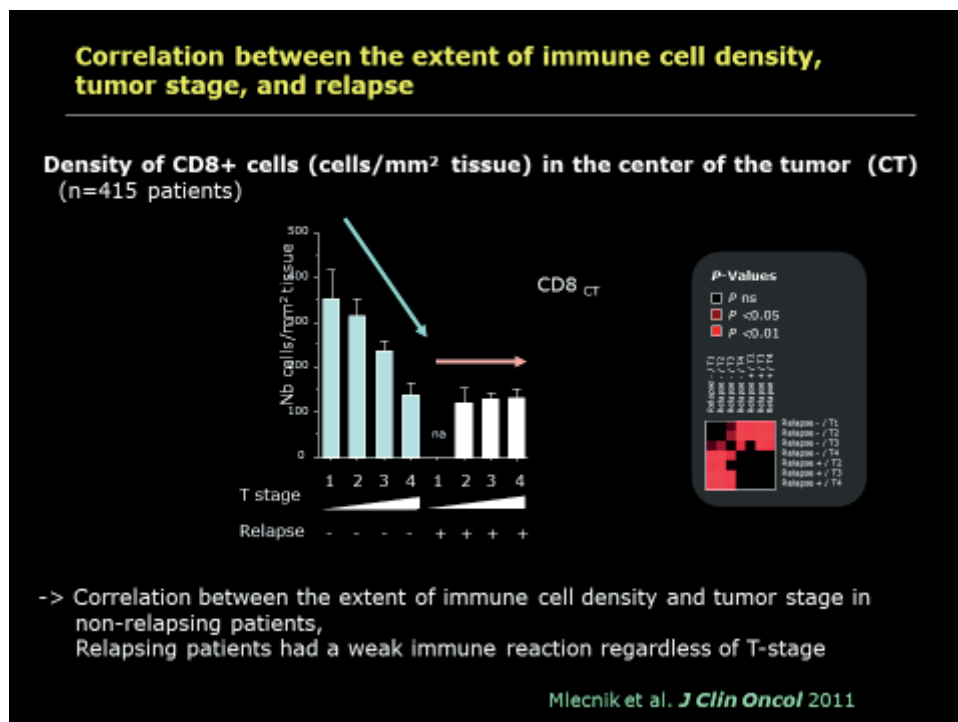
CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

avons voulu analyser les raisons de cette dépendance et de la performance de l'évaluation immunitaire.

Nous avons stratifié les patients pour voir quels étaient les niveaux de densités d'infiltrats cytotoxiques dans le centre de la tumeur pour plus de 400. Sur le diagramme suivant, nous observons qu'avec la décroissance de la densité d'infiltrats immunitaires CD8, le stade de progression augmente. Cela démontre la dépendance entre ces deux paramètres.

Si nous sous-stratifions la probabilité de récurrence, les patients qui ont récidivé avaient des densités d'infiltrats CD8 cytotoxiques beaucoup plus faibles dès le départ. Cela montre à nouveau la dépendance et la supériorité de l'immunoscore dans la prédiction du devenir du patient. Nous arrivons au même résultat si nous considérons le décès du patient au lieu de la récurrence.

Le lymphocyte T se situe dans une position clé par rapport au développement d'une tumeur. D'où les thérapies qui visent à réactiver les lymphocytes T préexistants des tumeurs, plutôt que d'essayer de détruire directement les cellules tumorales. Il faut toutefois arriver à les réactiver suffisamment pour obtenir l'effet de protection sur la progression de la tumeur ou sur la récurrence du patient.



Sur les courbes de survie de toutes les thérapies existantes, que ce soit chimiothérapie ou thérapie ciblée, la différence porte plus sur le delta à la médiane. Les thérapies ciblées sont extrêmement efficaces en peu de temps, mais avec des variantes d'échappement conduisant à une récurrence rapide incontrôlable.

Ce qui a été le grand succès des courbes de l'immunothérapie, ce n'est pas un différentiel au départ sur les courbes, mais la proportion de patients qui répondent à très long terme avec plus de dix ans de recul.

Certains patients semblent être guéris de leur cancer grâce aux immunothérapies, même si

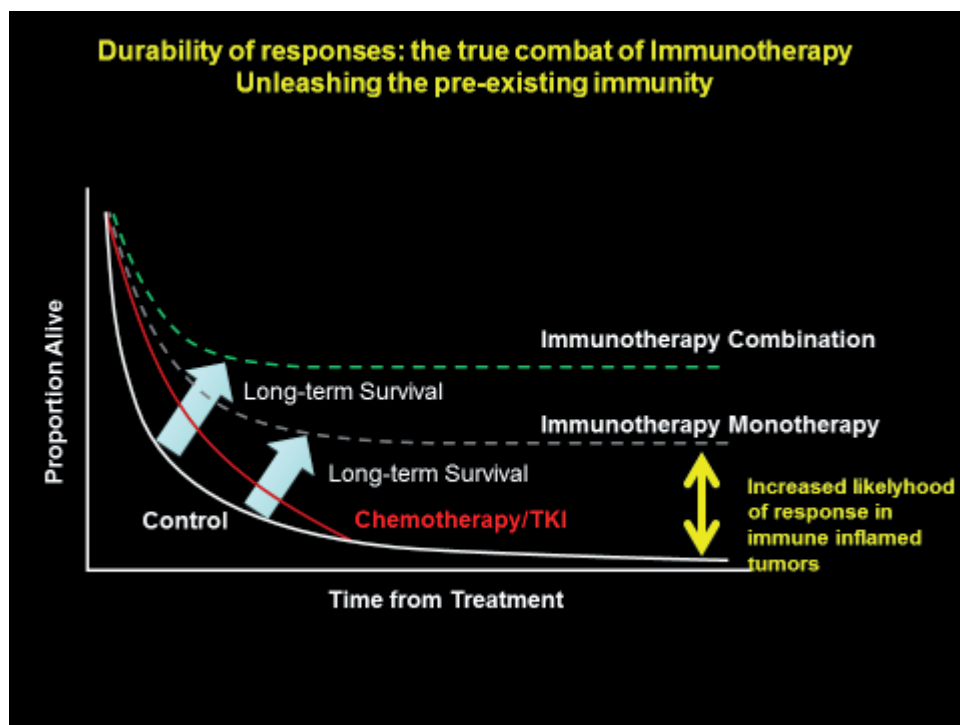
CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

nous commençons à voir des récides associées.

Des estimations de gain de vie ont été faites avec les anti PD-1/PD-L1 sur différents types de cancer. Nous pourrions gagner plus de 118 000 années de survie sur l'ensemble des patients grâce à ces thérapies ; beaucoup plus que cela ne peut l'être avec les thérapies ciblées.

D'où cet engouement pour les immunothérapies, depuis la première approbation de l'IPILIMUMAB qui vise à cibler un lymphocyte T avec un anti CTLA-4. Il y a eu une accélération considérable des immunothérapies «*checkpoints*» sur un très grand nombre de tumeurs.

La liste des cancers susceptibles de répondre à l'immunothérapie anti PD-1/ PD L-1 s'allonge tous les jours. Plus de 700 essais cliniques sont en cours que ce soit en phase I, II ou III, avec des molécules déjà sur le marché.



Nous avons essayé d'analyser plus finement dans le temps, l'évolution à la fois de la réponse immunitaire et de la progression de la tumeur. Nous sommes sur deux phénomènes complètement dynamiques dans un microenvironnement tout à fait mouvant. Les cellules tumorales changent constamment : à chaque prolifération, à chaque division, de nouvelles mutations s'accumulent. Face à cela, la réponse immunitaire s'adapte pour répondre à tous ces changements.

