

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

Pierre COMBE

Né le 17 décembre 1980 à Chambray-les-Tours

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2013

Recherche d'un biomarqueur dans le cadre de l'immunomodulation anti-tumorale par anti-PD1 dans le cancer du rein : *Analyse de l'expression des molécules de costimulation inhibitrice sur les lymphocytes T infiltrant les tumeurs du rein*

Looking for a biomarker in the immunomodulation by anti-PD1 in kidney cancer : *Analysis of the expression of coinhibitory receptors on T cells infiltrating kidney tumors*

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Claude LINASSIER
Membres du jury : Monsieur le Professeur Philippe BOUGNOUX
Monsieur le Professeur Franck BRUYERE
Madame le Docteur Bérengère NARCISO

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSESEURS

Professeur Daniel ALISON, Moyens
Professeur Christian ANDRES, Recherche
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P. BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER – J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J.
LANSAC – J. LAUGIER - G. LELOD - G. LEROY - Y. LHUINTE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H.
METMAN – J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph.
RAYNAUD – J.C. ROLLAND – Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D.
SAUVAGE - M.J. THARANNE – J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
M.	BARON Christophe	Immunologie
Mme	BARTHELEMY Catherine	Pédopsychiatrie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	O.R.L.
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie	Médecine Générale
-----	---------------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	HUAS Dominique	Médecine Générale
	LEBEAU Jean-Pierre	Médecine Générale
	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mmes	ANGOULVANT Theodora	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
	BAULIEU Françoise	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
MM.	BOISSINOT Eric	Physiologie
	DESOUBEUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mme	DUFOUR Diane	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	EHRMANN Stephan	Réanimation médicale
Mmes	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HOARAU Cyrille	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière

	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
	MARUANI Annabel	Dermatologie
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire in vitro
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	TERNANT David	Pharmacologie – toxicologie
Mme	VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
MM.	GIRAudeau Bruno	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mmes	HUAS Caroline	Médecine Générale
	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale
M.	ROBERT Jean	Médecine Générale

CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM

M.	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

SOMMAIRE

INTRODUCTION

A-Cancer du rein	10
B-Renaissance de l'immunothérapie anti-tumorale	12
C-Molécules de costimulation inhibitrices :	14
1-Molécules de costimulation	16
2-Molécules de costimulation inhibitrice et épuisement des lymphocytes T	18
3-MCI comme cibles thérapeutiques dans le cancer	18
4-Signification clinique de l'expression des MCI en cancérologie	19
Objectif du travail	20

MATERIEL ET METHODES

1-Patients	21
2-Dissociation et isolement des lymphocytes infiltrant les tumeurs (T.I.L)	23
3-Analyse phénotypique par cytométrie	23
4-Cinétique d'expression des molécules de costimulation inhibitrice après activation in vitro des lymphocytes T sanguins	24
5-Analyse de l'expression de PD-1-Tim-3 par immunofluorescence in situ	24
6-Etude fonctionnelle des TIL selon leur profil de co-expression de PD-1 et Tim3	25
7-Etude rétrospective pronostique sur cohortes de CRCC localisés et métastatique	25

RESULTATS

1-Profil d'expression des MCI sur les TIL	27
2-Induction des MCI après stimulation TCR-dépendante	30
3-Co-expression PD1-Tim3 sur les TIL	32
4-Analyse fonctionnelle des TIL	36

DISCUSSION

1-Expression prédominante de PD-1 par les TIL de cancers du rein	37
2-Analyse de l'expression des autres MCI dans les TIL de cancers du rein	37
3-Analyse et propriétés des TIL co-exprimant PD-1 et Tim-3	38
4-Anergie des TIL et co-expression des MCI	39
5-Intérêt pronostique de l'analyse de ces molécules de costimulation dans le rein et d'autres cancers	39
Conclusion et perspectives	40

REFERENCES	41
------------	----

RESUME

Le blocage des molécules de costimulation inhibitrice (MCI) est une nouvelle voie thérapeutique en cancérologie permettant une réactivation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. Les MCI ; CTLA-4, PD-1, LAG-3 et Tim3, sont les plus étudiées. L'anticorps thérapeutique anti-PD1 bloquant Nivolumab prometteur dans le carcinome rénal à cellules claires, nécessite des biomarqueurs prédictifs de réponse et une exploration des mécanismes de résistance primaire. Nous avons étudié pour cela le profil d'expression de ces MCI sur les lymphocytes infiltrant des tumeurs (TIL) du rein chez l'homme. Nous avons aussi étudié la cinétique d'expression de ces MCI sur des lymphocytes du sang périphérique de donneurs sains après activation TCR-dépendante, mettant ainsi en évidence leur rôle en condition de stimulation antigénique aigue de ces MCI.

Dans les tumeurs du rein, deux populations se distinguent : les tumeurs dont les TIL expriment PD1 et Tim3 et celles exprimant PD1 seul. L'analyse fonctionnelle, des capacités effectrices nous a montré un profil d'exhaustion des TIL PD1+Tim3+. Le point de clivage entre activation et exhaustion et sa réversibilité par des associations d'anticorps bloquants les différents MCI impliquées est à préciser ainsi que le caractère prédictif du statut PD1-Tim3.

Blocking of coinhibitory molecules (CIM) is a new therapeutic approach in oncology for reactivation of cytotoxic T lymphocytes specific for tumor antigens. CIM: CTLA-4, PD-1 , LAG-3 and TIM3 are the most studied. The therapeutic anti-PD1 blocking antibody Nivolumab, promising in clear cell renal cell carcinoma, requires predictive biomarkers of response and exploration of primary resistance mechanisms. We studied the expression profile of these CIM on tumor infiltrating lymphocytes in human kidney tumor. As the kinetics of expression of these CIM on peripheral blood lymphocytes from healthy donors after TCR-dependent activation, highlighting the role of the CIM in condition of acute antigenic stimulation, which may be markers of lymphocyte activation. In kidney tumors, two populations can be distinguished: tumors which TIL express PD1 and TIM3 and those expressing only PD1. Functional analysis of effector capacity showed us an exhaustion profile of TIL PD1+TIM3+ . The point of cleavage between activation and exhaustion and its reversibility using Antibody blocking different CIM involved is to be clarify and the predictive nature of the PD1-TIM3 status.

ABBREVIATIONS

LT : lymphocyte T

MCI: molécules de costimulation inhibitrice

TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur

CRCC : carcinome rénal à cellules claires

CP : carcinome tubulo-papillaire

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CMF: cytométrie en flux

PD-1 : program death 1 (CD279)

Tim3: T cell immunoglobulin and mucin domain 3

LAG3: lymphocyte activation gene 3 (CD223)

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CD152)

IFN γ : interferon gamma

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

IL-2 : interleukine 2

IL-6 : interleukine 6

IL-15 : interleukine 15

TCR : T Cell Receptor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Ki67: Antigène Ki67, marqueur de prolifération.

PI3K : phosphatidyl inositol 3 kinase

Akt (ou PKB) : enzyme Akt (ou protéine kinase B)

Introduction

Depuis 2006, les thérapies anti-angiogéniques ont profondément modifié le traitement du cancer du rein métastatique. La renaissance de l'immunothérapie anti-tumorale à partir de 2010, avec le sipuleucel-T et l'ipilimumab, annonce un nouveau bouleversement thérapeutique en cancérologie.

A- Le cancer du rein

Le cancer du rein représente 2,5% de l'incidence mondiale des cancers soit 2730 00 cas et 116000 décès par an. Cela représente 8000 cas et 3800 décès par an en France [1]. L'histologie la plus fréquente est le carcinome rénal à cellules claires dans 80% des cas, suivi du carcinome papillaire de type 1 et de type 2, du carcinome chromophile, du carcinome de Bellini et le carcinome sarcomatoïde qui est une forme particulièrement agressive de carcinome rénal à cellules claires. En dehors de syndromes familiaux (maladie de Von Hippel Lindau, syndrome de Birt-Hogg-Dube, sclérose tubéreuse de Bourneville, carcinome héréditaire tubulo-papillaire liée à une mutation de c-MET...), les principaux facteurs de risque sont le tabagisme, l'obésité, l'hypertension artérielle et le diabète [2,3,4]. Le cancer du rein est diagnostiqué à un stade localisé dans 70% des cas [5]. Le diagnostic est tardif, à un stade localement avancé ou métastatique d'emblée dans 30% des cas. L'évolution métastatique secondaire survient dans 30% des cas. Le traitement curatif du cancer du rein localisé est la néphrectomie, l'importance de la préservation néphronique fait opter pour une néphrectomie partielle quand elle est possible, l'indication est validée pour les stades Ia et Ib [6,7]. Il n'y a pas de traitement adjuvant validé, cependant de nombreux essais sont en cours.

Le traitement historique des formes métastatiques de ce cancer chimio-résistant était l'immunothérapie par les cytokines recombinantes IL-2 et l'IFN α . Ces cytokines stimulent la réponse immunitaire anti-tumorale innée via les cellules NK (Natural killer) et adaptative via la réponse lymphocytaire T Th1. L'IL-2 est une cytokine impliquée dans la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T effecteurs et régulateurs. Son mode d'action est ambivalent. Elle stimule l'induction de la réponse Th1 mais également sa régulation par les lymphocytes T régulateurs (CD4+CD25+Foxp3+) [8]. Elle stimule également la prolifération et la différenciation des cellules NK. L'IFN α est une cytokine activant les cellules NK et stimulant également la réponse Th1. Une méta-analyse du traitement du CRCCm par IFN α et/ou IL-2 [9] retrouve un taux de réponse global de 12,9%

dont 3,6% de réponse complète contre 2,5 à 4,5% de réponse dans les bras contrôle. La survie médiane à était de 13,3 mois. Les différents schémas d'administration de l'IL-2, intraveineux de Rosenberg [10] et sous-cutané de West [11] n'ont pas montré de différence d'efficacité significative, les faibles doses étant moins toxiques. L'IFN α comparé au placebo a montré une amélioration significative de survie globale de 3,8 mois. Les différentes associations à des cellules activées in vitro (LAK : cellules NK activées in vitro par hautes doses d'IL-2, MAK : macrophages activés, TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur) n'ayant pas montré d'amélioration significative. Les facteurs pronostiques établis, comprenaient l'index de performance de Karnofski (KPS), le nombre de sites métastatiques, le délai entre le diagnostic et le traitement, le taux d'hémoglobine et de leucocytes, la calcémie corrigée, les LDH, les PAL. Ils permettaient de définir les groupes de bon pronostic, de pronostic intermédiaire ou mauvais pronostic avec des survies médianes respectivement à 26,9 mois, 11,5 mois et 4,2 mois [12]. La néphrectomie associée au traitement par IFN α 2b chez des patients sélectionnés permettait une amélioration de survie globale de 4,8 mois [13]. Le syndrome inflammatoire, les taux élevés de l'IL-6, de la CRP, de la VS ou de fibronectine étaient associés à une absence de réponse à l'IL-2. Une hypoxie intra tumorale objectivée par une augmentation de l'anhydrase carbonique de type IX in situ est corrélée à une meilleure réponse à l'IL-2. Une augmentation des concentrations sériques de VEGF est corrélée à une absence de réponse à l'IL-2 [14,15] (ces biomarqueurs sont peu utilisés en pratique). Sur le plan clinique, la présence de métastases viscérales est également corrélée avec une absence de réponse à l'IL-2. Des réponses cliniques persistantes et prolongées pouvaient être observées avec ces traitements de façon plus fréquente qu'avec les anti-angiogéniques.

Les cytokines recombinantes IFN α ou l'IL-2 demeurent une option pour des patients pauci-métastatiques de bon pronostic en première ligne de traitement.

La perte de fonction du gène Von Hippel-Lindau (VHL) est un événement déterminant de la carcinogénèse du carcinome rénal à cellules claires. Il conduit à une dérégulation de la voie du VEGF, à une surexpression du VEGF responsable d'une néo-angiogenèse tumorale qui constitue une cible thérapeutique majeure dans le CRCCm [16]. Depuis 2006, le développement des agents antiangiogéniques (les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) : sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib et tivozanib [17-21], un anticorps monoclonal : le bevacizumab [22], les inhibiteurs de m-Tor : temsirolimus et everolimus [23,24]) a permis une amélioration du pronostic. Cependant ces thérapies antiangiogéniques permettent très rarement d'obtenir des rémissions complètes durables [25], alors que celles-ci existent dans certains cas chez les patients de bon pronostic traités cytokines recombinantes.

B- La renaissance de l'immunothérapie anti-tumorale

Des progrès majeurs ont été faits dans la compréhension des mécanismes de l'immunité anti-tumorale et des mécanismes d'échappement mis en œuvre par l'environnement tumoral immunosuppresseur. Ils ont permis une renaissance de l'immunothérapie anti-tumorale depuis 2010 avec l'AMM du sipuleucel-T (un vaccin à base de cellules mononuclées autologues chargés avec un antigène de phosphatase acide prostatique) améliorant la survie médiane de 4 mois dans le cancer de prostate métastatique [26] et de l'ipilimumab (un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 bloquant ce récepteur de costimulation inhibitrice et permettant une réactivation des lymphocytes T effecteurs) améliorant la survie médiane de 3,7 mois dans le mélanome métastatique [27]. Le ciblage de l'immunité anti-tumorale prend une place majeure dans l'arsenal thérapeutique, comme le définit Hanahan dans sa mise à jour en 2011 de « Hallmarks of cancer » [28].

Au-delà de l'efficacité modeste des cytokines recombinantes dans le cancer du rein, l'immunothérapie anti-tumorale s'appuie sur l'optimisation d'une réponse immune anti-tumorale spontanée. Le concept d'immunosurveillance, soutenu par Blankenstein [29] est défini par l'existence d'une réponse naturelle lymphocytaire T reconnaissant des antigènes tumoraux. La mise en évidence de lymphocytes T anti-tumoraux dans d'exceptionnelles observations de régression spontanées de tumeurs chez l'homme et le bon pronostic généralement associé à l'infiltration lymphocytaire T soutiennent cette hypothèse [30]. Dans un essai de phase III des réponses complètes ont été observées sous placebo [31]. Des réponses immunitaires lymphocytaires T spécifiques d'antigènes tumoraux peuvent être détectées dans le sang et dans le microenvironnement tumoral de patients atteints de cancers du rein. Les quatre classes d'antigènes tumoraux identifiés sont : 1/ les antigènes embryonnaires réactivés (Ag de type cancer testis : RAGE, PRAME, SART1, NY-ESO1) dont l'expression est limitée aux cellules germinales et à certaines cellules tumorales, 2/ les antigènes mutés (VHL, P53), 3/ les antigènes spécifiques de tissu (Kim-1, Pax 2) exprimés dans le tissu rénal normal et tumoral, 4/ les antigènes surexprimés par la tumeur (CA-IX, Muc1/CA15-3, Her2, 5T4, peripilin2, cycline D1, c-Met, MMP-7...) [32,33].