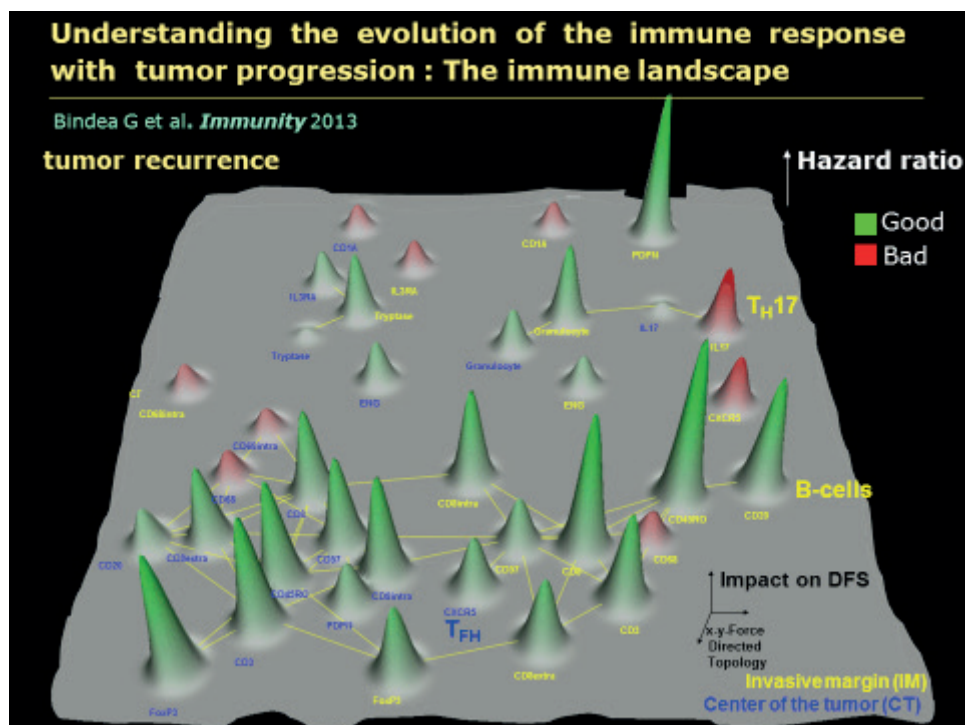
Pour cela nous nous sommes intéressés aux infiltrats immunitaires sur de grandes cohortes de patients aux stades T4/T3/T2/T1, sachant qu'il y a une cinétique de progression qui va de T1 à T4, sans connaître le temps entre ces progressions.

Nous avons analysé l'Immunome des tumeurs, à partir de sous-populations de cellules purifiées de l'immunité. Les gènes spécifiques pour cette sous-population de cellules immunitaires ont été sélectionnés (par exemple, ceux spécifiques aux neutrophiles très fortement surexprimés et absents dans les autres cellules), et ainsi de suite pour toutes les sous-populations immunitaires.

En appliquant cet Immunome aux tumeurs humaines, nous nous sommes aperçus qu'il y avait des relations très différentes entre les lymphocytes, les sous-populations de cellules et la progression de la tumeur.

Évidemment, ceci a été fait avec la déconvolution d'expressions complexes de gènes. Nous avons voulu valider cela avec une quantification réelle en densité, c'est-à-dire en nombre de cellules en triple fluorescence pour tous les lymphocytes et l'ensemble des sous-populations immunitaires.

Chaque pic représente une densité d'infiltrats dans une tumeur, dans une grande cohorte de patients à tous les stades. Nous avons fait cela pour chaque stade séparément.



Ces pics (moyenne sur l'ensemble des patients à tous les stades) varient beaucoup entre une petite tumeur T1 et une T4. En T1, il y a énormément de neutrophiles uniquement accumulés à la marge d'invasion de la tumeur. En T2, les neutrophiles rentrent dans la tumeur et leur densité augmente à l'intérieur. À l'inverse, les densités d'infiltrats de l'immunité adaptative diminuent, ce qui fait progresser la tumeur vers les stades T3 et T4.

Les densités sont très différentes selon les sous-types de cellules immunitaires. Un réseau d'interaction symbolise la proximité de comportement entre ces cellules avec deux sous-réseaux : l'un à la marge d'invasion et l'autre au centre de la tumeur, avec toutes ces cellules de l'immunité, y compris l'immunité adaptative.

Certaines cellules sont complètement exclues, comme les neutrophiles où les cellules produisant de l'IL17.

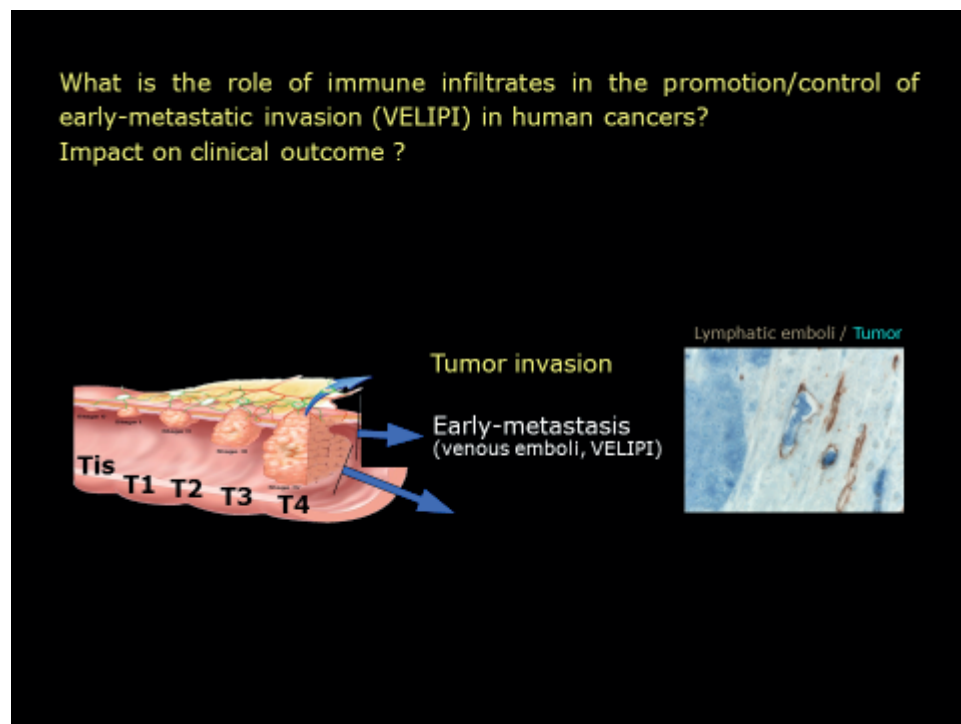
Ensuite, nous avons examiné l'impact de chacune de ces sous-populations de cellules sur le devenir des patients : survivent-ils plus ou moins longtemps ? En vert, vous avez les « bonnes »

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

cellules : forte densité, bonne survie. En rouge, vous avez les « mauvaises » cellules : forte densité avec survie raccourcie.

L'ensemble des pics verts correspond aux cellules de l'immunité adaptative, à l'exception des deux pics rouges de macrophages CD68 associés à une moins bonne survie.

Cette différence d'infiltrats immunitaires associés à la progression d'une tumeur, peut-elle être corrélée à des signes précoces de métastases ?



Nous avons évalué ces signes précoces pour des patients qui n'ont pas encore de métastases, mais qui ont des cellules tumorales (cellules bleues) dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques de la tumeur primaire. Des cellules tumorales qui commencent à circuler sont un signe avant-coureur de métastases.

Nous avons analysé de grandes cohortes de patients pour voir s'il y a un effet bénéfique, c'est-à-dire un contrôle précoce de métastases par le microenvironnement ou, au contraire, existe-t-il une promotion, un effet péjoratif, de certaines composantes immunitaires ? Pour cela, une analyse du microenvironnement des tumeurs a été effectuée pour plus de 900 patients atteints de cancer. Ces travaux ont montré que la présence des molécules de l'immunité adaptative, en particulier des lymphocytes T mémoire, est corrélée avec l'absence de ces signes précoces de métastases. Ils ont donc un effet protecteur.

Quels sont les paramètres qui peuvent être associés à une dissémination de métastases ?

Pour cela, nous avons analysé non seulement l'aspect génétique des tumeurs mais aussi son microenvironnement, avec les densités de vaisseaux lymphatiques et sanguins, les cellules de l'immunité. Tout cela a permis d'expliquer la probabilité d'une dissémination vers des sites distants.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

Nous nous sommes intéressés aux sites précoces de métastases, à des métastases synchrones et au fait que le patient pouvait avoir des métastases ultérieures métachrones.

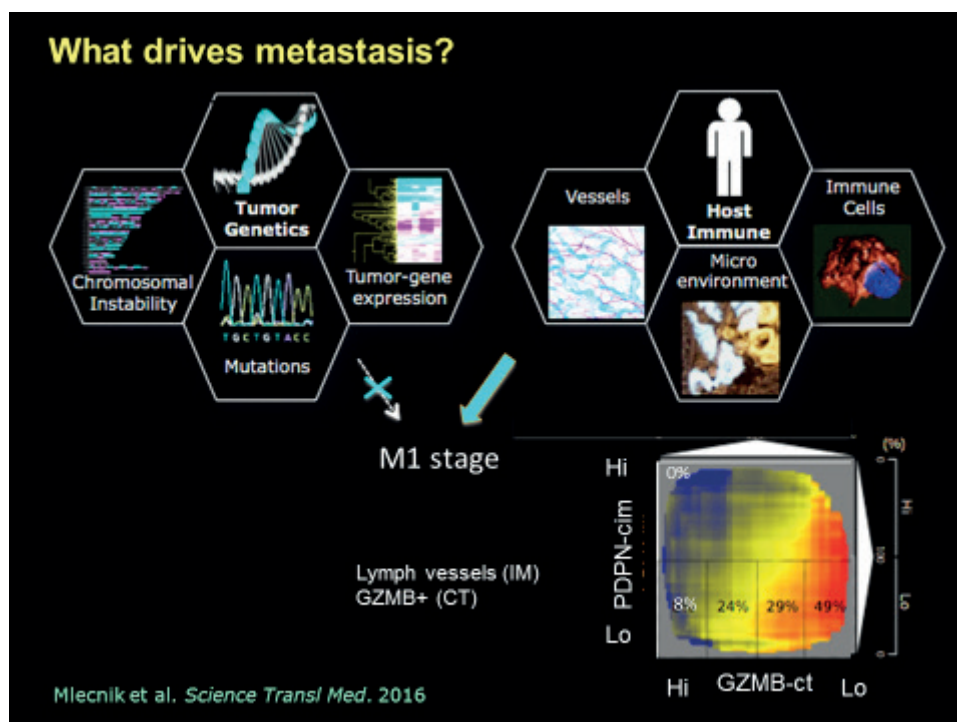
Les *patterns* d'instabilité des chromosomes ont été analysés dans des tumeurs primaires avec ou sans métastases pour deux cohortes de 400 patients. Pour des chromosomes sur des régions sélectionnées pour le *pattern* mutationnel des tumeurs ou pour l'expression de gènes tumoraux, nous n'avons trouvé quasiment aucune différence significative, à l'exception d'un gène muté qui semble être associé.

En revanche, lorsque nous avons analysé le microenvironnement tumoral, nous avons trouvé des différences majeures dans la tumeur primaire. Les caractéristiques du microenvironnement sont très fortement associées au fait que le patient va avoir une dissémination.

Elle est associée à la diminution des vaisseaux lymphatiques, à la marge d'invasion et pas dans le centre de la tumeur.

Les vaisseaux lymphatiques, ainsi que la densité des lymphocytes T GZMB+ forment un élément essentiel de l'immunité qui confère une protection.

Ces éléments associés au microenvironnement font que nous pouvons avoir une variation de métastases qui va de zéro pour les patients ayant de fortes densités de lymphocytes T GZMB+ et de vaisseaux lymphatiques, jusqu'à plus de 49 %.



Pour comprendre comment sont mises en place ces réponses immunitaires un travail a été réalisé sur un groupe de patients particulier. C'est un groupe appelé MSI qui présente des micro-instabilités satellites dues à des défauts de réparation d'ADN.

Nous avons analysé sur de très grandes cohortes les caractéristiques intrinsèques de ces tumeurs et leur microenvironnement tumoral. Ces patients MSI présentent un profil

chromosomique particulier. Plus de 400 gènes chez ces patients sont significativement surexprimés ou sous-exprimés.

Lorsque nous examinons les gènes surexprimés chez ces patients MSI, la très grande majorité sont des gènes immunitaires dont la fonction est associée à la réponse adaptative.

Une des caractéristiques intrinsèques de ces patients est que, du fait de leur défaut de réparation de l'ADN, ils ne peuvent pas réparer les mutations dites « *frameshift*, ». Il s'agit d'un décalage dans la lecture par suppression ou insertion d'un nucléotide supplémentaire.

Ces mutations « *frameshift* » qui sont très nettement supérieures chez ces patients, nous pouvons prédire où elles vont avoir lieu. C'est tout l'intérêt de ce modèle. En effet, elles n'ont pas lieu au hasard mais dans des régions répétitives du génome.

Lorsqu'il y a une séquence répétée, par exemple de A (Adénine) dans le génome, très fréquemment un « A » est ajouté ou enlevé. Du fait que les patients n'ont pas les enzymes qui permettent de réparer ces mutations, ils les accumulent.

Nous connaissons les gènes qui ont des fréquences répétées très longues, lieu où il peut y avoir une mutation « *frameshift* » et nous les avons validées, chaque fois que nous les avons observées.

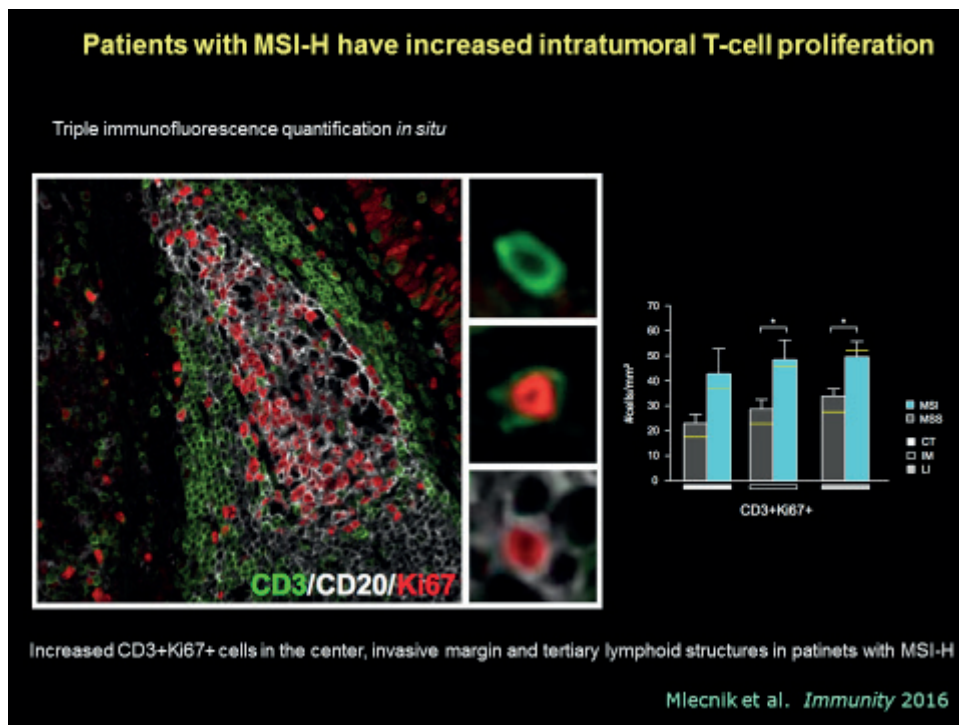
Grâce à cela, nous avons pu démontrer ce concept d'immunosurveillance et d'« *immunoediting* », qui avait été proposé par SCHREIBER. Nous avons comparé le taux de mutations silencieuses, qui n'ont aucun impact sur les peptides générés, avec l'ensemble des données publiques du génome de 3 000 patients intégralement séquencé. Nous avons ensuite fait les prédictions pour savoir si une mutation « *missense* » ou « *frameshift* » est une mutation immunogénique basée sur les prédictions de liaison sur le HLA.

Nous avons cartographié les mutations dites non-immunogéniques, qui ne changent pas le profil, versus des mutations qui sont supposées être immunogéniques d'après l'endroit où elles se trouvent. Nous avons comparé nos prédictions à ce que nous avons réellement observé pendant la séquencage.

Nous avons trouvé qu'il y a moins de mutations immunogéniques chez les patients qui sont des patients MSI, quelles que soient les mutations « *missense* » ou « *frameshift* ». C'est une démonstration génétique de l'existence de l'« *immunoediting* », puisque la seule différence entre ces deux mutations est la prédiction de leur immunogénicité.

Y a-t-il réellement des lymphocytes T associés à ces mutations prédites ?