La compréhension des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale innée (cellules NK, macrophages) ou adaptative a progressé. Ces mécanismes sont multiples [34] : La modification des cellules tumorales elles-mêmes aboutissant à l'induction

d'un mécanisme de tolérance centrale ou périphérique. Les mécanismes en sont la perte de l'expression par les cellules tumorales des antigènes ou des molécules présentatrices d'antigène et l'acquisition d'une résistance à la lyse par les cellules immunitaires secondaire à des mutations de récepteurs de mort cellulaire (TRAIL receptor, DR5, Fas). La génération d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur : comprenant les lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25+ foxp3+) et la différenciation de cellules suppressives de lignée myéloïde (MDSC) inhibant les lymphocytes T effecteurs notamment par sécrétion de cytokines immunosuppressives dont TGFβ et IL-10. Les MDSC constituent également un mécanisme de résistance au sunitinib [35]. De nombreux travaux précliniques ont montré que les vaccins anti-tumoraux étaient plus efficaces lorsqu'ils étaient associés à une déplétion de lymphocytes T régulateurs. Suite à ces résultats, l'essai du vaccin IMA-901, associé au cyclophosphamide à faible dose, dont un des effets est la déplétion des lymphocytes T régulateurs, a donné des résultats préliminaires encourageants [33]. L'essai de phase 3 étudiant l'association au sunitinib comparé au sunitinib seul est en cours en première ligne de traitement du CRCCm.

Il existe des synergies potentielles entre l'immunothérapie et les antiangiogéniques. De façon surprenante, il est apparu que certaines molécules anti-angiogéniques diminuaient le nombre de lymphocytes T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives créant un microenvironnement tumoral moins suppresseur [36]. Cette diminution des lymphocytes T régulateurs était corrélée à une survie augmentée des patients traités par sunitinib [37]. Cette déplétion des lymphocytes T régulateurs est également observée avec l'axitinib [38]. Dans des modèles murins précliniques, l'association de molécules anti-angiogéniques à une immunothérapie améliore l'efficacité de cette immunostimulation. **Les molécules antiangiogéniques inhibent l'immunosuppression associée au cancer, justifiant leur association avec l'immunothérapie.** La description du mécanisme de mort immunogénique des cellules tumorales, caractérisée par l'exposition de calreticuline, le relargage d'ATP et d'HMBG1 par les cellules tumorales, a été étudiée par l'équipe de G. Kroemer. Le recrutement de cellules immunitaires efficaces est spécifiquement favorisé par des inducteurs de mort immunogénique dont certaines chimiothérapies ; les anthracyclines et l'oxaliplatine, ainsi que la radiothérapie [39-42]. La synergie potentielle d'inducteurs de mort immunogénique avec les thérapies immunomodulatrices reste à explorer dans le CRCC.

Les nouvelles stratégies de l'immunothérapie anti-tumorale sont de contrer l'immunosuppression induite par le microenvironnement tumoral afin de rétablir un équilibre en faveur de l'immunosurveillance, c'est à dire d'une réponse immunitaire T anti-tumorale

préexistante. Un des mécanismes majeurs de l'immunosuppression induite par le microenvironnement tumoral est la surexpression des molécules de costimulation inhibitrice dont l'analyse constitue le cœur de ce travail.

C-Les molécules de costimulation inhibitrices :

A la fin des années 1980, RH Schwartz proposait la théorie du « second signal » selon laquelle, l'activation des lymphocytes T nécessite un premier signal défini par la reconnaissance par le récepteur T d'un complexe HLA-peptide combiné à un second signal transmis par l'interaction d'une molécule de costimulation exprimée par le LT (CD28) avec son ligand B7.1 (CD80) présent sur une cellule présentatrice d'antigènes (CPA). En l'absence de ce second signal, le LT devient anergique. Ce rôle de la costimulation pour l'activation des lymphocytes T a été confirmé mais s'est complexifié au cours des dernières années par l'identification de nombreuses autres molécules de costimulation et de leurs ligands. Il a également été découvert qu'**au cours de l'activation des lymphocytes T, des molécules de costimulation inhibitrices** telles que CTLA-4, PD-1, Tim-3, Lag3 sont secondairement induites pour les réguler et inhiber différentes fonctions [43].

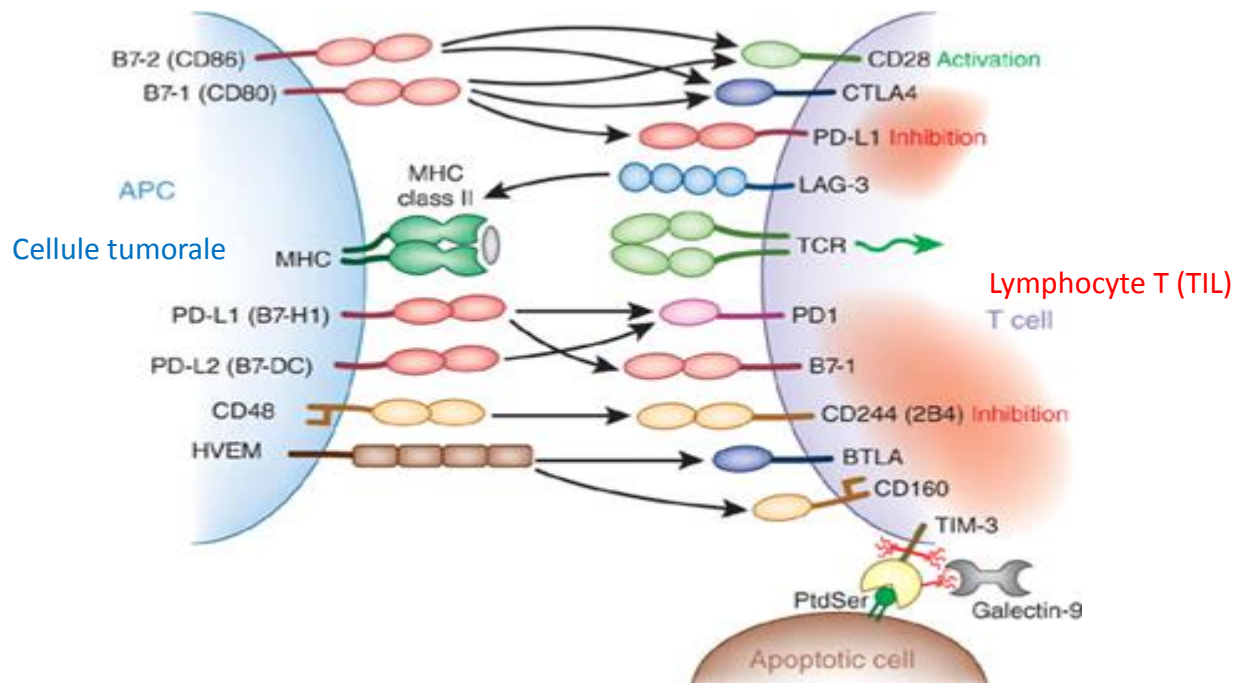


Schéma 1 : Synapse immunologique représentant le 1^{er} signal (TCR-CMH/peptide) et les 2nd signaux de costimulation (molécules de costimulation activatrice ou inhibitrice associées à leurs ligands). D'après *Nature Immunology* 2012, Freeman [44].

1/ Molécules de costimulation

1.1 Classification

Les molécules de costimulation appartiennent à deux grandes familles de molécules : la superfamille des immunoglobulines (CD28, ICOS, CTLA-4, PD1..) et la superfamille des récepteurs aux TNF (4-1BB, OX40, CD27, GITR...).

On distingue aujourd'hui les molécules de costimulation activatrices dont le prototype est CD28 et des molécules de costimulation inhibitrices telles que CTLA-4 ou PD-1. Néanmoins, certaines molécules (HVEM) peuvent se lier à plusieurs ligands et selon la nature de ce ligand, le signal de costimulation sera activateur ou inhibiteur [45].

Des récepteurs de costimulation activateurs et inhibiteurs peuvent entrer en compétition pour un même ligand. Ainsi les molécules de costimulation activatrice, CD28, et inhibitrice, CTLA4, vont se lier aux mêmes molécules CD80, CD86 et B7-H2 et le signal finalement transmis au LT résultera de l'intégration de ces différentes voies de signalisation.

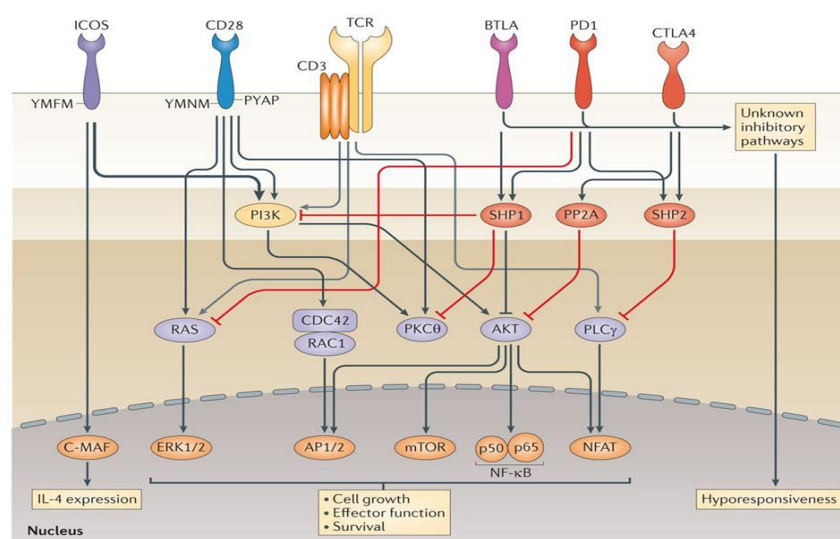
Receptor or ligand on T cell	Superfamily	Cellular expression pattern	T cell expression	Binds	Costimulatory or Inhibitory
CD28	Ig (CD28 family)	T cells	Constitutive on Naïve	B7.1, B7.2	Costimulatory
ICOS	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, NK cells	Induced upon activation	ICOSL (B7RP1)	Costimulatory
CD40L	TNF/TNFR	T cells	Induced upon activation	CD40	Costimulatory
OX40	TNF/TNFR	T cells	Induced upon activation	OX40L	Costimulatory
4-1BB	TNF/TNFR	T cells, DC subset, FDCs, eosinophils, NK cells	Induced upon activation	41BBL	Costimulatory
CD27	TNF/TNFR	T cells, NK cells, B cells	Constitutive on Naïve	CD70	Costimulatory
LIGHT	TNF/TNFR	T cells, monocytes, NK cells, immature DC	Induced upon activation	HVEM	Costimulatory
CTLA4	Ig (CD28 family)	T cells	Induced upon activation	B7.1/B7.2	Inhibitory
PD-1	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, B cells monocytes	Induced upon activation	PD-L1/PD-L2	Inhibitory
PD-L1	Ig (CD28 family)	T cells, NKT cells, B cells monocytes, DC, endothelial cells, hepatocytes, and so on	Constitutive and upregulated upon activation	PD-1, B7.1	Inhibitory
BTLA	Ig (CD28 family)	T cells, B cells, DC (macs and NK in B6 mice only)	Constitutive on Naïve	HVEM	Inhibitory
CD160	Ig	HVEM and MHC-I (low affinity)	Induced upon activation	HVEM	Inhibitory
TIM3	Ig	T cells, macs, DCs	Induced upon activation	GALECTIN 9, phosphatidyl serine	Inhibitory
2B4	Ig (CD2 family)	T cells, NK cells, dendritic epidermal T cells, monocytes	Induced upon activation	CD48	Costimulatory and Inhibitory
LAG3	Ig	T cell, NK cells, B cells	Induced upon activation	MHC-II	Inhibitory
CD200R	Ig	T cells, macrophages, DCs, neutrophils, basophils, mast cells	Constitutive on Naïve	CD200	Inhibitory?
PIR-B	Class 1/Class 1-like molecules?	T cell, B cells, DCs	?	MHC-I	Inhibitory
NKG2A	C-lectin	T cells, NK cells	Induced upon activation	Qa-1 ^B , non-classical MHC-I, stress induced molecules (e.g. Rae-1, MICA, MICB)	Inhibitory
Ly49 family (mice)	C-type lectin	T cells, NK cells, NK T cells monocytes/macrophages	Variable	MHC-I	Costimulatory and inhibitory
KIRs (human)	Ig	T cells	Induced upon activation	HLA-1	Inhibitory
GP49B	Ig	T cells, macrophages, neutrophils, and NK cells, mast cells	?	$\alpha_v\beta_3$	Inhibitory

Tableau 1 : récapitulatif des principales molécules de costimulation activatrice et inhibitrice.
D'après *Crawford, Current opinion in immunology 2009* [46]

1.2 Mécanismes d'action des molécules de costimulation.

Initialement les molécules de costimulation étaient considérées comme permettant simplement d'augmenter les fonctions et l'activation des lymphocytes T. Ainsi lorsque les lymphocytes T sont stimulés par le récepteur T et costimulés par CD28, la production d'IL-2 est augmentée. Par la suite, il est apparu que le signal transmis par les molécules de costimulation et leurs ligands était bidirectionnel ; ils concernent aussi bien le LT que la CPA ou une autre cible. Ainsi, CTLA-4 transmet un signal inhibiteur aux LT mais également au niveau de la CPA après interaction avec son ligand. Ce signal induit l'enzyme IDO (indoleamine 2-3 dioxygénase) qui dégrade le tryptophane dont le manque peut entraîner l'apoptose ou l'anergie des LT [47]. De même, l'interaction entre la molécule PD-1 et la molécule PDL-1 exprimée par une cellule tumorale entraîne une augmentation de la résistance à l'apoptose de la cellule tumorale [48].