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE

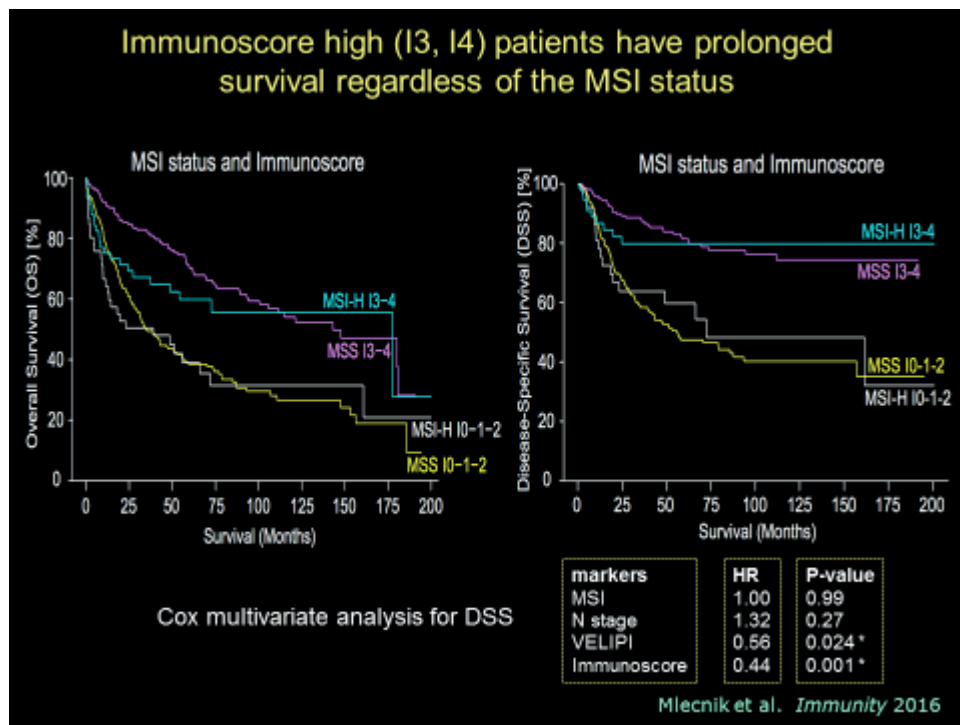


Effectivement , les lymphocytes T prolifèrent dans la tumeur que ce soit dans le centre, la marge d'invasion ou les structures lymphoïdes. Nous pouvons observer des lymphocytes T avec des marquages Dextramer spécifiques pour la mutation dans le cas particulier de TGFBR2 « *frameshift* » dans une tumeur. Ces lymphocytes T, lorsqu'ils sont isolés du sang périphérique de ces patients MSI sont capables de tuer les cellules présentant ces peptides mutés alors que les patients MSS qui n'ont pas ces mutations n'en sont pas capables.

Les lymphocytes T anti-néoantigènes de mutation « frameshift » existent et nous avons pu démontrer l'existence de cet « immunoediting » par des analyses génétiques.

Le statut MSI des patients, qui de manière générale leur confère plutôt un meilleur pronostic, est en fait entièrement dû aux caractéristiques de l'infiltrat immunitaire que nous pouvons mesurer ici avec l'Immunoscore. Les patients avec de nombreuses mutations ont des Immunoscopes forts. Ces patients ont une très bonne survie qu'ils soient MSS ou MSI. Il y a évidemment de nombreuses autres façons pour un lymphocyte T de reconnaître un antigène. Les patients qui ne sont pas capables de générer ces réponses immunitaires (Immunoscore 0/1/2) ont de très mauvais pronostics.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE



Nous imaginons bien que des thérapies qui ciblent les checkpoints à la surface du lymphocyte T ont beaucoup plus de chance de fonctionner chez les patients qui ont des lymphocytes T et qui ont surexprimé ces «*checkpoints*», que sur des patients qui ont ces tumeurs froides et qui n'ont pas un seul lymphocyte T.

Évidemment, la biologie, ce n'est pas noir ou blanc. Par rapport à ces deux extrêmes, que sont les patients Immunoscore 0 sans lymphocyte T, les patients Immunoscore 4 qui sont les plus infiltrés avec des lymphocytes T cytotoxiques, nous avons tous les intermédiaires : Immunoscore 1/2/3 pour notre classification avec des défauts immunitaires différentiels selon les patients.

Une des questions a été : quels sont les mécanismes qui peuvent rendre compte de ces différences d'infiltrats immunitaires ? Y a-t-il un facteur associé à l'attraction de ces lymphocytes T ?

Certaines sous-populations de lymphocytes T sont dépendantes des niveaux d'expression de chimiokines particulières au sein de la tumeur, leur permettant de créer une forte densité dans certaines régions.

Un autre mécanisme que nous avons pu pointer comme étant essentiel en analysant l'ensemble des cytokines (molécules solubles associées à l'immunité) concerne les niveaux d'expression d'IL15 qui induisent une très forte expansion et une prolifération locale dans la tumeur de lymphocytes T cytotoxiques. Outre le fait qu'il peut y avoir une attraction de lymphocytes T venant de l'extérieur, il y a aussi une amplification locale par IL15.

Nous souhaitons que ce test Immunoscore soit utilisé ; il est relativement simple et très indicatif.

La raison principale repose sur le constat suivant : aujourd'hui, tout patient atteint de cancer à l'hôpital subit toute une batterie de tests, tous focalisés sur la tumeur et les cellules tumorales.

Il y a évidemment la classification TNM, des classifications basées sur la morphologie des cellules tumorales, sur l'origine des cellules tumorales, sur les voies métaboliques altérées, l'instabilité des chromosomes, la présence des microsatellites. Le patient est-il muté sur KRAS, BRAF ? Il y a des classifications génétiques basées sur les niveaux d'expression des gènes de tumeurs.

Par contre, concernant l'infiltrat immunitaire aujourd'hui, à l'hôpital, nous ne faisons aucun test et nous ne connaissons rien du système immunitaire d'un patient atteint de cancer.

L'idée du test Immunoscore est d'apporter un outil qui évalue l'état du système immunitaire du patient : la densité des lymphocytes T CD8 cytotoxiques dans la tumeur.

J'ai mis l'exemple des cancers colorectaux, mais l'immunoscore peut s'appliquer à n'importe quel type de cancer.

Il a de très bonnes performances. Nous avons publié une étude pour des patients atteints de tumeurs précoces (stade 1-2) avec des densités de lymphocytes T CD8 fortes dans les 2 régions (Immunoscore 4), plus de 95 % des patients à ce stade n'ont pas de récurrence pendant plus de 18 ans et vont très bien.

Cela peut être valide dans n'importe quel type de cancer. Y a-t-il réellement un échappement du système immunitaire ? Nous avons montré qu'il y avait cette phase d'équilibre, « *immunoediting* », mais y a-t-il un échappement ?

Pour cela, nous avons réalisé deux études :

- ♦ Une première consistait à prendre des métastases issues d'une même tumeur primaire dans deux sites différents: par exemple des patients avec un cancer colorectal vont développer des métastases dans le foie et dans le poumon.

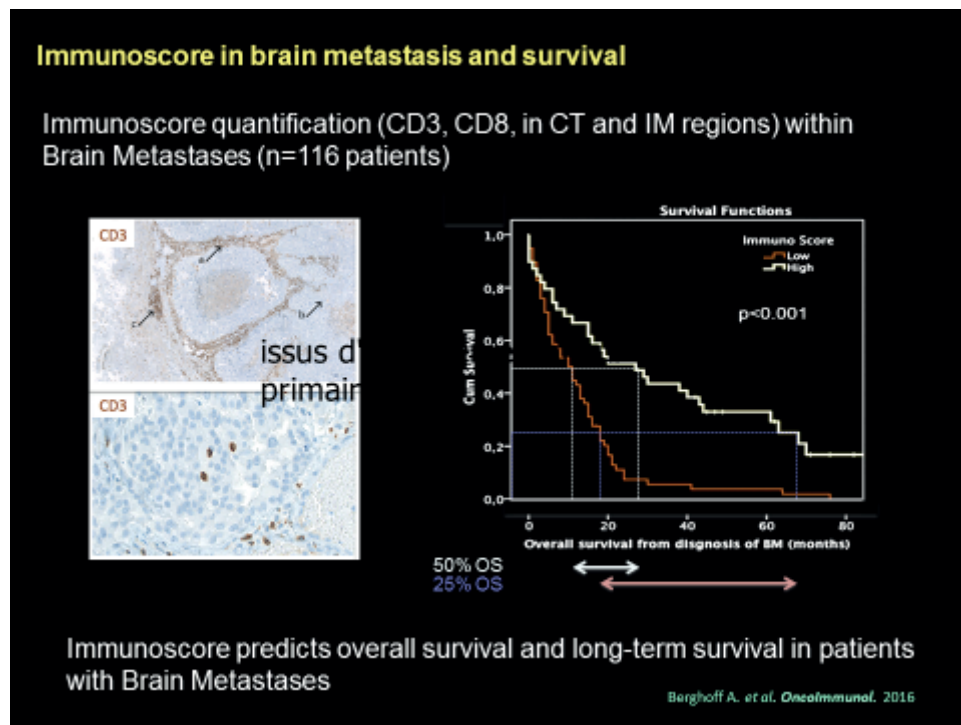
Nous avons quantifié la réponse immunitaire (Immunoscore) dans ces métastases. Premièrement, nous observons des infiltrats immunitaires dans ces métastases. Deuxièmement, nous n'observons aucune différence en termes de fréquence d'Immunoscore (0/1/2/3/4) entre les deux différents sites de métastases. Troisièmement, nous pouvons prédire la survie d'un patient même à un stade 4. Un fort Immunoscore dans les métastases de ces patients leur confère une bien meilleure survie.