Sur le plan moléculaire les molécules de costimulation activatrice de la superfamille des immunoglobulines (CD28, ICOS) vont activer les voies de la PI3 kinase et d'AKT (PKB). La voie Ras est également recrutée par CD28 tandis qu'ICOS signale aussi par cMaf. Le domaine intracytoplasmique des récepteurs costimulateurs appartenant à la superfamille du récepteur au TNF va recruter des adaptateurs de la famille des TRAFF qui ensuite activeront différentes voies de signalisation (NF- κ B, MAPK, AP1, ERK et NFAT). Au contraire, les molécules de costimulation inhibitrice inhibent la signalisation par le complexe CD3 en recrutant des phosphatases (SHP1, SHP2, PP2A) capables de déphosphoryler différentes protéines (CD3zeta, LAT, ZAP70...) impliquées dans la transduction du signal par le récepteur T [43].



Nature Reviews | Immunology

Schéma 2 : Voies de transductions des signaux de costimulation activateur et inhibiteur, d'après *Chen et Flies Nature Rev immunol 2013* [43]

1.3 Fonction des molécules de costimulation.

D'un rôle de second signal pour l'activation des LT, leur fonction s'est aujourd'hui diversifiée. Ces molécules sont exprimées sur des sous-populations de LT et elles interviennent à différentes étapes de l'activation lymphocytaire. Ainsi, sur les LT naïfs, la molécule CD28 est principalement responsable de l'initiation de la réponse lymphocytaire avec un rôle redondant possible de CD2 et HVEM. La survie et la prolifération des LT mémoires semblent plutôt sous la dépendance des molécules de costimulation de la famille du récepteur au TNF (4-1BB, OX40, CD27...) [49].

ICOS et PD-1 sont exprimés par les LT-CD4 folliculaire dans le centre germinatif et sont importants dans la coopération cellulaire entre les LT-CD4 et les lymphocytes B. En l'absence d'ICOS, il existe un déficit dans la production des immunoglobulines.

Le signal de costimulation va également jouer un rôle dans la polarisation de la réponse lymphocytaire T. Ainsi, les récepteurs appartenant à la famille SLAM, ainsi que TIM1 et TIM4 favorisent une polarisation de type TH2, tandis que d'autres molécules de costimulation souvent appartenant à la famille des récepteurs aux TNF (CD27, HVEM...) orientent vers une réponse TH1.

Ces molécules de costimulation sont également importantes dans la génération et la fonction des LT régulateurs (LTreg). CD28 est nécessaire à la différenciation de ces cellules dans le thymus et à leur persistance en périphérie. Des molécules de costimulation inhibitrices (CTLA-4, Lag3, GITR, HVEM...) sont exprimées par les LTreg et jouent un rôle dans leurs fonctions suppressives [50].

De façon plus générale, les MCI jouent un rôle dans la tolérance et la prévention de maladies auto-immunes. Les MCI sont également surexprimées physiologiquement en réponse à une activation lymphocytaire T aigue et participent à la régulation normale de cette réponse immunitaire. Le blocage de l'interaction de MCI avec leur ligand peut avoir des conséquences délétères dans certaines situations d'infection aigue, comme la grippe [51]. Ces éléments sont à prendre en compte dans l'évaluation du ratio bénéfice/risque de ces thérapies immunomodulatrices.

2/ MCI et épuisement des lymphocytes T

Au cours des infections chroniques, les LT deviennent non fonctionnels, ceci pouvant expliquer l'échappement des virus au système immunitaire. Le groupe de R.Ahmed a montré que dans un modèle d'infection chronique au virus LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), les LT expriment de nombreuses MCI (PD-1, TIM-3, Lag3, 2B4, CD160...) ce qui les rend anergiques à toute stimulation ultérieure. Il semble que l'expression de ces MCI soit la conséquence de l'activation chronique des LT en réponse à un stimulus persistant [52]. Cet état « d'exhaustion » pourrait empêcher la différenciation des lymphocytes effecteurs en lymphocytes mémoires. De façon intéressante, l'inhibition de ces MCI par des anticorps a permis de restaurer l'activité fonctionnelle des LT et de contrôler l'infection virale chronique dans un même modèle [53].

3/ MCI comme cibles thérapeutiques dans le cancer

De façon similaire à ce qui a été observé dans les infections virales chroniques, les LT de patients atteints de différents cancers (mélanome, carcinome bronchique, cancer du sein, lymphome, LLC [54-56]...) expriment préférentiellement des MCI. Ces molécules sont surtout exprimées par les LT infiltrant les tumeurs suggérant un rôle local dans l'inhibition fonctionnelle des LT [57,58]. En effet, l'interaction de ces MCI à la surface des LT avec leurs ligands (PD-1-PDL-1/PDL-2, Tim-3-galectine 9, Lag3-HLA de classe II...) exprimés par les cellules tumorales ou les cellules du stroma inhibe de nombreuses fonctions des LT (...) préalablement activés. L'efficacité du blocage de ces interactions par différents anticorps monoclonaux (anti-CTLA-4, anti-PD1...) a été démontrée dans de nombreux modèles précliniques. L'administration d'anticorps anti-CTLA-4 a permis une amélioration de l'immunité anti-tumorale et conduit à un meilleur contrôle de la croissance tumorale [59]. Des traitements par anticorps anti-PD1 ont entraîné des réponses cliniques objectives chez 20 à 30% de patients atteints de cancer du rein, de cancer du poumon et de mélanome [60]. Il n'existe à ce jour aucun biomarqueur permettant de prédire la réponse à ces traitements.

4/ Signification **clinique de l'expression des MCI** en cancérologie.

La signification clinique de l'expression de ces molécules sur les LT et de leur ligand sur la cellule tumorale pourrait en fait être plus complexe. En effet, de par leur fonction inhibitrice sur les LT, il était attendu que leur expression dans les tumeurs soient associés à un mauvais pronostic. Des premières études ont retrouvé une corrélation entre l'expression de PD-1 et PDL-1 et une évolution clinique défavorable chez des patients atteints de cancers du rein [61]. Néanmoins, ces MCI sont également des marqueurs d'activation et leur l'expression pourrait refléter une activation endogène des LT contre la tumeur. De même, la production d'IFN γ par les LT augmente l'expression de PDL-1 sur les cellules tumorales et serait un marqueur d'activation du système immunitaire dans la tumeur [62]. Il a récemment été montré chez des patients atteints de cancer de l'oropharynx associés aux papillomavirus une forte infiltration intra-tumorale par des LT-PD1. Ces lymphocytes étaient caractérisés par une expression de marqueurs d'activation et une absence d'autres MCI associées à PD1 dans plus de la moitié des cas. Il a été également possible de réactiver ces cellules par un anticorps anti-PD1. Ce phénotype les rapprochait donc plus de LT activés que de LT épuisés. De façon intéressante, une association a été retrouvée entre l'infiltration de ces tumeurs par ces LT-PD1 et un bon pronostic clinique [58].

Ce travail montrait donc que contrairement à l'opinion répandue, l'expression de PD-1 dans une tumeur n'est pas synonyme de la présence de LT épuisés mais peut aussi correspondre à un marqueur d'activation. D'autres travaux ont également retrouvés une association entre l'expression de PD-1 et un bon pronostic clinique chez des patients atteints de lymphome folliculaire ou de cancers colorectaux.

Suite au succès de l'ipilimumab dans le mélanome métastatique, des anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 ont été testé dans le cancer du rein métastatique sans résultat probant [63]. Un essai en association avec le sunitinib a été arrêté précocement en raison d'une toxicité rénale inexpliquée [64]. Contrairement aux anticorps anti-CTLA-4, les anticorps anti-PD1 semblent moins toxiques sur le plan clinique du fait d'une plus grande spécificité tumorale. Des associations entre cet anticorps anti-PD1 et des vaccins thérapeutiques sont en cours de développement dans le carcinome rénal à cellules claires métastatique. La levée de mécanismes de résistance constitue un prérequis important pour le succès de l'immunothérapie. Dans ce contexte, le contrôle de la voie immunologique PD1 semble le plus prometteur. Toutefois la réponse au traitement par anticorps anti-PD1 est inconstante (<30%) est nécessite d'élucider les mécanismes de résistance et de définir des biomarqueurs prédictifs. Si l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales semble être une condition

nécessaire pour observer une réponse au Nivolumab [60], elle n'est pas suffisante et d'autres biomarqueurs sont nécessaires.

Objectif du travail.

L'objectif de ce travail a été d'analyser la co-expression de MCI par les LT infiltrant des tumeurs du rein.

Des travaux s'intéressant au profil d'expression de MCI par des LT du sang périphérique de patients atteints de cancers ont été réalisés antérieurement [65]. Cependant, ceci n'a pas été réalisé sur l'infiltrat tumoral. Or, il existe une expression différentielle de ces molécules dans le sang et le microenvironnement des tumeurs [57].

L'une des hypothèses est que le profil d'expression de ces molécules de façon isolée ou co-exprimée avec d'autres MCI pourrait changer leur signification pronostique.

Nous avons ensuite essayé de comprendre la régulation de la co-expression de ces molécules et corrélérer cette expression à différents paramètres cliniques des patients.

Les patients atteints de cancer du rein ont été sélectionnés dans cette étude car des travaux préliminaires ont montré une expression de certaines de ces molécules de costimulation inhibitrices (PD-1, PDL-1, Lag3...) dans ces tumeurs [61,64, 67]. Par ailleurs, de nombreux essais cliniques sont actuellement développés évaluant l'efficacité d'anticorps dirigés contre PD-1 et CTLA-4 avec des résultats très prometteurs notamment avec l'utilisation de l'anticorps anti-PD1 où des taux de réponse de 27% ont été rapportés chez des patients atteints de cancers du rein métastatique [60]. Un profil du répertoire de molécules de costimulation inhibitrices de ces patients pourrait aider à identifier de nouveaux biomarqueurs de réponse à ces traitements.

Limites de l'étude : La description l'infiltrat immunitaire n'est pas exhaustive nous aurions pu caractériser différentes populations lymphocytaires T ; dont les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes Th17, ainsi que les cellules immunosuppressives myéloïdes (MDSC). Nous avons choisi de nous limiter dans un esprit pragmatique aux MCI les plus étudiées qui constituent les cibles d'anticorps thérapeutiques en cours de développement.

MATERIEL ET METHODES

Direction et réalisation de l'étude : Ce travail a été dirigé en collaboration par les professeurs Claude Linassier, Eric Tartour et Stéphane Oudard. J'ai réalisé ce travail dans le laboratoire INSERM U970 à l'Hôpital Européen Georges Pompidou ainsi que dans le service d'immunologie biologique et d'anatomie pathologique de l'HEGP, en grande partie dans le cadre du master 2 d'immunologie. J'ai réalisé personnellement toutes les expérimentations décrites ultérieurement, avec la collaboration technique d'Alain Gey (ingénieur de recherche en immunologie biologique) et les conseils des professeurs Eric Tartour et Cécile Badoual.

1/ Patients

Nous avons réalisé une étude prospective portant sur 50 tumeurs du rein de patients opérés à l'HEGP et à l'Hôpital Cochin, en accord avec le CPP Ile-de-France 10 (Avis 2012-05-04). Le recueil du consentement éclairé des patients a été réalisé préalablement à l'inclusion. Les analyses ont été réalisées sur des tumeurs fraîches après une analyse anatomo-pathologique extemporanée. Les caractéristiques des patients ont été recueillies et sont incluses dans le tableau 2. Les caractéristiques des tumeurs retenues ont été : l'histologie, le grade et le stade TNM. L'histologie la plus fréquente des tumeurs malignes du rein est le carcinome rénal à cellules claires (80%) suivie par le carcinome tubulo-papillaire de type 1 et de type 2 (10%) et d'autres types histologiques plus rares (carcinome chromophile, carcinome médullaire kystique, néphroblastome et sarcomes). Il existe également des métastases rénales de tumeurs d'origines diverses (adénocarcinome lieberkuhnien colo-rectal par exemple). Les tumeurs bénignes du rein les plus fréquemment rencontrées sont l'oncocytome et l'angiomyolipome dont il n'est pas toujours possible d'établir un diagnostic formel en préopératoire. Le grade histologique est applicable aux tumeurs malignes, il est établi selon le nombre de mitoses, le pourcentage de nécrose et le degré de différenciation cellulaire tumorale. Le stade TNM (selon la classification TNM 2009) représente la taille de la tumeur : T, l'envahissement ganglionnaire : N et la dissémination métastatique : M.

Tableau 2 : caractéristiques des patients et des tumeurs étudiées.

CRCC : carcinome rénal à cellules claires, CP : carcinome tubulo-papillaire, Fürhman : grade histologique de Fürhman (concerne seulement le CRCC) stade TNM (T : extension de la tumeur primitive, N : envahissement ganglionnaire, M : métastases), NA : non applicable.

Patient	Histologie	taille en mm	Grade	stade TNM	sexe	Age
1	CRCC	40	II	pT1a	F	28
2	CRCC	100	III	pT3a	H	56
3	CRCC	25	II	pT1a	F	53
4	CP1	50	NA	pT1b	H	64
5	CRCC	30	III	pT1a	H	61
6	CRCC	90	III	pT3b	H	56
7	Chromophobe	45	NA	pT1b	H	62
8	CRCC	35	II	pT1a	F	47
9	CRCC	30	II	pT1a	H	38
10	Carcinome médullaire kystique	40	NA	pT1b	H	61
11	CRCC	20	II	pT1a	H	43
12	CRCC	35	II-III	pT1a	H	54
13	CRCC	65	III-IV	pT4	H	65
14	adénok lieberkuhnien	55	NA	pT3N1	F	86
15	CRCC	25	III	pT1	F	78
16	CRCC	40	II	pT2	H	39
17	Oncocytome	50	NA	NA	F	64
18	chromophobe/oncocytome	30	NA	pT1	H	25
19	CRCC	62	II	pT3a	H	84
20	Oncytome	78	NA	NA	H	70
21	Angiomyolipome	90	NA	NA	F	55
22	CRCC/composante sarcomatoïde et rhabdoïde	110	IV	pT3a	H	63
23	CRCC	60	III-IV	pT3a	H	73
24	CRCC	75	III-IV	pT3a	F	49
25	CRCC multifocal	45	III	pT1b	H	29
26	chromophobe/oncocytome	60	NA	pT3a	F	42
27	tubulo-papillaire non1/non2	115	IV	pT3a	F	51
28	CRCC	53	III	pT3a	H	88
29	Liposarcome différencié	150	NA	NA	F	70
30	CRCC	30	II	pT1	F	75
31	CRCC	90	IV	pT3N2M1	H	40
32	CRCC	42	III	pT1b	F	79
33	CRCC	72	II	pT2a	F	89
34	CRCC	45	IV	pT3a	F	78
35	Chromophobe	55	NA	pT1b	H	54
36	carcinome tubulo-mucineux à cellules fusiformes	30	II	pT1a	F	46
37	Angiomyolipome	40	NA	NA	F	65
38	Néphroblastome blastemateux	25	NA	pT3a	H	22
39	CRCC	80	II-III	pT3a	H	54
40	CP1	70	I-II	pT3a	F	56
41	CRCC	65	II-III	pT2	H	78
42	CRCC	55	II	pT3a	F	37
43	CRCC	75	II	pT2a	H	51
44	CRCC	80	II	pT3apN2	F	60
45	Chromophobe	40	NA	pT1b	H	54
46	CP1	45	III	pT1b	H	63
47	CP2	80	III	pT2a	H	70
48	CRCC	60	IV	pT3a	H	34
49	CP 1-2	60	IV	pT3a	F	65
50	Oncocytome/ Biopsie TDM	30	NA	NI	H	62

2/ Dissociation et isolement des lymphocytes infiltrant les tumeurs (T.I.L)

Nous avons réalisé une dissociation mécanique au bistouri suivie d'une digestion enzymatique par 50mg de collagénase D (Roche 11-088-866-001) et 1mg de DNase I (Roche 11284932001) dans 50ml de PBS 1X pendant 90 minutes. La réaction a été arrêtée par addition d' EDTA (SIGMA) à 2mM pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite filtrées (filtration à 70µm sur cell stainer (BD Falcon 352350)) pour éliminer les débris.

3/ Analyse phénotypique par cytométrie en flux

Les cellules isolées ont été marquées avec un marqueur de viabilité (Dye EF450) puis par des anticorps couplés directement à des fluorochromes pour la détection de différents marqueurs membranaires (CD3, CD4, CD8, PD1, LAG3 et Tim3, CTLA-4). Pour certains patients, un marquage intracytoplasmique pour la détection de CTLA-4 a été réalisé en utilisant une trousse de perméabilisation membranaire (BD Pharmingen 819008102). La liste des anticorps utilisés est donnée dans le tableau 3.

Des isotypes contrôles ont été utilisés dans chaque expérience et une matrice de compensation réalisée pour l'analyse phénotypique multiparamétrique.

Les échantillons marqués ont été analysés sur un cytomètre Navios (Beckman Coulter 10 couleurs) avec une acquisition sélective des cellules CD3 positives d'un minimum de 100.000 évènements par tube. Les données acquises ont ensuite été analysées sur le logiciel Kaluza.

Tableau 3 : anticorps utilisés pour l'analyse phénotypique par cytométrie

	Clone	Fournisseur
Anti-CD3-Krome Orange	UCHT1	PNB00068 Beckman Coulter
Anti-CD4-PECF594	SFC112T4D11	737660 Beckman Coulter
Anti-CD8-PC7	RPA-T8	562282 Becton Dickinson
Anti-PD1-APC	MIH-4	558694 Becton Dickinson
Anti-LAG3-FITC	Polyclonal	FAB2319F R&D
Anti-Tim3-PE	F38-2E2	345006 R&D
Anti-CTLA-4-PE	L3D10	349906 Biolegend
Anti-Ki67-FITC	B56	51-36524X Becton Dickinson

4/ Cinétique d'expression des molécules de costimulation inhibitrice après activation in vitro des lymphocytes T sanguins.

Des cellules mononucléées ont été isolées par gradient de densité (Ficoll) à partir de sang de donneurs sains, fournis par l'Etablissement Français du Sang de l'HEGP. Ces cellules ont été mises en culture à raison de 10^6 lymphocytes/ml et stimulées sous deux conditions différentes : l'une par de l'IL-2 (1000 UI/ml Proleukine Novartis, condition récepteur T indépendante) et l'autre par des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (T-cell activation kit human, Miltenyi biotech). Les cellules ont été ensuite recueillies à différents temps (24h, 48h, 72h) et marquées par cytométrie comme décrit précédemment pour l'analyse phénotypique des T.I.L.

5/ Analyse de l'expression de PD-1-Tim-3 par immunofluorescence *in situ*

La mise au point des marquages a été réalisée sur des coupes d'amygdales humaines congelées et les marquages ont ensuite été appliqués sur coupes de tumeurs rénales humaines congelées, issues de la même série de tumeurs précédemment analysées par cytométrie. L'échantillon a été fixé dans l'acétone pendant 10 minutes, sous hotte à flux, suivi d'un lavage en PBS 1X 10 minutes. Il a été traité à l'avidine pendant 10 minutes puis à la biotine pendant 10 minutes (Blocking kit avidin/biotin Vector laboratories : 4 gouttes pour 1ml de PBS 1X), suivi d'un lavage en PBS 1X 10 minutes. Afin d'inhiber les peroxydases endogènes et une liaison non spécifique de l'anticorps par les récepteurs Fc, les coupes sont ensuite traitées par de l' H_2O_2 (H_2O_2 Cooper à 3%) pendant 15 minutes suivi d'un lavage en PBS 1X 10 minutes puis saturées par une solution de sérum AB à 5% pendant 30 minutes. Ensuite elles sont marquées les anticorps primaire anti-PD-1 et anti-Tim3 et révélées par des anticorps directement couplés à un fluorochrome ou couplée à la biotine et secondaire révélé par de la streptavidine-couplée à un fluorochrome. Le protocole de marquage est détaillé dans le tableau 4. Les coupes sont lavées par du PBS pendant 10 minutes entre chaque étape et fixées après la dernière étape par une colle anti-fading (FP-483331 Interchim) pour limiter l'extinction de fluorescence. Les lames sont ensuite lues sur un microscope à fluorescence (Leica Microsystems DMR) au grossissement X40. Afin de mettre en évidence la présence d'une co-expression de PD-1 et de Tim3, environ 100 cellules ayant un marquage PD1 significatif ont été comptées et il a été énuméré le pourcentage de cellules également marquées pour Tim3.

Tableau 4 : Anticorps utilisés en IF sur lame

Anti-PD1 (ref: Abcam 5252587, mouse anti-human) 2µg/ml)	Ac secondaire: Biotinylé Donkey anti-Mouse (ref: Jackson Immuno Research 715-066-150) (1µg/ml)	Streptavidin-Cyan2 (: Jackson Immuno Research 016-220-084) (3µg/ml)
Isotype IgG1 Mouse (ref: Dako X0931) (2µg/ml)		
Anti-Tim3 (ref: R&D AF2365, goat anti-human) (1µg/ml)	Donkey anti-Goat Cyan3 (ref: Jackson Immuno Research 705-165-147) (2µg/ml)	
Isotype IgG1 Goat (ref: sigma 15256) (1µg/ml)		

6/ Etude fonctionnelle des TILs selon leur profil de co-expression de PD-1 et Tim3 :

Les TIL ont d'abord été phénotypés par cytométrie pour l'expression de PD-1 et Tim3 puis triés par un FACS-ARIA en trois sous-populations cellules : (1) PD1⁺Tim3⁺, (2) PD1⁺Tim3⁻, (3) PD1⁻. Les cellules triées ont ensuite été activées pendant 24h dans du milieu AIM V (Gibco 12055-091) avec un anticorps anti-CD3 ou de l'IL2 ; un échantillon dans du milieu sans activateur a servi de contrôle. Le surnageant a été recueilli à 24 heures et un Elisa pour la détection d'IFN γ (IFN- γ Eli-pair 851.560.010) a été réalisé.

7/ Etude rétrospective pronostique sur cohortes de CRCC localisés et métastatique

Les objectifs sont de définir le caractère pronostique du statut MCI de CRCC localisés, sa corrélation aux autres facteurs pronostiques connus ou son indépendance vis-à-vis de ces facteurs ainsi que sa pertinence pratique dans l'objectif de définir de nouveaux critères de risque en vue d'essai adjuvant de traitement immunomodulateur.

Matériel : Nous analyserons 117 cas de carcinome rénal à cellules claires localisés (pT1 à pT3) opérés à l'Hôpital Necker et l'Hôpital Européen Georges Pompidou entre 2001 et 2007, dont nous disposons de tissu tumoral congelé de bonne qualité associé à une autorisation d'utilisation à des fins de recherche par avis favorable du CPP.

Les MCI surexprimées dans le CRCC sont PD1 et Tim3, comme nous l'avons montré dans la première partie du projet. L'analyse se focalisera donc sur ces deux marqueurs associée au marquage des lymphocytes T par un anticorps anti-CD3. Nous ferons réaliser une coupe au cryostat de 10 lames par échantillon. Nous marquerons ensuite par des anticorps secondairement couplés à des fluorochromes selon le protocole d'immunofluorescence in situ mis au point dans la première partie (p23 et tableau 3). Puis nous analyserons les lames au microscope à fluorescence : avec vérification morphologique du tissu tumorale sur lame HES, puis quantification de l'infiltrat CD3+, quantification des LT PD1+ et enfin des lymphocytes T doubles marqués PD1+-Tim3+.

L'analyse des données cliniques comprenant : histologie, TNM, grade de Furhman, âge et sexe sera effectuée en parallèle pour les tumeurs localisées.

Nous procéderons de même pour une cohorte de CRCC métastatiques, en ajoutant une analyse des données pronostiques du MSKCC et de Heng comprenant (Karnofsky, nombre de sites métastatiques, délai entre le diagnostic et le traitement, Ca2+c, Hémoglobine, polynucléaires neutrophiles, plaquettes, LDH). Le recueil des évènements : rechute et décès sera réalisé dans un deuxième temps, indépendamment du marquage.

Les résultats de cette deuxième partie du projet ne sont pas encore disponibles.

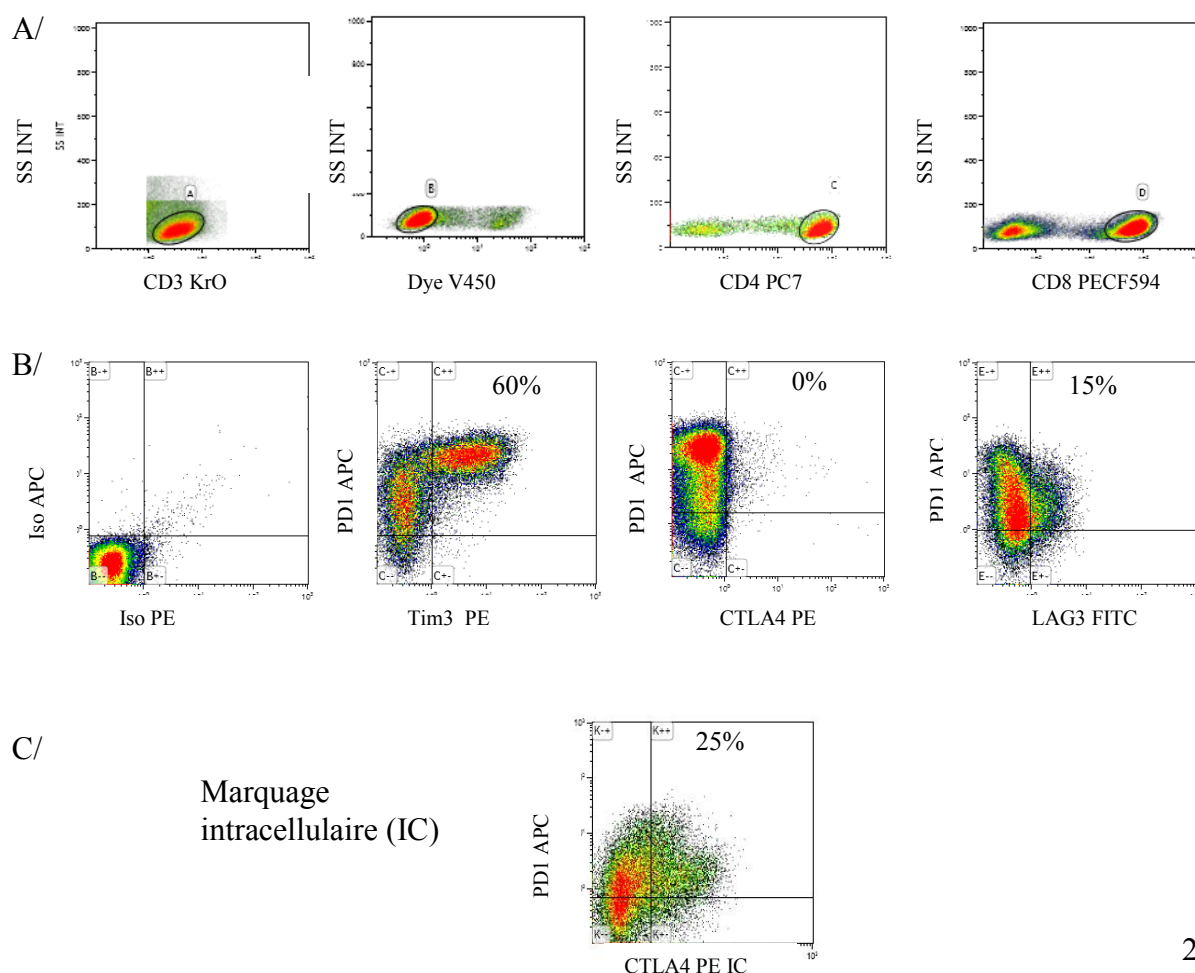
RESULTATS

1/ Profil d'expression des MCI sur les TIL dérivés de tumeurs du rein

L'analyse par cytométrie en flux de l'expression des MCI PD1 (CD279), CTLA-4 (CD152) membranaire, LAG-3 (CD223) et Tim3 a été réalisée dans un premier temps sur les TIL extraits de dix tumeurs du rein. En raison d'une absence d'expression du CTLA-4 membranaire, nous avons modifié le marquage CTLA-4 en réalisant un marquage intracellulaire après perméabilisation sur les TIL extraits de dix autres tumeurs. Une dernière série de vingt-neuf tumeurs du rein a été analysée avec un marquage simplifié limité à CD3, PD1 et Tim3. La stratégie de « gating » utilisée est représentée figure 1.