- ♦ Une deuxième étude concernait le cas extrême de patients présentant n'importe quel type de tumeur primaire : le critère d'inclusion dans cette étude était la présence de métastases cérébrales que nous pouvions quantifier. 116 patients présentant des métastases cérébrales ont pu être étudiés pour examiner s'il y avait un échappement immunitaire.

Nous avons réalisé l'Immunoscore dans ces métastases cérébrales. Nous pouvions voir la marge d'invasion autour de la métastase cérébrale avec une très forte densité de lymphocytes T l'infiltrant. Lorsque nous observons les Immunoscores forts (en blanc) ou faibles (en orange), les courbes de survie sont extrêmement différentes. Après 5 ans de recul clinique, nous avons des longs survivants pour des patients avec un fort Immunoscore dans leurs métastases cérébrales.

L'Immunoscore et la densité de l'infiltrat de l'immunité adaptative, même aux stades les plus avancés d'un cancer, sont encore capables d'avoir un rôle majeur sur la survie des patients. Nous ne sommes pas dans un échappement complet du système immunitaire, même aux stades les plus avancés.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE



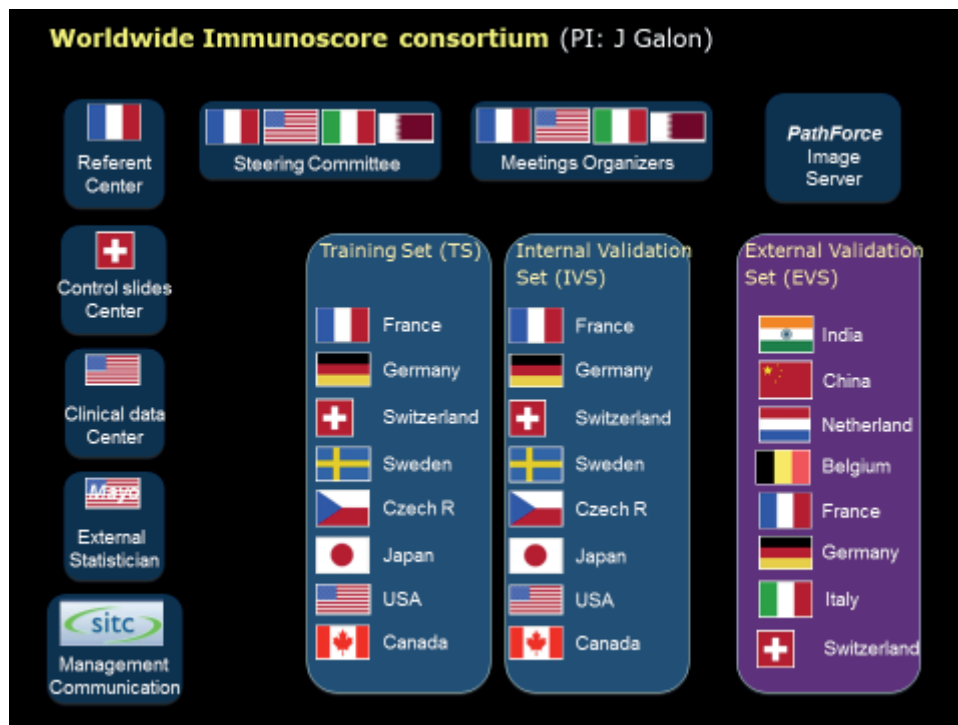
Pour une utilisation en routine de l'Immunoscore, avec l'aide de la société de l'immunothérapie des cancers américaine et un très grand nombre de sociétés savantes d'immunothérapie et de cancérologie, nous avons initié un consortium international de 23 centres dans le monde pour évaluer ce critère d'infiltrat immunitaire sur leurs patients.

Un statisticien externe à l'étude, aux États-Unis, était en charge de l'ensemble des analyses statistiques.

Trois cohortes de patients de différents pays ont été générées. Chaque pays a réalisé sur ses patients, suivant la procédure standardisée l'Immunoscore. L'ensemble des données cliniques, après un contrôle qualité ont été envoyées en crypté au statisticien.

Ce test standardisé est basé à la fois sur la pathologie classique qui doit être faite à l'hôpital, sur de la technologie moderne (scanners à haute résolution) et sur de la pathologie digitale (comptage automatique de l'ensemble des infiltrats immunitaires). C'est à la fois un changement conceptuel et technologique pour les pathologistes, mais qui est tout à fait faisable en routine.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE



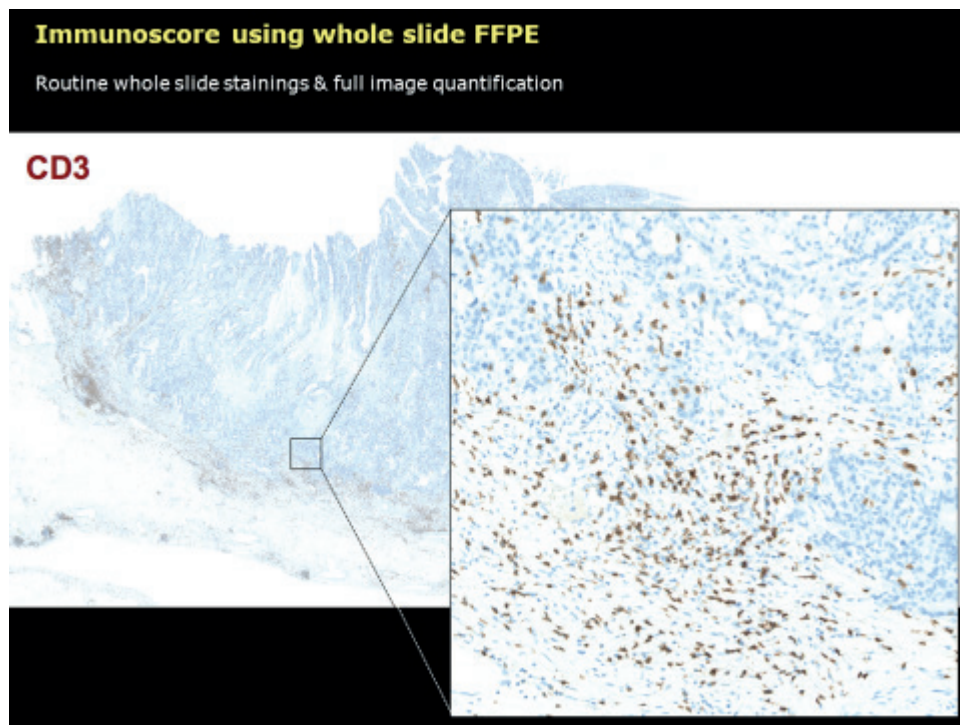
Il s'agit de marquer deux lames tout à fait classiques de l'ensemble de la tumeur pour les deux marqueurs CD3 et CD8. Chacun de ces lymphocytes T est compté un à un par le logiciel, automatiquement dans le centre de la tumeur et à la marge d'invasion c'est-à-dire où la tumeur a pénétré le plus loin dans le tissu. Les densités d'infiltrats sont rapportées par le logiciel.

Cette procédure standardisée est objective pour la quantification de l'infiltrat, puisque c'est l'intégralité de la tumeur qui est quantifiée et pas uniquement une région subjective, sélectionnée par le pathologiste.

Cette étude a été réalisée sur plus de 3 800 patients.