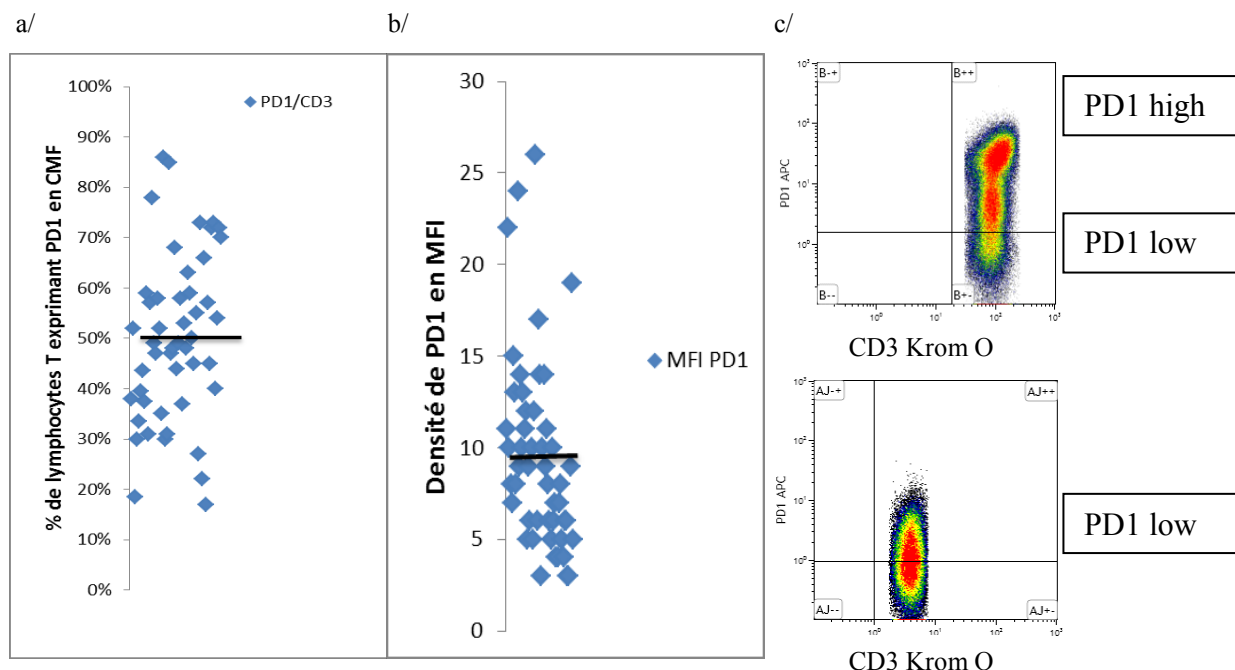
Figure 1 : Exemple d'analyse phénotypique de molécules de costimulation inhibitrices

(MCI) sur les lymphocytes T infiltrant les tumeurs du rein (T.I.L). A/ Stratégie de gating : acquisition sélective des lymphocytes T- $CD3^{+}$, sélection des lymphocytes T vivants par élimination des cellules marquées au DyeV450, sélection des populations de LT-CD4 ou LT-CD8. B/ Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps anti-PD1, anti-Lag3, anti-Tim-3 et anti-CTLA-4 directement couplés à des fluorochromes puis analysées sur un cytomètre. La co-expression des MCI avec PD-1 est montrée. C/ Les cellules sont perméabilisées comme décrit dans le matériel et méthode avant l'addition de l'anticorps anti-CTLA-4.



L'analyse des premiers échantillons a montré une forte expression de PD1 par les lymphocytes T extraits de tumeur du rein. Sur la série de 49 échantillons de TIL, nous avons montré que PD1 est exprimé sur tous les échantillons analysés, bien qu'à des niveaux variables. La moyenne d'expression de PD-1 sur les lymphocytes T est de 50% (SD :0,17). La densité moyenne de l'expression de PD1 sur les LT exprimée en MFI (Mean Fluorescence Intensity) est de 9,5. Dans la littérature, il avait été rapporté un niveau d'expression de PD1^{hi} et ^{low} distinguant nettement deux populations de cellules exprimant cette molécule. Dans notre série de patients, au sein d'un même échantillon, seuls trois patients présentaient réellement deux populations de lymphocytes T pouvant être séparées selon leur niveau d'expression de PD-1 (figure 2), les autres présentant une population LT PD1⁺ avec une densité de PD1 plus homogène faible ou intermédiaire.

Figure 2 : Expression de PD1 sur les TIL des 49 échantillons analysés. a/ Expression en pourcentage de lymphocytes T positifs pour PD1 en CMF,. La barre correspond à la moyenne d'expression b/ Intensité de l'expression de PD1 exprimée en MFI : la barre correspond à la moyenne de niveau d'expression de PD1.c/ Exemples de profil PD1 high (MFI PD1 à 23) avec 2 populations PD1⁺ distinctes high et low et profil PD1 low (MFI PD1 à 5).



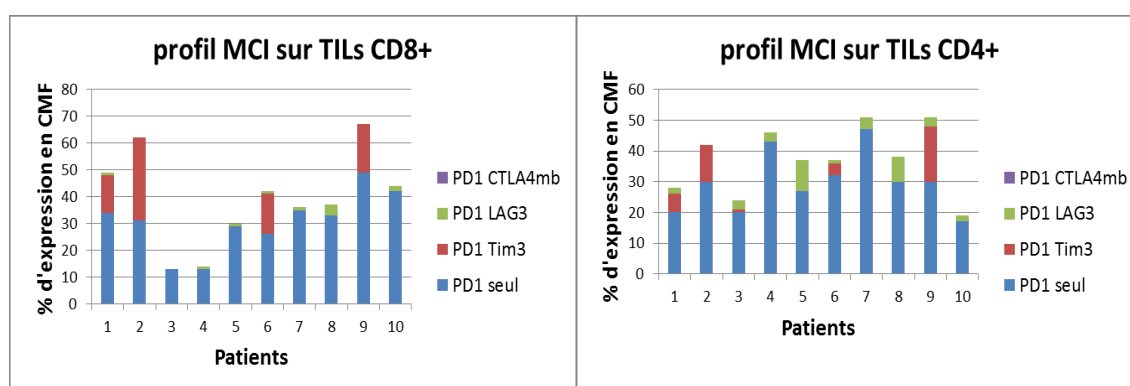
L'expression de PD1 est comparable entre les populations TIL individualisant CD4 et CD8 : 42 % (SD : 0.20) des CD4⁺ et 48 % (SD : 0.21) des LT CD8⁺ expriment PD1 (n=20, p-value=, t-test). L'expression des autres MCI (CTLA-4, Tim3 et LAG-3) est liée à l'expression de PD1 : elle est systématiquement inférieure à 1% sur les TIL qui n'expriment pas PD1. Sur une première série de 10 cas, nous avons mis en évidence une co-expression significative de PD1 et de Tim3. Ainsi, la moyenne d'expression de Tim3 sur les lymphocytes T-PD1⁺ est de 12% [0% à 40%, SD : 0,18] ; cette expression est plus importante sur les LT-CD8⁺PD1⁺ avec une moyenne de 15% contre 9% sur les LT CD4⁺PD1⁺ (Fig 3a). Nous avons observé une plus faible co-expression de PD-1 et de LAG-3. Ainsi, la moyenne d'expression de LAG3 sur les lymphocytes T PD1⁺ est de 7% [0% à 15%] et LAG3 prédomine sur les LT CD4⁺PD1⁺ avec une moyenne de 10% contre seulement 4% pour les LT CD8⁺PD1⁺ (Fig 3a). Nous n'avons pas observé d'expression membranaire de CTLA-4 dans cette série (figure 3a). Nous avons poursuivi l'analyse sur une deuxième série de 10 cas en réalisant un marquage intracellulaire de CTLA-4 qui a permis de détecter cette molécule sur certains échantillons de TIL (Fig 3b). Ainsi, la moyenne d'expression de CTLA-4 dans les LT PD1⁺ est de 13% avec une prédominance dans les LT CD4⁺PD1⁺. En effet, l'expression moyenne dans ces cellules est de 22% [0 à 51%] contre seulement 8% dans les LT CD8⁺PD1⁺ (figure 3b).

L'analyse des 20 tumeurs étudiées pour le profil complet de MCI a montré une co-expression de PD1, Tim3 et LAG3 non significative, en moyenne à 1% [0 à 15%] avec un seul échantillon retrouvant cette triple expression à un niveau significatif de 15% des LT PD1⁺ (20% des LT CD8⁺PD1⁺ et 8% des LT CD4⁺PD1⁺). Il n'a pas été réalisé de triple marquage de MCI avec CTLA-4. PD1 est la MCI pivotale exprimée par les TIL, la co-expression ou non de Tim3 ou de CTLA-4, définissent des sous-populations de TIL distinctes dont nous préciserons les caractéristiques.

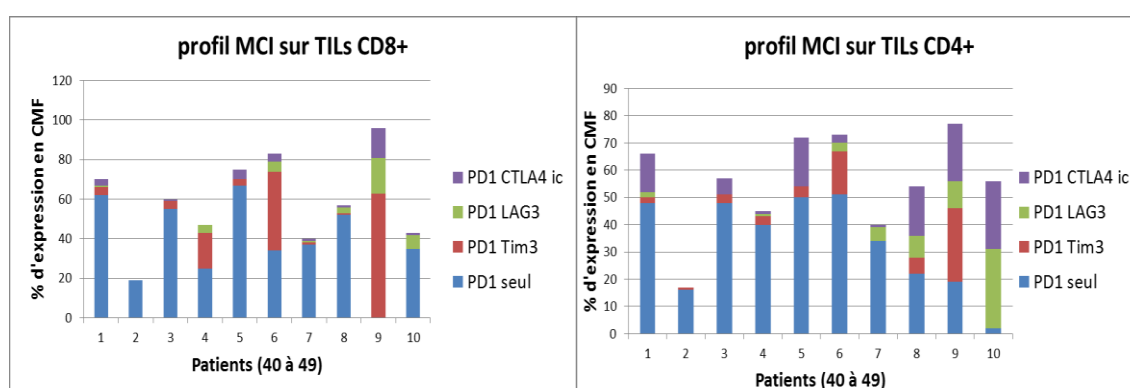
Figure 3 : Profil de co-expression des MCI sur 10 échantillons de TIL extraits de tumeurs du rein de patients opérés.

a) Les TIL ont été marqués à l'aide d'anticorps anti-PD-1, TIM-3, CTLA-4, Lag3 directement couplés à des fluorochromes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de LT-CD4 (Droite) ou LT-CD8 (Gauche) exprimant PD-1 seul ou coexprimé avec différents MCI b) Les TIL ont été perméabilisés avant l'addition de l'anticorps anti-CTLA-4. L'expression de Tim3, LAG3 ou CTLA4 sur les lymphocytes n'exprimant pas PD1 est < 1%.

a/



b/



2/ Induction des MCI après activation des lymphocytes T via leur récepteur :

Les MCI étant induites après activation des lymphocytes T, nous avons voulu évaluer leur cinétique d'expression et leur profil de co-expression par les lymphocytes T pour la comparer à nos résultats obtenus sur les TIL.

Nous avons d'abord confirmé que les MCI sont bien inductibles après stimulation dépendante du récepteur des lymphocytes T. Nous retrouvons un niveau basal très faible d'expression des

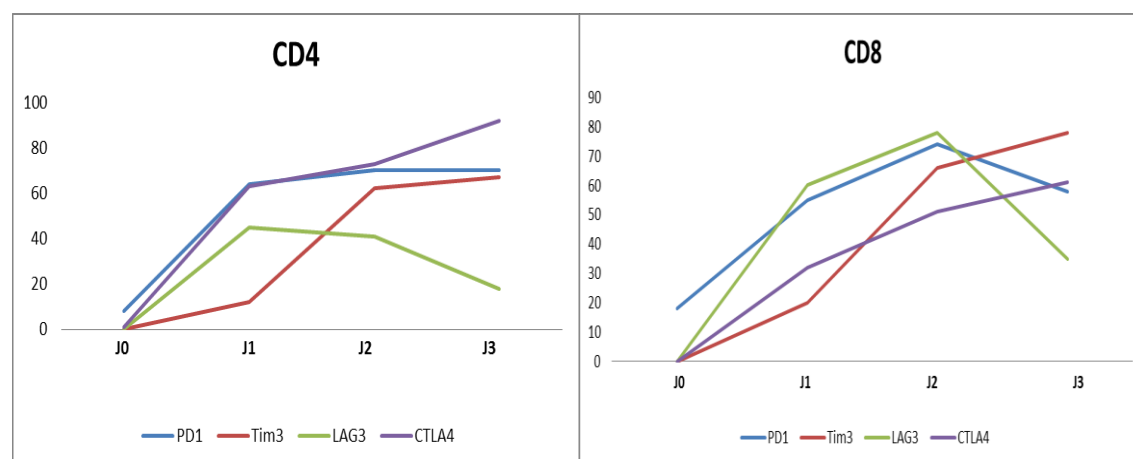
MCI sur les lymphocytes T issus du sang de donneurs sains. LAG3 a une expression précoce prédominant sur les LT CD8 et diminue dès J2. L'expression de PD1 augmente dès 24h après stimulation et atteint un plateau à J2. Le CTLA4 augmente plus progressivement avec un niveau d'expression maximal à J3 et prédomine sur les LT CD4. Tim3 augmente plus tardivement et plus progressivement avec un niveau d'expression maximal à J3 également réparti sur les LT-CD4 et CD8.

A la différence de l'expression dans les TIL, où Tim-3, CTLA-4 et Lag3 ne sont détectées que sur les cellules PD-1 positives, certaines MCI peuvent être détectées sur les lymphocytes T en absence de PD-1. Ainsi l'expression sur les lymphocytes T PD1 négatifs après 48h de stimulation est retrouvée pour Tim3 sur 50% des $CD8^+PD1^-$, LAG3 sur 20% et CTLA-4 sur 50% des $LT-CD4^+PD1^-$. La forte expression à la phase aigüe de l'activation lymphocytaire T des MCI étudiées sur les TIL plaide en faveur de leur rôle dans la régulation physiologique de cette activation, en particulier pour LAG3 pour les CD8 et CTLA-4 pour les CD4. La caractéristique de cette activation aigüe comparée à la situation de stimulation chronique dans laquelle sont placés les TIL est le rôle pivot que semble jouer LAG3 et CTLA-4 dans la régulation de l'activation lymphocytaire T à la phase aigüe et une moindre dépendance des autres MCI vis-à-vis de à PD1.

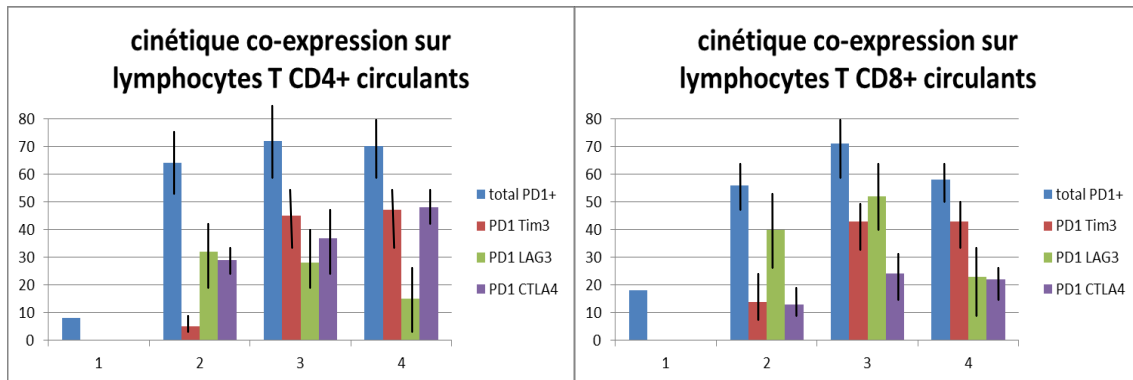
Figure 4 : Cinétique de l'expression des MCI après activation de lymphocytes T du sang.

Des cellules mononucléées du sang périphérique sont stimulées par des billes anti-CD3 et anti-CD28 et une analyse phénotypique de l'induction de MCI est réalisée par cytométrie à différents temps (24h, 48h et 72h). a) Pour chaque molécule de costimulation le pourcentage d'expression est rapporté par rapport aux LT-CD4 (Gauche) ou aux LT-CD8 (Droite). Les résultats montrés correspondent à la moyenne obtenue pour deux donneurs b/ La cinétique de co-expression de MCI (Tim-3, CTLA-4 intracellulaire, Lag3) associée à PD1 est montrée, le trait noir représente l'écart-type entre les deux échantillons.

a/



b/



3/ Co-expression PD1-Tim3 sur les TIL :

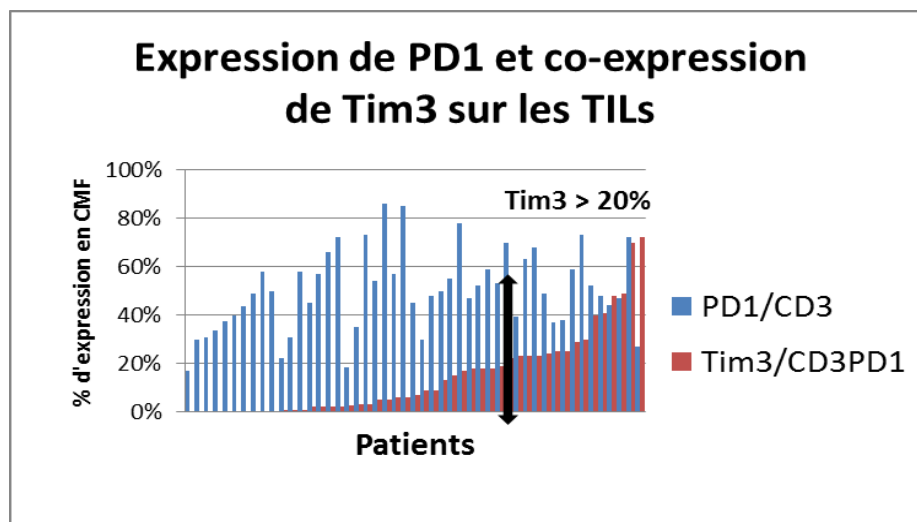
Tim3 étant la MCI la plus fréquemment retrouvée en association à PD1, nous nous sommes focalisés sur cette co-expression PD1-Tim3 qui a été analysée sur un total de 49 échantillons de TIL. Pour la co-expression de Tim3 nous avons retenu un seuil de positivité à 20% de lymphocytes T PD1⁺ positifs pour Tim3, retrouvant ainsi 15 échantillons positifs sur 49 (30% des cas). Cette co-expression est relativement spécifique des tumeurs du rein de type CRCC (45% (13/29) des CRCC contre seulement 10% (2/20) des non-CRCC). Il existe ainsi chez les patients atteints de cancers du rein, deux profils de TIL identifiés sur l'expression de PD1 seule ou associée à Tim-3. Afin de valider cette expression isolée de PD-1 dans une sous population de TIL, une expression de Lag3 et de CTLA-4 devrait être réalisée sur cette série de TIL. Néanmoins, dans la série précédente, parmi les TIL PD1⁺-Tim3⁻ (< 20%) seul un échantillon exprimait Lag3 à un niveau significatif (> 20%). La co-expression CTLA-4 - Tim3 n'a pas été étudiée sur les mêmes cellules mais des échantillons de TIL expriment CTLA4 et Tim3 à un niveau significatif et d'autres échantillons expriment seulement CTLA-4 (cf figure 2b). La population PD1⁺Tim3⁻ (PD1 seul) est possiblement à scinder en PD1-CTLA-4⁺ et PD1-CTLA-4⁻.

Figure 5 :

a/Analyse de la co-expression de PD1-Tim3 sur les TIL de rein et signification clinique.

Expression de PD1 (en % des lymphocytes CD3⁺) et de Tim3 (en % des lymphocytes CD3⁺PD1⁺) sur les 49 échantillons de TIL analysés. b/ corrélation clinico-biologique des statuts Tim3 faible et Tim3 fort.

a/



b/

Profil PD1-Tim3	RCC	RCC PD1/Tim3 faible	RCC PD1/Tim3 fort
Age	57.9	62.4	52.4
Sexe ratio h/f	1.6	1.3	2.3
Taille tumeur (en mm)	56	48	67
Grade Furhman	2 à 3	2 à 3	3

Nous avons voulu valider ce profil d'expression par une autre technique : l'immunofluorescence *in situ*.

Les techniques d'immunofluorescence *in situ* sont plus limitées en terme de nombre de paramètres. Afin de se limiter à des doubles marquages par immunofluorescence, nous avons préalablement montré sur un échantillon de TIL que les cellules exprimant PD-1⁺ sont essentiellement des cellules hématopoïétiques CD45⁺ (Figure 6). Parmi ces cellules CD45⁺, plus de 90% des cellules exprimant PD-1 sont des lymphocytes T (figure 6) ce qui nous permet de nous affranchir d'un triple marquage en IF sur lame associant CD3 à PD1 et Tim3. En effet, même si Tim-3 peut être exprimée sur d'autres cellules que les lymphocytes T, notamment les macrophages et les CPA, sa co-expression avec PD-1, l'associe aux

lymphocytes T. Nous avons donc évalué la coexpression de PD-1-Tim3 par un double marquage en immunofluorescence.

Figure 6 : Marquage des cellules extraites de tumeur du rein montrant une spécificité de PD1 pour les lymphocytes T : L'infiltrat tumoral en cellules CD45⁺ est composé de 90% de lymphocytes T et les cellules CD45⁺PD1⁺ sont des lymphocytes T à 95%.

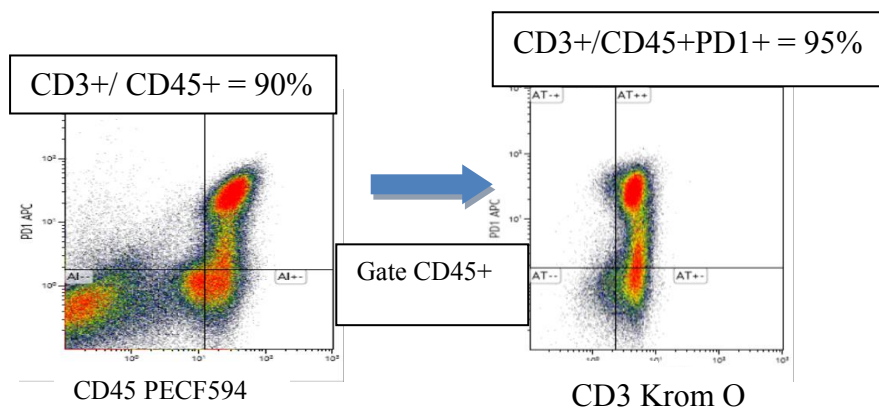
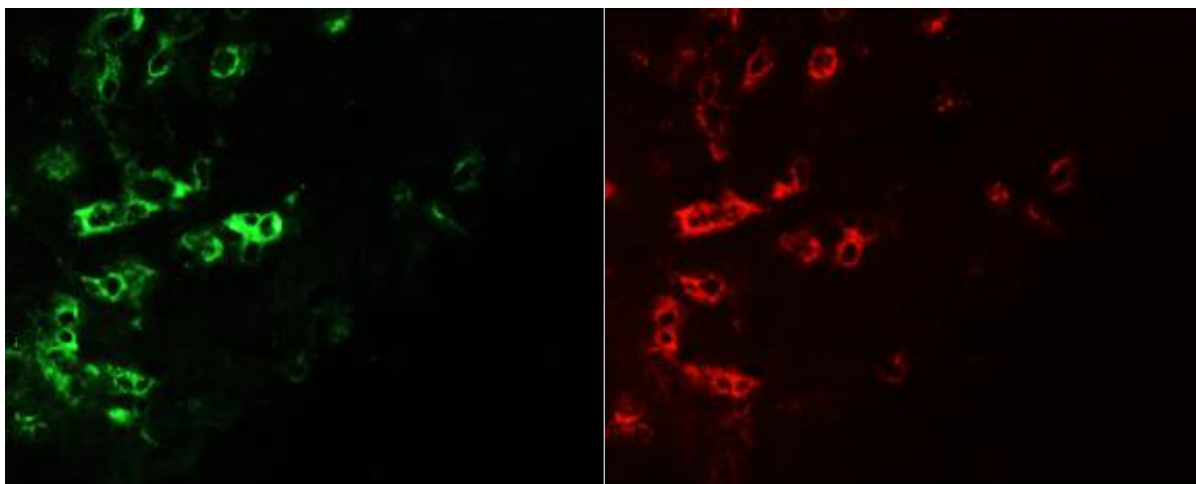


Figure 7 : Co-expression PD1-Tim3 en immunofluorescence à partir de coupes de tissus de cancer du rein ; PD1 marqué en vert (Cyan2) et Tim3 en rouge (Cyan3).



Le protocole d'IF *in situ* a été validé par l'absence de détection d'un marquage significatif du contrôle isotypique.

Parmi les tumeurs co-exprimant faiblement PD-1-Tim-3 par cytométrie en flux (CMF) (n=5), i.e. les tumeurs pour lesquelles le pourcentage de TIL PD1+Tim3+ est inférieur à xxx %, nous avons retrouvé par IF in situ (avec une double lecture en aveugle) des valeurs proches à celles de la CMF (avec une différence inférieure à 10%) pour trois des tumeurs analysées (13D0142, 12H975, 12D1211); pour deux autres (12D1285, 12D1419), la différence était de 18 et 20% supérieure par IF in situ.

Parmi les tumeurs co-exprimant fortement PD-1-Tim-3 par CMF (n = 6), nous avons retrouvé, après double lecture à l'aveugle, une variation inférieure à 10% du pourcentage de cellules doublement marquées PD1-Tim3 pour cinq des tumeurs analysées (12H1002, 12D1506, 12H398, 12D1372, 12D1402) et un marquage surévalué de 21% par l'IF in situ pour une tumeur (12D1178).

Notons que pour un type histologique particulier, le carcinome chromophile, il y avait absence de comarquage PD1-Tim3 tant en CMF et qu'en IF pour les 4 tumeurs étudiées (12D1313, 12D1415, 13D280, 12H282); cependant l'infiltrat lymphocytaire est très faible dans ce type histologique, avec une moyenne de seulement 5 LT par champ pour les chromophiles contre une moyenne de 50 LT par champ pour les CRCC, ce qui rend la lecture par IF laborieuse et hasardeuse. Ces résultats confortent les conclusions antérieures et permettent de visualiser la distribution des TIL PD1-Tim3 au sein de la tumeur confirmant qu'il s'agit bien d'un infiltrat et non d'une population lymphocytaire intravasculaire. De plus, ils nous permettront d'appliquer cette technique à une série de CRCC issus de tumorothèque pour une analyse rétrospective, non réalisable en CMF.

Tableau 5: Analyse du marquage par immunofluorescence sur lame de tissu congelé de l'expression de PD1 et de la co-expression de Tim3 sur les TIL de 17 tumeurs du rein (anticorps utilisés : tableau 3). (17 cas compris dans le tableau, 3 pour lesquels il n'est pas applicable). Critère de positivité en CMF et en IF : pourcentage de cellules Tim3⁺ >20% parmi les LT PD1⁺.

	PD1 ⁺ Tim3 ⁺ en CMF	PD1 ⁺ Tim3 ⁻ en CMF
PD1 ⁺ Tim3 ⁻ en IF in situ	1	7
PD1 ⁺ Tim3 ⁺ en IF in situ	7	2

4/ Analyse fonctionnelle des TIL :

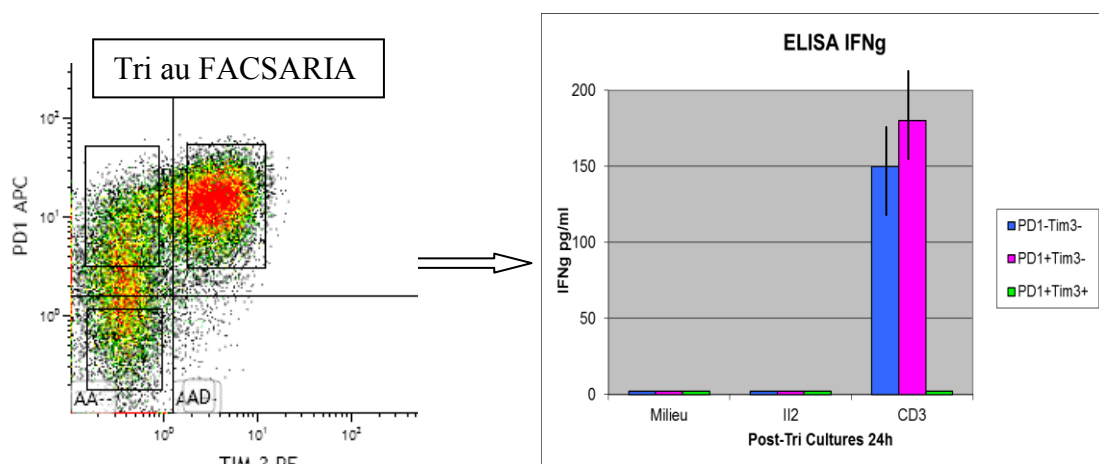
Afin de déterminer s'il existe des différences fonctionnelles entre les TIL PD1+Tim3- et PD1+Tim3+, nous avons réalisé trié ces 2 populations à partir d'un échantillon de TIL présentant une forte expression de PD1 et de Tim3, puis stimulé les sous-populations ainsi obtenues par un anticorps anti-CD3. Le niveau de sécrétion d'IFN γ a ensuite été déterminé sur le surnageant de culture, 24h post-stimulation.

les TIL PD1- ([IFN γ] = 150 pg/ml) et les TIL PD1+Tim3- ([IFN γ] = 175 pg/ml) secrétaient des quantités d'IFN comparable (150pg/mL et 175 pg/mL respectivement). A l'inverse, la sécrétion d'IFN γ était indétectable pour les TIL PD1+Tim+ ([IFN γ] <5pg/ml) en réponse à cette stimulation dépendante du TCR.