On peut voir quelle est la densité d'un infiltrat T pour le CD3 dans le centre de la tumeur ; la même chose pour CD8 ou à la marge d'invasion. Il y a un facteur 3 de différence d'un patient à un autre. La gamme dynamique est donc extrêmement large. Des patients sont extrêmement denses en termes d'infiltrat immunitaire. Dans le test standardisé immunoscore, on classe les patients en 3 catégories : immunoscore fort, intermédiaire ou faible.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE



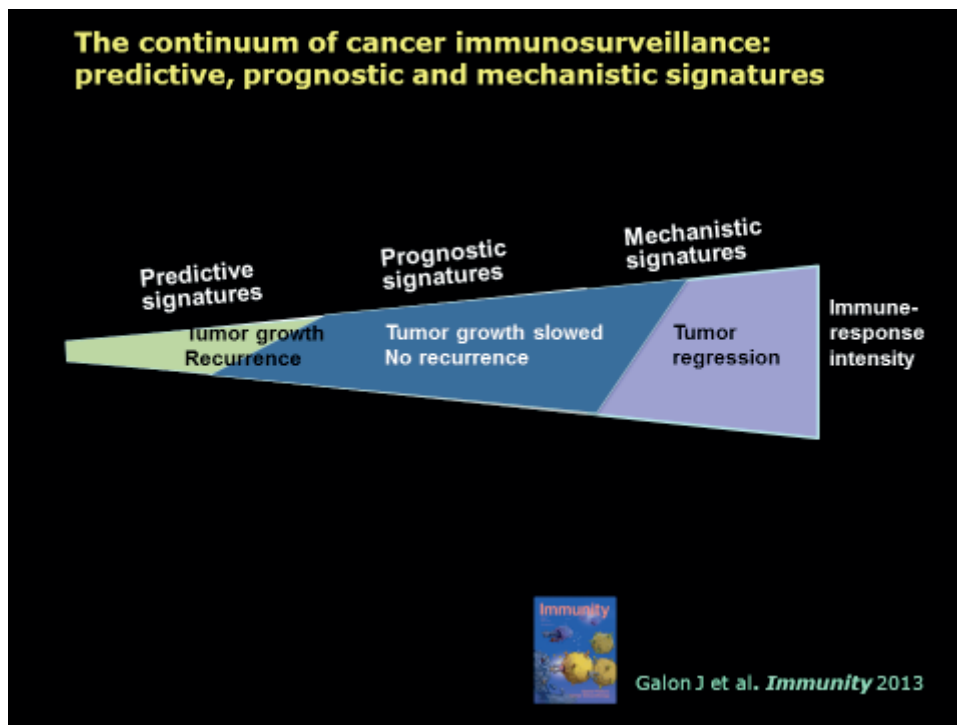
Nous avons pu valider sur ces trois cohortes de patients des P value en dessous de 0,0001 pour les 3 catégories pour tous les centres, qu'ils soient en Chine, au Japon, en Inde, aux États-Unis ou en Europe.

Les analyses multivariées, que ce soit immunoscore en 2 groupes, 3 groupes ou 5 groupes, sont extrêmement significatives. L'immunoscore est tout à fait performant sur les patients à un stade précoce que ce soit pour la survie sans récurrence ou la survie globale.

Nous espérons que ceci aidera la communauté et les hôpitaux à utiliser un premier test immunitaire standardisé qui pourrait permettre de classer les patients tout à fait différemment.

Pour finir, il y a un continuum de l'immuno-surveillance des cancers. Maintenant que nous avons des immunothérapies qui permettent de moduler la réponse immunitaire, en particulier de restimuler les lymphocytes T en fonction de l'intensité de la réponse, nous pouvons avoir des signatures mécanistiques en particulier chez les patients qui répondent. Ce sont ces fameux infiltrats lymphocytaires T CD8 cytotoxiques.

CONTEXTURE IMMUNITAIRE ET IMMUNOSCORE : UN NOUVEAU PARADIGME EN CANCÉROLOGIE



Ce test immunoscore prend en compte 3 des 4 paramètres du contexte immunitaire, le type d'infiltrat, leur densité et leur localisation. Mais il y a aussi des éléments tout à fait essentiels en ce qui concerne l'immunité et l'orientation fonctionnelle.

Alors que tous les patients ont une réponse sous-jacente immunitaire, on traite aujourd'hui des patients sans prendre en compte ces paramètres immunitaires. On mélange des patients complètement différents d'un point de vue immunitaire dans les traitements et dans les essais cliniques. J'espère que demain, des classifications immunitaires des patients vont être réalisées, puisque cela peut être fait, et que des groupes homogènes de patients d'un point de vue immunitaire vont être traités et inclus dans les essais, en particulier les essais d'immunothérapie.

J'aimerais remercier toutes les personnes de mon laboratoire qui ont réalisé ces travaux, tous les centres cliniques et tous nos collègues cliniciens. J'aimerais aussi remercier tous les centres dans le monde qui ont accepté de participer à cette étude immunoscore internationale.

Je vous remercie de votre attention.

(Applaudissements).

► **Sébastien CANDEL.**- Étant donné le temps qui nous est imparti, nous allons directement passer à la table ronde au cours de laquelle vous pourrez poser des questions sur ce très bel exposé.

Jean-Pierre DECOR,

Institut des sciences du vivant, Fondation Mérieux, Fondation Bullukian



► **Jean-Pierre DECOR.**- Nous pourrions introduire la table ronde en examinant les conséquences de l'utilisation de l'immunoscore. Il introduit une véritable innovation dans la classification, le pronostic et la façon de traiter les cancers.

On pourra ensuite revenir sur les deux stratégies thérapeutiques concernant les lymphocytes : l'approche anticorps leur permettant de retrouver leur efficacité vis-à-vis des cellules cancéreuses en levant les freins et leur stimulation via des antigènes par des vaccins ou leur modification génétique.

La complémentarité de ces approches avec les thérapies classiques a été soulignée à plusieurs reprises, de même que les options possibles en combinant ces nouvelles thérapies selon la nature des cancers.

Il a été dit que si nous vivions jusqu'à 200 ans, nous mourrions tous d'un cancer. Leur occurrence, quelle que soit leur cause, risque d'augmenter avec l'espérance de vie. Concernant ces thérapies, aujourd'hui très coûteuses, elles seront certainement susceptibles de s'appliquer à un nombre croissant des cancers. Alors comment s'organiser pour qu'elles puissent bénéficier au plus grand nombre?

► **Bernard MEUNIER.**- Cette classification en fonction de la réponse immunitaire est très innovante. Si j'ai bien compris, Jérôme GALON, vous faites une corrélation avec les gens qui sont en quelque sorte mauvais et bon réparateur d'ADN.

Être bon ou mauvais réparateur dépend-il de l'âge, de l'hygiène de vie, du patrimoine obtenu de ses parents.

Il est assez terrifiant de constater que les chances de survie sont très étroitement corrélées à la qualité de son système immunitaire !

► **Jérôme GALON.**- Je me suis concentré sur ce sous-groupe de patients qui ont ces caractéristiques particulières de défaut de réparation de l'ADN. Ce sous-groupe peut encore être divisé en deux : ceux qui ont des antécédents familiaux, (maladies transmissibles, syndrome de Lynch) et ceux qui ont un problème sporadique sans antécédent familial.

Les mécanismes sont très légèrement différents, mais le concept est le même. Ces patients avec des défauts de réparation de l'ADN vont avoir une augmentation de ces mutations et en particulier les « *frameshift* ». Ceci va induire une réponse immunitaire particulière qu'il est possible d'analyser très finement car on peut prédire ces mutations. C'est un groupe très intéressant à étudier d'un point de vue mécanistique.

Par ailleurs il existe beaucoup d'autres raisons pour lesquelles le système immunitaire peut être activé. Il peut y avoir des mutations associées à des antigènes particuliers ; ce sont les découvertes des antigènes tumoraux de Thierry BOON dans les années 80. Le système immunitaire a la possibilité de détecter un grand nombre d'antigènes permettant son activation.

L'évaluation et la quantification de cette réponse immunitaire, l'immunité adaptative des lymphocytes T avec des caractéristiques mémoires c'est-à-dire une réactivation rapide et avec une longue durée de vie, permettent avec ce test immunoscore de positionner les patients différemment par rapport à la vision actuelle d'un cancer.

► **Daniel LOUVARD.**- Ma question s'adresse également à Jérôme GALON. Tout d'abord mes félicitations pour votre brillant exposé et cette recherche exceptionnelle.

Dans une tumeur, outre les cellules tumorales

et immunitaires, objet de votre exposé, il y a les cellules du stroma dont vous avez peu parlé.

Qu'est-ce qui module la composition d'infiltrats ? Vous avez parlé des néoantigènes qui sont portés par la tumeur. Mais on sait que le stroma, les cellules d'origine mésenchymateuses, sont elles-mêmes modifiées et activées de manière épigénétique. Que sait-on du rôle du stroma et de l'épigénome ?

► **Jérôme GALON.**- Tout à fait. Je suis persuadé que nous sommes face à un système biologique où tous les partenaires interagissent et communiquent. Toutes les sous-populations des cellules immunitaires sont là, interagissent, échangent des facteurs par rapport aux cellules tumorales et aux cellules du stroma. Nous sommes dans un environnement extrêmement dynamique.

L'épigénétique module en grande partie le microenvironnement. C'est ressenti par le système immunitaire. La sénescence des cellules, le stress et les molécules qui sont, soit relarguées, soit exprimées à la surface des cellules tumorales contribuent à moduler ce microenvironnement tumoral. C'est un système biologique complexe. Avec nos technologies modernes, nous pouvons arriver à caractériser les éléments essentiels qui participent de cette modulation et qui permettent de catégoriser les patients dans des groupes complètement différents.

Mais je conviens que j'ai très peu parlé du stroma qui joue aussi un grand rôle pour moduler la réponse immunitaire.

► **Marc BONNEVILLE.**- Jérôme, tu démontres de façon assez convaincante la robustesse de l'approche immunoscore sur de très grosses cohortes et surtout dans une étude multicentrique.

Cette approche est-elle généralisable quasiment en l'état sur l'ensemble des tumeurs immunogènes avec les mêmes

valeurs pronostiques sur la base de vos données préliminaires ? Peut-on l'améliorer en adjoignant des marqueurs qui ont été évoqués ce matin, par exemple les marqueurs des cellules T mémoires résidentes ?

► **Jérôme GALON.**- Sur les données préliminaires que nous avons, le test standardisé que je vous ai montré fonctionne bien dans les cancers du côlon, du rectum et dans les métastases de poumon, de foie et cérébrales. Il fonctionne également dans plusieurs autres types de cancers avec tumeurs solides que nous avons testés en grande cohorte de patients. Nous sommes assez confiants pour dire que c'est un test généralisable à un grand nombre.

Maintenant, cela ne veut pas dire que ce sera le test optimal pour tous les types de cancers. Tout dépend de l'objectif. S'il est d'avoir un test de routine, nous sommes face à un compromis où il faut qu'il soit à la fois performant et facile à réaliser.

Nous avons essayé de faire un test avec deux marqueurs. Nous savons déjà que si nous ajoutons un troisième, les cellules qui produisent de l'IL17 par exemple, nous pourrions affiner les courbes et stratifier encore plus les patients. Nous pourrions ajouter des marqueurs de lymphocytes B ou des sous-populations de macrophages. Mais de ce fait le test deviendrait plus compliqué à mettre en œuvre.

Il faudra trouver le meilleur compromis pour un test simple, faisable, robuste avec une performance intéressante.

► **Marc BONNEVILLE.**- J'avais cru comprendre que dans le cancer du rein, la valeur pronostique de l'infiltrat n'était pas fiable.

► **Jérôme GALON.**- Le cancer du rein est probablement le contre-exemple le plus frappant. Nous n'avons pas encore réalisé de grandes cohortes sur ce cancer. Sur le test standardisé immunoscore, je ne peux pas me prononcer. Mais il semblerait qu'il ne mar-

cherait pas très bien. Les cellules NK sont probablement plus performantes. D'autres signatures immunitaires pourront être plus appropriées pour certains autres cancers.

► **Caroline ROBERT.**- Je voudrais d'abord féliciter Jérôme GALON pour son travail remarquable. Bravo. Je trouve que cela nous permet de prendre en considération le facteur temps.

Lorsque nous opérons nos patients et que nous trouvons un ganglion sentinelle positif avec une micro-métastase, nous avons automatiquement tendance à penser : quelle chance, nous arrivons à temps.

Souvent, ce n'est pas la raison ; c'est parce c'est contraint et que cela ne progresse plus. Jérôme GALON montre bien dans sa courbe que des stades 3 sont diversement positionnés soit en haut et d'autres en bas. Quelques-uns sont probablement dans la phase qui va mal évoluer avec le temps, mais d'autres vont se stabiliser à ce stade.

Il y a quand même un autre niveau de complexité : nous sommes très souvent face à des réponses dissociées. Par exemple, un traitement immunothérapeutique peut fonctionner très bien sur cinq métastases et pas sur trois autres. Ce n'est pas juste une biopsie et un Immunoscore qui va résoudre l'ensemble du problème.

► **Jérôme GALON.**- Votre remarque concerne des patients au stade métastatique avec plusieurs métastases. Je n'ai pas abordé cette question, mais nous avons de plus en plus de données où est évaluée cette hétérogénéité inter-métastases.

En fait, au stade de la réflexion, aujourd'hui chaque métastase dans un organe, doit être considérée comme une tumeur individuelle. Elle provient de clone différent avec un microenvironnement particulier. Cela complexifie énormément le traitement des patients au stade métastatique.

Je pense que nous serons dans une bien

meilleure situation lorsque l'immunothérapie sera donnée à des stades plus précoces, en adjuvant ou même en néo-adjuvant avant une chirurgie. Là, je pense que l'immunothérapie aura une place considérable dans les années futures.

Il y a le problème des biopsies, dans les essais cliniques. Toutes les études que je vous ai montrées concernent une caractéristique très approfondie de l'ensemble de la tumeur et de son environnement. C'est une grande différence. Nous ne sommes pas dans le cas de biopsie. Nous savons très bien qu'il y a une très grande hétérogénéité dans les biopsies. Elles ne sont qu'un petit fragment de l'histoire d'une tumeur. On peut avoir à un endroit une biopsie positive et négative à un autre.

Les conclusions que nous pouvons tirer des essais cliniques faits avec des biopsies doivent être prises avec précaution. Ce sont des informations extrêmement intéressantes qui vont nous aider à aller plus loin dans les essais cliniques, mais il faut bien se souvenir qu'elles ne sont qu'une vision très partielle de la réalité.

► **Claude DELCAYRE.** - Je m'adresse à tous les intervenants de ce colloque et je les remercie tous pour leurs exposés à la fois précis et passionnants.

Je travaille dans une unité à l'Inserm qui s'intéresse à l'insuffisance cardiaque. Le domaine cardiovasculaire par rapport aux cancers est relativement simple. Les modèles animaux utilisés (infarctus, surcharge, etc...) ont des éléments, mise à part l'échelle de temps, comparables.

Leurs enseignements s'appliquent à peu près bien à l'homme.

Dans le domaine dont nous avons parlé aujourd'hui, manifestement, il y a une composante individuelle cellulaire fondamentale. Vous avez tous souligné la plasticité remarquable des cellules aussi bien du système immunitaire que des cellules tumorales.

Compte-tenu de cette complexité et de l'individualité phénotypique de ces cellules, dans quelle mesure les modèles animaux peuvent-ils s'appliquer?

► **Éric TARTOUR.** - En effet avec l'immunothérapie les modèles souris sont peu prédictifs de ce qui va se passer chez l'homme. Des anti-PD-1 chez la souris fonctionnent souvent moins bien que chez l'homme.

► **Ghenima CHOUBANE.** - Je suis médecin. Je fais de la recherche médicale.

En partant de votre paradigme qui dit que le devenir tumoral est intimement lié à l'Immunoscore du patient, nous comprenons à juste titre que l'immunothérapie est un bon moyen de ralentir l'évolution de certains cancers.

En pratique, nous nous rendons compte que l'immunothérapie ne donne pas les mêmes résultats chez des patients de même âge, à un même stade de développement de la tumeur cancéreuse. D'autres hypothèses restent-elles à explorer pour l'expliquer ?

Vous parliez de microenvironnement inflammatoire chez des patients qui ont un niveau élevé d'Immunoscore. N'est-il pas possible d'utiliser cette faculté qu'ont ces patients pour essayer de la reproduire chez ceux qui n'ont pas le même terrain positif ?

► **Jérôme GALON.** - Dans la quasi-totalité des essais cliniques, même ceux effectués dans des centres académiques, on opère à partir des biopsies ; aujourd'hui, les traitements sont donnés indépendamment du statut immunitaire du patient, à l'exception des anti PD-L1 qui sont utilisés comme compagnon diagnostique de la réponse aux anti PD-1, il n'y a pas de caractérisation de la réponse immunitaire. Nous n'utilisons pas l'Immunoscore. Nous ne stratifions pas les patients pour les inclure ou pas dans un essai clinique. Je pense qu'il faudrait le faire.

Effectivement, moduler cette réponse immunitaire par des immunothérapies fonctionne. Cela va être beaucoup plus difficile pour les

patients qui au départ ont des niveaux de réponses immunitaires extrêmement faibles, en particulier ces patients Immunoscore 0, dont nous ne voyons aucun signe d'activation lymphocytaire T. Ils vont être les plus difficiles à réactiver d'un point de vue immunitaire, y compris probablement avec les vaccins.

Les vaccins pourront aussi aider les patients qui ont déjà une réponse immunitaire préexistante, en combinaison avec les « *checkpoints* ». Il serait souhaitable que des vaccins fonctionnent chez des patients Immunoscore 0, mais ce n'est probablement pas quelque chose de simple à mettre en œuvre.

► **Marc BONNEVILLE.** - Je voudrais revenir sur un point plus général. Je m'adresse aux différents intervenants.