Ce résultat, à confirmer, montre que les LT PD1⁺Tim3⁺ ont un profil d'exhaustion que n'ont pas les LT PD1⁺Tim3⁻, cette co-expression de PD-1 et Tim3 semble donc être un marqueur de perte de fonctionnalité des TIL.

Figure 8 : Analyse fonctionnelle des populations de TIL en fonction de leur expression de PD1 et Tim3.

Des TIL ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD3, anti-PD1 et anti-Tim3 puis triés en 3 sous populations : CD3⁺PD1⁻, CD3⁺PD1⁺Tim3⁻ et CD3⁺PD1⁺Tim3⁺. Les cellules triées ont ensuite été incubées avec du milieu seul ou avec de l'IL-2 (1000UI/ml) ou des billes anti-CD3. Vingt-quatre heures après la stimulation, le surnageant a été recueilli et l'IFN γ dosé par Elisa. A noter que tous les échantillons de TIL expriment PD-1 mais au sein d'un échantillon certaines cellules n'expriment pas PD-1 nous permettant de les trier.



DISCUSSION

Une meilleure caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire du cancer du rein est d'un intérêt majeur dans le cadre des nouvelles thérapies immunomodulatrices tel que les anticorps anti-PD1 bloquant qui manquent de facteur prédictif de réponse pertinent.

1/ Expression prédominante de PD-1 par les TIL de cancers du rein

Ce travail a montré que les lymphocytes T infiltrant les tumeurs du rein expriment différentes MCI (PD-1, Tim-3, Lag 3, CTLA-4). Parmi, ces MCI, l'expression de PD-1 est prédominante car cette molécule est détectée sur tous les prélèvements analysés avec une moyenne d'expression de 50%. L'intensité d'expression de PD-1 par cellule est variable avec une MFI entre 3 et 26. Comme précédemment décrit, nous avons observé chez certains patients deux populations de LT-PD1 identifiés par une densité basse ou haute de PD-1 (Fig 2c). Néanmoins, dans la majorité des cas, l'hétérogénéité d'expression pour un même échantillon est continue et ne permet d'identifier deux populations. Dans la littérature, il avait été rapporté que les LT exprimant de fort niveau de PD-1 pouvaient correspondre à des LT régulateurs [68]; pour valider cette correspondance entre le niveau d'expression de PD-1 et le phénotype Treg, il nous faudra réaliser un co-marquage PD1-FoxP3.

2/ Analyse de l'expression des autres MCI dans les TIL de cancers du rein

L'expression des autres MCI est plus faible avec une fréquence d'expression de Tim3 plus importante que Lag3 et que CTLA-4. Nous n'avons pas observé d'expression des autres MCI en l'absence d'expression de PD-1.

L'absence d'expression isolée de Tim-3 ou de CTLA-4 sans détection de PD-1 avait été rapportée dans l'analyse de l'infiltration lymphocytaire T dans des modèles murins de cancers du côlon, du sein et de l'ovaire [69,70]. Dans le sang de patients atteints de mélanomes, la majorité des LT-CD8 spécifiques de l'antigène NY-ESO1 qui expriment Tim-3 sont également positifs pour PD-1 [71]. Au contraire, une activation *in vitro* des lymphocytes T isolés du sang permet d'induire ces MCI avec dans certains cas une expression de Tim3, Lag3 ou CTLA-4 sans détection associée de PD-1. La différence de cinétique d'expression de ces molécules peut expliquer des profils d'expression variable entre une activation *in vitro* et un contexte tumoral où l'expression de ces MCI est analysée à un temps donné. Néanmoins, d'autres molécules présentes au sein des tumeurs rénales comme l'IL-4, IL-10, l'IL-15, l'IL-21, l'IL-12, l'IFN α ou le VEGFA [72-74] peuvent aussi réguler l'expression de certaines de ces MCI [75-77] et expliquer un profil particulier d'expression dans les tumeurs par comparaison à celui observé par une stimulation des lymphocytes T.

Nous n'avons pas observé d'expression de CTLA-4 membranaire. En effet, il a été montré que l'expression membranaire de CTLA-4 sur les LT est inductible en réponse à une fixation du complexe CMH-Ag au TCR, sous le contrôle d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnel faisant intervenir une réorientation du centrosome dont l'importance dépend de la force du signal TCR. C'est une expression transitoire polarisée à la synapse immunologique, l'expression membranaire n'étant constitutive que sur les LT régulateurs à un niveau non détectable en CMF sur la population LT totale [78]. Le cycle d'internalisation et de dégradation du CTLA-4 est dépendant de la clathrine et d'un adaptateur AP-2, ce recyclage peut être inhibé par la Wortmannin. Nous pourrions utiliser cette drogue pour observer une expression membranaire sur les TIL. Après avoir montré que les enzymes utilisées pour l'extraction des TIL (DNase I et collagénase D) n'étaient pas responsables d'un clivage du CTLA-4 membranaire, nous avons privilégié un marquage intracellulaire reflétant bien l'activité transcriptionnelle de CTLA-4, régulée par NFAT. La réalisation d'un marquage en IF *in situ* sur un échantillon de TIL nous a confirmé une expression intracellulaire et péri-membranaire du CTLA-4. Cette expression intracellulaire peut interroger sur le mécanisme d'inhibition de CTLA-4 par l'ipilimumab qui agit sur le CTLA-4 membranaire induisant son internalisation qui nécessite une expression membranaire forte qu'elle soit stable ou liée à un recyclage rapide.

3/ Analyse et propriétés de la population de TIL co-exprimant PD-1 et Tim-3

Afin de comprendre la signification de cette co-expression, nous nous sommes focalisés sur les 2 MCI membranaires prédominantes : PD-1 et Tim-3. Nous avons montré qu'il existait deux populations de TIL : les TIL PD-1⁺ Tim-3⁺ et les TIL PD-1⁺ Tim-3⁻. La présence de ces deux populations a été confirmée par deux techniques, la cytométrie de flux et l'immunofluorescence *in situ*. En dépit d'une bonne corrélation générale retrouvée entre ces deux techniques, quelques discordances ont été observées qui pourraient s'expliquer par la plus grande sensibilité de la cytométrie par rapport à l'immunofluorescence *in situ* (détection laser pour la CMF). Par ailleurs, les anticorps sont directement couplés à un fluorochrome lors de la CMF, tandis qu'une technique à deux couches d'anticorps a été utilisée pour l'IF *in situ*.

Différents arguments suggèrent que cette population de TIL co-exprimant PD-1 et Tim-3 serait un biomarqueur péjoratif et un critère de gravité pour le patient. Ainsi, lorsque nous avons trié une population de TIL chez un patient atteint de cancer du rein ; les lymphocytes T-PD-1⁺ Tim-3⁺ ne produisaient pas d'IFN γ , tandis que les LT-PD-1^{neg} ou PD-1⁺ Tim-3^{neg} en sécrétaient (Fig 7). Les tumeurs chromophobes du rein qui sont d'excellent pronostic sont

peu infiltrées par les lymphocytes T qui n'exprimaient jamais Tim-3. Parmi les tumeurs rénales à cellules claires, la taille des tumeurs et le grade Fürhman sont plus faibles chez les patients présentant des lymphocytes T ne co-exprimant pas Tim-3 avec PD-1 (Fig 5b).

Une corrélation entre la co-expression de PD-1 avec d'autres MCI dont Tim3 par les LT-CD8 anti-tumoraux et la perte de fonctionnalité de ces cellules avait été retrouvée chez des patients atteints de mélanomes et dans différents modèles murins [68,70, 71, 79]. Il semble donc que l'expression isolée de PD-1 à la différence de sa coexpression avec d'autres MCI n'inhibe pas la fonctionnalité des cellules.

4/ Anergie des TIL et co-expression des MCI

Une perte de la fonctionnalité des lymphocytes T infiltrant les tumeurs du rein avait été rapportée dans un nombre important de cas. Différents mécanismes ont été émis pour expliquer cette anergie (perte d'expression de la chaîne zeta associée au complexe CD3 [80], production d'IL-10 dans le stroma des cancers du rein [81], infiltration des tumeurs par des cellules suppressives de type MDSC ou LT reg [82]. Nos résultats montrant une fréquente co-expression de MCI par les LT infiltrant les tumeurs du rein peuvent aussi constituer un nouveau mécanisme à l'origine de cette anergie.

5/ Intérêt pronostique de l'analyse de ces molécules de costimulation dans le rein et d'autres cancers.

Dans le cancer du rein, il avait été montré que l'expression de PD-1 et de son ligand PDL-1 était associée à un mauvais pronostic clinique et ce rôle défavorable a été étendu à d'autres cancers, seule l'expression de PDL-1 est un facteur prédictif avéré de réponse au traitement par anticorps anti-PD1 [61,67,83]. Néanmoins, notre groupe et d'autres équipes ont montré que l'expression de PD-1 par les TIL de patients atteints de cancers ORL, de cancers du côlon et de lymphomes était associée à un pronostic favorable [57,84,85]. Il se peut que suivant que PD-1 soit exprimée seule ou associée à d'autres MCI sa signification clinique soit différente. PD-1 peut en effet refléter une activation cellulaire et nous avons montré chez des patients atteints de cancers ORL que les LT -PD-1⁺ exprimaient plus fortement des marqueurs d'activation et qu'une majorité d'entre eux n'exprimaient pas Tim-3 [57]. Au contraire, chez des patients co-infectés par les virus de l'hépatite C et le VIH, la co-expression de PD-1 et Tim3 corrèle avec une plus grande sévérité de lésions hépatiques [86]. Les LT de patients atteints de lymphomes folliculaires et co-exprimant PD-1 et Tim3 ont un plus mauvais pronostic que les patients exprimant PD-1 seul [87]. Le groupe de Rosenberg et de Coukos ont montré chez l'homme et la souris que les lymphocytes T anti-tumoraux étaient enrichis

dans la population de TIL exprimant PD-1 et parfois d'autres MCI suggérant que cette expression reflète une activation initiale de ces cellules possiblement dirigées contre la tumeur puis en raison d'une activation chronique, ces cellules deviennent « exhausted » [69,88]. Cette association entre l'expression de PD-1 et une réponse naturelle endogène anti-tumorale peut aussi expliquer le bon pronostic parfois associé à son expression.

Conclusion et perspectives.

Lors de ce travail, nous avons analysé la co-expression de MCI sans analyser l'expression de leurs ligands au sein des tumeurs. Même si l'expression de certains de ces ligands (PDL-1, CD80, MHC classe II) [66,67] a déjà été rapportée dans les tumeurs du rein, il serait important lors de la poursuite de ce travail, d'analyser pour une même tumeur, l'expression simultanée des MCI et de leurs ligands pour mieux comprendre le rôle de ces molécules.

Des travaux récents ont montré l'intérêt de traiter des patients atteints de cancers par des immunomodulateurs bloquant l'interaction des MCI avec leurs ligands. Des réponses cliniques objectives ont été observées chez 25-30% de patients atteints de cancers du rein métastatiques traités par un anti-PD-1. L'expression de PDL-1 par la tumeur constitue le seul biomarqueur associé à la réponse sur une série limitée de patients [60,89]. Nos résultats préliminaires suggèrent que le groupe de patients dont les TIL co-expriment de nombreuses molécules de costimulation pourrait être résistant à ces traitements en raison de la perte de fonction de ces cellules.

Dans des modèles murins, il a été montré que la combinaison d'immunomodulateurs bloquant l'interaction de différents MCI (CTLA-4, Tim-3, PD-1, Lag3) avec leurs ligands est plus efficace que le blocage d'un seul couple ligand-récepteurs dérivés de ces MCI pour traiter des infections chroniques ou des cancers [68,70,79].

Le profil de co-expression de MCI chez des patients atteints de cancer pourrait donc prédire la réponse à des monothérapies ciblant ces MCI et guider des combinaisons thérapeutiques de façon rationnelle.

Références

(au format de la revue Cell)

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Accessible sur le site : <http://globocan.iarc.fr>.
2. Bergstrom A, Hsieh CC et al (2001). Obesity and renal cancer: a quantitative review. *Br J Cancer* 85(7), 984-90.
3. Chow, WH., Gridley, G., et al (2000). Obesity, hypertension and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* 343(18):1305-11.
4. Lindblad, P., Chow, WH., et al (1999). The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia* 42(1):107-12.
5. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1996 Sep 19;335(12):865-75.
6. Joniau S, Vander Eeck K, Srirangam SJ et al. Outcome of nephron-sparing surgery for T1b renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2009 May;103(10):1344-8.
7. Chambade D, Meria P, Taniel E et al. Nephron sparing surgery is a feasible and efficient treatment of T1a renal cell carcinoma in kidney transplant: a prospective series from a single center. *P J Urol*. 2008 Nov;180(5):2106-9.
8. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2409-14.
9. Coppin C, Porzolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jan 25;(1):CD001425.
10. Yang JC, Rosenberg SA. An ongoing prospective randomized comparison of interleukin-2 regimens for the treatment of metastatic renal cell cancer. *Cancer J Sci Am*. 1997 Dec;3 Suppl 1:S79-84
11. Dillman RO, Oldham RK, Tauer KW et al. Continuous interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for advanced cancer: a National Biotherapy Study Group trial. *J Clin Oncol*. 1991 Jul;9(7):1233-40.
12. Manola J, Royston P, Elson P et al. Prognostic model for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from the international kidney cancer working group. *Clin Cancer Res*. 2011 Aug 15;17(16):5443-50
13. Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R et al. Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis.. *J Urol*. 2004 Mar;171(3):1071-6
14. Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC et al (2009). Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol*. 27(16):2645-52.
15. Tourani JM, Pfister C, Tubiana N et al (2003). Subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of SCAPP III, a large, multicenter, phase II, nonrandomized study with sequential analysis design--the Subcutaneous Administration Propeukin Program Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 21(21):3987-94
16. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
17. Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 Jan 11;356(2):125-34.
18. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 1;24(1):16-24.

19. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2010 Feb 20;28(6):1061-8.
20. Rini BI, Escudier B, Tomczak P et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011 Dec 3;378(9807):1931-9.
21. Nosov DA, Esteves B, Lipatov ON et al (2012). Antitumor activity and safety of tivozanib (AV-951) in a phase II randomized discontinuation trial in patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 10;30(14):1678-85.
22. Escudier B, Bellmunt J, Négrier S et al (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival *J Clin Oncol.* 1;28(13):2144-50.
23. Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 31;356(22):2271-81
24. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* 372(9637):449-56.
25. Albiges L, Oudard S, Negrier S et al. (2012). Complete remission with tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 10;30(5):482-7
26. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND et al (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 29;363(5):411-22
27. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 363(8):711-23
28. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74.
29. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E et al (2012). The determinants of tumour immunogenicity. *Nat Rev Cancer.* 12(4):307-13. doi: 10.1038/nrc3246.
30. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010 Feb 25;29(8):1093-102.
31. Gleave ME, Elhilali M, Fradet Y et al. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. Canadian Urologic Oncology Group. *N Engl J Med.* 1998 Apr 30;338(18):1265-71
32. Van Poppel H, Joniau S, Van Gool SW (2009). Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 55(6):1333-42.
33. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A et al (2012). Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 18(8).
34. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29:235-71.
35. Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J, Cohen P (2011). MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol.* 11(7):856-61.
36. Tartour E, Pere H, Maillere B et al (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 30(1):83-95.
37. Adotevi O, Pere H, Ravel P et al (2010). A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother.* 33(9):991-8
38. Bose A, Lowe DB, Rao A, Storkus WJ (2012). Combined vaccine+axitinib therapy yields superior antitumor efficacy in a murine melanoma model. *Melanoma Res.* 22(3):236-43

39. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O et al (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*. 31:51-72.
40. Michaud M, Martins I, Kroemer G et al (2011). Autophagy-dependant anticancer immune responses induced by chemotherapeutics agents in mice. *Science* 334 (6062) : 1573-7.
41. Krysko DV, Garg AD et al (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* vol 12 860-875.
42. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O et al (2008). Molecular characteristics of immunogenic cell death. *Cell death and Differentiation* 15, 3-12.
43. Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.
44. Freeman, G.J., Sharpe, A.H. (2012). A new therapeutic strategy for malaria: targeting T cell exhaustion. *Nature Immunol* 13(2):113-5.
45. del Rio, M.L., Lucas, C.L., Buhler, L., Rayat, G., and Rodriguez-Barbosa, J.I. (2010). HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *J Leukoc Biol* 87, 223-235.
46. Crawford, A., Wherry, E.J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* 21(2):179-86.
47. de la Fuente, H., Cibrian, D., and Sanchez-Madrid, F. (2012). Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett* 586, 2897-2905.
48. Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, A.S., Flies, S.J., and Chen, L. (2008). B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 3635-3643.
49. Duttagupta, P.A., Boesteanu, A.C., and Katsikis, P.D. (2009). Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. *Crit Rev Immunol* 29, 469-486.
50. Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326-336.
51. Cho JL, Roche MI, Sandall B et al (2012). Enhanced Tim3 activity improves survival after influenza infection. *J Immunol* 15;189(6):2879-89.
52. Youngblood, B., Wherry, E.J., and Ahmed, R. Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8 T cells. *Curr Opin HIV AIDS* 7, 50-57.
53. Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.
54. Salvi S, Fontana V, Boccardo S et al (2012). Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 61(9):1463-72
55. Faget J, Bendrisco-vermare N, Gobert M et al (2012). ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res* 1;72(23)6130-41.
56. Riches JC, Davies JK, McClanahan et al. (2013) T cells from CLL patients exhibit features of T cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 121(9), 1612-21.
57. Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544.
58. Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van 4.Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., *et al.* (2013b). PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 73, 128-138.

59. Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* **9**, 241-247.
60. Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443-2454
61. Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., and Kwon, E.D. (2007b). PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 1757-1761.
62. Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., *et al.* (2012). Colocalization of inflammatory response with b7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* **4**, 127ra137.
63. Thompson RH, Kwon ED, Allison JP. Inhibitors of B7-CD28 costimulation in urologic malignancies. *Immunotherapy*. 2009 Jan;1(1):129-39
64. Rini BI, Stein M, Shannon P et al. Phase 1 dose-escalation trial of tremelimumab plus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2011 Feb 15;117(4):758-67.
65. Baitsch, L., Legat, A., Barba, L., Fuertes Marraco, S.A., Rivals, J.P., Baumgaertner, P., Christiansen-Jucht, C., Bouzourene, H., Rimoldi, D., Pircher, H., *et al.* (2012). Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* **7**, e30852.
66. Demeure, C.E., Wolfers, J., Martin-Garcia, N., Gaulard, P., and Triebel, F. (2001). T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts. *Eur J Cancer* **37**, 1709-1718.
67. Thompson, R.H., Dong, H., and Kwon, E.D. (2007a). Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* **13**, 709s-715s.
68. Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**, 29-37.
69. Duraiswamy, J., Kaluza, K.M., Freeman, G.J., and Coukos, G. (2013). Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T Cell Rejection Function in Tumors. *Cancer Res*.
70. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* **207**, 2187-2194
71. Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* **207**, 2175-2186.
72. Curti, B.D. (2006). Immunomodulatory and antitumor effects of interleukin-21 in patients with renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**, 905-90
73. Giron-Michel, J., Azzi, S., Khawam, K., Caignard, A., Devocelle, A., Perrier, A., Chouaib, S., Eid, P., and Azzarone, B. (2011). Interleukin-15 is a major regulator of the cell-microenvironment interactions in human renal cancer. *Bull Cancer* **98**, 32-39.

74. Onishi, T., Ohishi, Y., Imagawa, K., Ohmoto, Y., and Murata, K. (1999). An assessment of the immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. *BJU Int* **83**, 488-492.
75. Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J.V., Colgan, J.D., *et al.* (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* **13**, 832-842.
76. Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O'Shea, M.A., and Fauci, A.S. (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* **181**, 6738-6746.
77. Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T., and Honjo, T. (2011). IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol* **186**, 2772-2779.
78. Valk, E., Christopher, E., Schneider, H. (2009). CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends in Immunology* **29**, 270-279.
79. Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res* **72**, 887-896.
80. Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C.D., Lee, R., Debre, B., and Fridman, W.H. (1995). Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* **63**, 205-212.
81. Wittke, F., Hoffmann, R., Buer, J., Dallmann, I., Oevermann, K., Sel, S., Wandert, T., Ganser, A., and Atzpodien, J. (1999). Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **79**, 1182-1184.
82. Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., and Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 721s-726s.
83. Badoual, C., Combe, P., Gey, A., Granier, C., Roussel, H., De Guillebon, E., Oudard, S., and Tartour, E. (2013a). Signification et intérêt clinique de l'expression de PD-1 et PDL-1 dans les tumeurs. *Medecine sciences* **29**, 10-12.
84. Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009). High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **27**, 1470-1476.
85. Mlecnik, B., Tosolini, M., Charoentong, P., Kirilovsky, A., Bindea, G., Berger, A., Camus, M., Gillard, M., Bruneval, P., Fridman, W.H., *et al.* (2010). Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 1429-1440.
86. Vali, B., Jones, R.B., Sakhdari, A., Sheth, P.M., Clayton, K., Yue, F.Y., Gyenes, G., Wong, D., Klein, M.B., Saeed, S., *et al.* (2010). HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression. *Eur J Immunol* **40**, 2493-2505.
87. Yang, Z.Z., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A.J., Witzig, T.E., and Ansell, S.M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* **122**, 1271-1282.

88. Inozume, T., Hanada, K., Wang, Q.J., Ahmadzadeh, M., Wunderlich, J.R., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (2010). Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *J Immunother* **33**, 956-964.
89. Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., *et al.* (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* **28**, 3167-3175.

Travaux

- 1- Résistance au docetaxel : mécanismes et applications thérapeutiques. Oudard S, Combe P. *Oncologie* 2012
- 2- Vaccine in the era of TKI : revue de littérature de l'immunothérapie dans le cancer du rein. Oudard S, Combe P. 7th European International Kidney Cancer symposium, Vienna May 2012.
- 3- L'immunothérapie dans le cancer du rein à l'ère des TKI. Combe P, Tartour E, Oudard S. *Correspondances en Onco-urologie* Juin 2012.
- 4- Rédaction d'un protocole d'essai clinique : Phase 1-2 Axitinib + MDX1106 dans le cancer du rein métastatique. Combe P, Oudard S, Tartour E.

Participations :

- 1- Rechallenge with mTOR Inhibitors in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients Who Progressed on Previous mTOR Inhibitor Therapy. Maj-Hes A, Medioni J, Scotte F, Schmidinger M, Kramer G, Combe P, Gornadha Y, Elaidi R, Oudard S. *Oncology*. 2013;85(1):8-13. Epub 2013 Jun 21.
- 2- Signification et intérêt clinique de l'expression de PD-1 et PD-L1 dans les tumeurs. Badoual C, Combe P, Gey A, Granier C, Roussel H, E de Guillebon, Oudard S, Tartour E. *Med Sciences* Juin 2013.
- 3- Renal carcinoma: point on treatment of brain metastasis. Teghom C, Giraud P, Menei P, Medioni J, Elaidi R, Combe P, Oudard S. *Bull Cancer*. 2012 Jun
- 4- Metastatic renal cell carcinoma treated sequentially with multiple VEGF receptor-targeted inhibitors--a case report. Linassier C, Carmier D, Combe P, D'Arcier BF, Bruyere F, Narciso B. *Anticancer Res*. 2012 Feb

Remerciements

Je remercie particulièrement les membres du jury pour l'attention qu'ils ont porté à ce travail: les Professeurs Claude Linassier, Philippe Bougnoux et Franck Bruyère, le Docteur Bérengère Narciso.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'association CANCEC pour leur soutien ayant permis le financement de ce projet,
le Professeur Claude Linassier pour avoir accepté de diriger ce travail, en collaboration avec les Professeurs Eric Tartour et Stéphane Oudard.
les patients ayant accepté de participer à cette étude,
Alain Gey pour m'avoir fait partager son expérience pointue de cytométrie et ses précieux conseils amicaux, le Professeur Cécile Badoual et le Docteur Hélène Roussel pour leur expertise anatomo-pathologique et leur précieuse collaboration à la partie immunofluorescence in situ, le Professeur Arnaud Mejean et le Docteur Marc-Olivier Timsit du service d'Urologie de l'HEGP, tous les membres de l'équipe 10 du laboratoire Inserm U970 et du laboratoire d'immunologie biologique de l'HEGP pour leur accueil et leurs conseils, le Docteur Philippe Afonso pour sa relecture amicale,

Au-delà de ce travail, pour avoir contribué à ma formation médicale par leur exemple ou leurs enseignements, je remercie les Professeurs Claude Linassier, Philippe Bougnoux, Stéphane Oudard, Philippe Colombat, Dominique Perrotin, Olivier Le Floch, Gilles Calais, Guy Giniès, ainsi que les Docteurs Bérengère Narciso, Delphine Sénécal, Séverine Lissandre, Caroline Dartigeas Sophie Chapet, Jérôme Meunier, Thierry Wachter.
Je dédie ce travail à ma famille et mes amis,

A ma chère mère, pour l'amour dont elle m'a toujours entouré,
A mon père, mon grand-père paternel le Professeur Paul Combe, mon parrain le Docteur Jean-Claude Combe, ma tante le Docteur Marie-Paule Delplace et mon très cher cousin le Docteur Xavier Delplace pour leur exemple de droiture et de passion dans l'exercice de la médecine. Mon pédiatre, le regretté Docteur Georges-marie Fournier.
A mes chères sœurs, Sophie, Isabelle, Christine, Agnès et Laetitia ainsi que mes chers neveux, nièces et filleuls; Arthur, Thomas et Côme, chez lesquels naîtront je l'espère quelques vocations médicales.

A mes amis non médecins : Alexandre, Philippe, Lorraine, Clothilde, Maylis, Laetitia, Gatienna, Annais, Thibault, Renaud, Arthur et Dom Etienne pour leur fidèle amitié .

A mes amis médecins,

Lucie, Charlotte, Elise, Amélie, Camille, Aurélie, Audrey, Jehane, Anne, Capucine, Hélène, Marlène, Guillemette, Marie-Agnès, Armelle, Dorothée, Bénédicte, Aurore, Agathe, Edouard, Olivier, Baudouin, Marc-antoine, Charles, Laurent, Benjamin, pour ces nombreuses années d'étude que nous avons partagé dans la joie et la bonne humeur !

Vu, le Directeur de Thèse

« *signature* »

Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS

« *signature* »

COMBE Pierre

Thèse n°

50 pages – 5 tableaux – 8 figures – 2 schémas

Résumé : Le blocage des molécules de costimulation inhibitrice (MCI) est une nouvelle voie thérapeutique en cancérologie permettant une réactivation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. Les MCI ; CTLA-4, PD-1, LAG-3 et Tim3, sont les plus étudiées. L'anticorps thérapeutique anti-PD1 bloquant Nivolumab prometteur dans le carcinome rénal à cellules claires, nécessite des biomarqueurs prédictifs de réponse et une exploration des mécanismes de résistance primaire. Nous avons étudié pour cela le profil d'expression de ces MCI sur les lymphocytes infiltrant des tumeurs (TIL) du rein chez l'homme. Nous avons aussi étudié la cinétique d'expression de ces MCI sur des lymphocytes du sang périphérique de donneurs sains après activation TCR-dépendante, mettant ainsi en évidence leur rôle en condition de stimulation antigénique aigue de ces MCI.

Dans les tumeurs du rein, deux populations se distinguent : les tumeurs dont les TIL expriment PD1 et Tim3 et celles exprimant PD1 seul. L'analyse fonctionnelle, des capacités effectrices nous a montré un profil d'exhaustion des TIL PD1+Tim3+. Le point de clivage entre activation et exhaustion et sa réversibilité par des associations d'anticorps bloquants les différents MCI impliquées est à préciser ainsi que le caractère prédictif du statut PD1-Tim3.

Mots clés :

- cancer du rein
- micro-environnement, immunité anti-tumorale
- lymphocyte T cytotoxique
- molécule de costimulation inhibitrice : PD-1, TIM3, LAG-3, CTLA-4

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Claude LINASSIER
Membres du jury : Monsieur le Professeur Philippe BOUGNOUX
Monsieur le Professeur Franck BRUYERE
Madame le Docteur Bérengère NARCISO

Date de la soutenance : 26 septembre 2013