Il y a un vrai enjeu d'avoir des marqueurs prédictifs de réponses notamment aux inhibiteurs de « *checkpoints* » immunitaires.

A partir du moment où nous restons focalisés sur les biopsies, elles empêchent une analyse dynamique. Des marqueurs prédictifs de réponse ne peuvent pas s'appuyer simplement sur une analyse ponctuelle, mais sur un suivi dynamique de l'induction d'une réponse immunitaire protectrice.

Dans ce contexte, il n'a pas été abordé les biopsies liquides et l'intérêt des cellules tumorales circulantes, des exosomes ou des marqueurs solubles qui nous permettraient d'avoir une idée de la qualité de la réponse immune existante ou pouvant être réactivée après un traitement par immunothérapie.

Quel est votre sentiment sur la pertinence des biopsies liquides et de leur intérêt notamment pour un suivi dynamique des réponses ?

► **Caroline ROBERT.** - Je suis tout à fait d'accord. C'est un objectif extrêmement important. À ce jour, nous avons les moyens de suivre les cellules tumorales circulantes. L'ADN, quand il est muté, est un reflet de l'efficacité des traitements, immunothérapie ou autres, mais aujourd'hui ces marqueurs ne nous ai-

dent pas à choisir un traitement et ne rendent pas compte de l'interaction entre l'hôte et la tumeur. Nous travaillons beaucoup dessus. Il y a des sous-populations lymphocytaires qui parfois sembleraient associées, mais ce n'est pas très puissant comme corrélation.

► **Marc BONNEVILLE.** - Donc nous n'avons pas d'idée d'une signature qui indiquerait une repolarisation de la réponse immunitaire vers une immunité protectrice après traitement.

► **Caroline ROBERT.** - J'ai vu l'expression de PD-1 sur les lymphocytes circulants. Je trouve que ce n'est pas suffisant. Ce sont des sous-populations lymphocytaires en très faible nombre. Pour les voir dans le sang, il va peut-être falloir que nous soyons un peu plus performants.

► **Éric TARTOUR.** - Concernant l'ADN circulant, ce serait très séduisant, mais nous n'avons pas le microenvironnement.

Par rapport à ces lymphocytes T qui expriment PD-1, nous avons l'impression qu'ils ne circulent pas. Ce que nous voyons dans la tumeur, en termes de niveaux d'expression, n'a rien à voir avec ce que nous voyons dans les lymphocytes T périphériques. Tandis que, pour des T régulateurs, s'il y en a beaucoup dans la tumeur, nous en aurons beaucoup dans le sang.

Peut-être l'expression de ces récepteurs ne permet pas un trafic classique des lymphocytes T, mais au contraire les fige. C'est très décevant.

► **Caroline ROBERT.** - Il y a beaucoup de recherches sur l'imagerie fonctionnelle. Elle va nous montrer quels sont les types lymphocytaires à un endroit donné sans faire de biopsie.

► **Daniel LOUVARD.** - Ma question s'adresse à tous les intervenants, mais plus particulièrement à Michel SADELAIN, qui a évoqué le point que je voudrais aborder.

Toutes les tumeurs ou presque ont pour

origine une cellule initiatrice. Ces cellules ont des propriétés communes avec les cellules souches, en particulier celles d'origine embryonnaires, plutôt que les cellules souches adultes.

Ce serait le vrai Graal de l'immunothérapie de se débarrasser des cellules qui portent des marqueurs de surface de cellules souches tumorales, que ne possède pas les cellules souches normales de l'organisme.

On pourrait ainsi éradiquer le mal à la racine.

Où en sommes-nous aujourd'hui ?

► **Michel SADELAIN.** - Excellente question. Je ne suis pas sûr qu'il y ait encore de réponse. Le sujet des cellules souches pour les cancers est controversé. Il y a des cancers pour lesquels il y a moins de polémiques. Nous ne savons pas si le concept peut être généralisé à tous les cancers.

Plusieurs groupes s'intéressent beaucoup à isoler ces cellules et cherchent effectivement des cibles particulières. Notre groupe et quelques autres sont en train d'étudier la leucémie aigüe myéloblastique (AML). La question est de trouver l'expression de gènes qui permettraient de distinguer des cellules souches hématopoïétiques normales des cellules souches de l'AML. Il y a quelques candidats. C'est surtout des différences d'expression. Je n'en ai pas vu encore qui soit unique pour l'AML, mais il y a sûrement des différences d'expression dans les « *G coupled protein receptors* » par exemple : des molécules qui ne sont pas mutées, mais exprimées différemment. Le sujet n'est pas facile mais plusieurs groupes y travaillent.

► **Gilbert LENOIR.** - Concernant les conséquences sociétales de ces découvertes, mes questions s'adressent à Michel SADELAIN et à Jérôme GALON. On a parlé tout à l'heure des coûts de ces nouveaux traitements. J'entends, Michel, que ces nouveaux traitements « *one shot* » sont intéressants mais c'est une technologie très sophistiquée. Quel en est le coût

comparé aux chimiothérapies ?

Jérôme Galon a parlé des robots. Peut-on mettre en place cet Immunoscore à brève échelle sur toute la France dans le cadre d'un plan cancer ?

► **Michel SADELAIN.** - Le coût à l'heure actuelle pour fabriquer des cellules, traduire le CAR et procéder aux essais de base de « *safety* » pour un patient est d'environ 45 000 \$ au centre Kettering. Plus de la moitié du prix est représenté par les tests de « *safety* » exigés par la FDA.

Il y en a un en particulier qui irrite beaucoup les personnes comme moi car il coûte 7 000 \$ et a été pratiqué sur des centaines d'échantillons sans jamais être positif. Nous avons présenté à la FDA tous les résultats. Ils nous ont écoutés poliment toute la journée et à la fin, ils nous ont dit : « C'est très bien continuez à les faire ! ».

Toutefois nous ne désespérons pas, à terme, de pouvoir faire une économie de 7 000 \$ sur les 45 000 \$.

Ceci étant, toutes ces technologies ont pour origine des centres académiques et n'ont pas été optimisées. On utilise parfois des appareils, des milieux de culture qui ont été créés pour d'autres besoins. Je ne dirais pas que c'est amateur mais c'est réalisé sans support industriel.

Ces dernières années, de grandes sociétés comme General Electric viennent nous rendre visite deux à trois fois par an pour s'enquérir de nos besoins en équipement. Nombre de petites structures se sont aussi créées sur la côte Est, à Boston, Philadelphie, avec une créativité impressionnante pour purifier des cellules à partir des propriétés physiques, des ondes acoustiques, pour séparer des sous-ensembles, les faire pousser sur des *chips* minuscules. Des améliorations sont en cours. Cela ne garantit pas que le prix baissera mais je suis assez optimiste.

Notre contribution prioritaire est d'augmenter

l'efficacité de ces lymphocytes T. L'essai que j'ai décrit avec cette expression du ligand et du 4-1BB vient d'être approuvé et la dose que nous avons décidée avec la FDA pour démarrer cet essai de phase I est 100 fois inférieure à la dose actuelle. En effet, à partir des calculs dans les modèles murins de l'efficacité et de la persistance, si nous les extrapolons à la situation humaine, une dose 100 fois plus petite pourrait atteindre le même résultat que les CARs de deuxième génération actuels. La culture pour cet essai ne sera plus de 9 à 10 jours, mais réduite à cinq. Il n'y aura plus d'aphérèse, ce sera une simple prise de sang.

La réduction des tests de « *safety* » les équipements qui seront bientôt disponibles avec un prix abordable, l'augmentation de l'efficacité des cellules avec une durée de culture courte, tout cela devrait permettre d'obtenir un prix plus raisonnable qu'il n'est aujourd'hui.

Je suis toujours déçu quand mes collègues basent leur opinion sur les coûts actuels en matière de thérapies cellulaires. Rien n'a été optimisé. L'industrie commence juste à s'intéresser au « *manufacturing* » nous sommes au tout début de l'aventure.

► **Sébastien CANDEL.** - Nous allons terminer sur cette note positive. Merci beaucoup.

Je voudrais remercier tous les conférenciers pour leurs belles présentations, même compréhensibles pour les personnes non familières du domaine. J'aimerais aussi remercier : Jean-Pierre DÉCOR qui est à l'origine et l'organisateur de l'ensemble de la journée ainsi que Jean-François BACH et Sébastien AMIGORENA. Je voudrais également remercier les Fondations qui ont permis ce très beau colloque.

Merci à tous d'avoir participé.

(Applaudissements)

(La séance est levée à 16 heures 20.)





INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences



FONDATION
BULLUKIAN
INNOVATION | CULTURE | SOLIDARITE

