

Faculté de médecine et médecine dentaire

**Etude rétrospective de la
corrélation d'expression d'IDO1 et
d'une signature IFN γ dans
différentes tumeurs**

Auteure : TISON Thaïs
Promoteur : BAURAIN Jean-François
Lecteurs: HUMBLET Yves, VAN BAREN Nicolas
Année académique 2019-2020
Master 3

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier de tout cœur toutes les personnes ayant participé de près ou de loin au bon déroulement de ce mémoire.

Un grand merci tout particulièrement à :

- Mon promoteur, le professeur Jean-François Baurain, pour m'avoir apporté son soutien durant ces trois années.
- Au professeur Etienne Marbaix et à son équipe, pour m'avoir aidée dans la sélection et la découpe des différents échantillons tumoraux.
- Caroline Bouzin et Aurélie Daumerie, pour m'avoir aidée dans l'apprentissage et la rédaction des techniques immunohistochimiques utilisées lors de ce mémoire. Merci également d'avoir toujours été présentes en cas de difficultés, pour les nombreux conseils et le support technique.
- Finoula Maestre, doctorante du professeur Baurain, pour son aide dans l'interprétation des différents marquages.
- Mes parents, pour leur support affectif et leur relecture attentive.

Et merci à vous, chers lecteurs, de m'accorder votre attention durant ces quelques pages.

Bonne lecture.

RESUME (français)

Il a été récemment démontré que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) joue un rôle dans la défense tumorale contre notre système immunitaire et pourrait en partie expliquer le manque de réponse de certains cancers aux anti-PD1. L'expression constitutive de cette enzyme par les cellules tumorales empêche l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et la protège donc contre leur action lytique (tumeur « froide », non infiltrée). Cette expression nécessite l'action de la cyclooxygénase-2 (COX-2). L'utilisation d'un anti-COX2 (celecoxib) pourrait donc améliorer la réponse aux anti-PD1 en réchauffant la tumeur.

Pour que cette thérapie fonctionne, il est important de s'assurer qu'il n'existe pas un autre mécanisme empêchant la reconnaissance des cellules tumorales par notre système immunitaire. Cette reconnaissance passant par le complexe HLA-I, la perte de celui-ci à la surface des cellules tumorales est un de ces mécanismes, déjà bien connu.

Le HLA-I est composé d'une chaîne lourde polymorphique α et d'une chaîne légère appelée β 2-microglobuline. Nous avons analysé l'expression de ce complexe HLA-1 et de sa chaîne légère β 2m à la surface de différents types tumoraux.

Dix échantillons de 4 types tumoraux différents (vessie, rein, ORL et poumons) préservés dans de la paraffine ont été utilisés et découpés en plusieurs lames ensuite marquées par immunohistochimie classique. Trois anticorps ont été utilisés : un anti-panCK pour délimiter les zones tumorales, un anticorps dirigé contre le HLA-1 et le dernier contre la β 2m. Les lames ont ensuite été scannées et une analyse quantitative de la surface marquée a été réalisée.

Sur les 40 échantillons analysés, 4 ont perdu l'expression du HLA-I : 2 de vessie, 1 de rein et 1 de la sphère ORL. Une perte de la β 2m y est associée dans $\frac{3}{4}$ des cas. Le $\frac{1}{4}$ de nos échantillons ont perdu leur expression de la β 2m sans perdre l'expression membranaire de la chaîne lourde du HLA-I. Ces résultats pourraient être en partie faussés par un biais de marquage de la β 2m. La grande majorité (87.5%) des tumeurs analysées présentent un profil d'expression du HLA-I de type hétérogène. Ces résultats diffèrent des études réalisées antérieurement sur ce même sujet. Ceci pourrait être lié à la méthodologie et au matériel tumoral utilisés. En se basant sur la revue de littérature de F. Garrido, les cancers du rein et de la sphère ORL seraient les meilleurs candidats à l'utilisation du celecoxib de par leur moindre dépendance à la perte du HLA-I dans le processus de développement et d'infiltration tumorale.

ABSTRACT (english)

It has been recently demonstrated that the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) plays a role in the tumoral defense against our immune system and could partially explain the lack of anti-PD1 response in some cancers. The tumoral constitutive expression of this enzyme prevents the tumoral infiltration with the cytotoxic T cells, thus protecting the tumor of their lytic action (« cold » tumor). This process requires the action of cyclooxygenase-2 (COX-2). By « warming » the tumor, an anti-COX2, e.g. celecoxib, could improve the anti-PD1 response. However, for this to work, we need to make sure that there are no other mechanisms that prevent the tumor cells recognition by our immune system. It is already well known that the loss of the HLA-1 complex is one of them, as its presence is crucial for the interaction with the CTLs.

HLA-1 is composed of a polymorphic heavy chain α and a light chain β 2-microglobulin. We analysed the expression of this complex and of its light chain β 2m at the surface of various tumoral types.

Ten samples of 4 types of paraffin embedded tumor (bladder, kidney, ENT and lungs) were used and cut into several slides. Classic immunohistochemistry was used to stain them with three antibodies : anti-panCK to localize tumoral tissue, anti-HLA Class 1 and anti- β 2m. The slides were then scanned and a quantitative analysis of the stained surface was performed.

Four samples out of the forty analysed lost their HLA-1 expression : 2 bladder, 1 kidney and 1 ENT, with an associated loss of β 2m in $\frac{3}{4}$ of the cases. Twenty-five percents of the samples lost their β 2m expression without losing the expression of the HLA-1 complex. A β 2m staining bias could explain these odd results. The large majority of the analysed tumors present a heterogeneous expression of the HLA-1 complex. Our results clearly differ from previous similar studies. Differences in the methodologies and tumor material used are discussed as the potential reasons for these discordances. Based on the recent review of F. Garrido, kidney and ENT cancers are the best candidates for the use of celecoxib because of their lesser dependence to the loss of HLA-1 in the development and infiltration process of the tumor.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	3
INTRODUCTION	2
I. PRÉAMBULE.....	4
II. L'IMMUNOTHÉRAPIE, QU'EST-CE QUE C'EST ?.....	4
A. <i>Définition</i>	4
B. <i>Utilité dans le cadre du cancer</i>	4
C. <i>Différentes stratégies à l'heure actuelle</i>	7
III. FACTEURS CORRÉLATIFS DE RÉPONSE AUX ANTI-PD1.....	9
A. <i>Microenvironnement tumoral</i>	10
a. Action de l'IDO-1 sur les mécanismes antitumoraux :.....	10
b. Deux mécanismes d'expression de l'IDO-1 dans les tumeurs :.....	11
c. IDO- inhibiteurs et COX2 -inhibiteurs :.....	14
B. <i>Mutations</i>	14
a. Introduction.....	14
b. Mécanisme de reconnaissance lymphocytaire des cellules tumorales (4,12,13).....	15
OBJECTIFS	21
MATERIEL	22
METHODES	22
I. SÉLECTION DES TUMEURS.....	22
II. PRÉPARATION DES LAMES À PARTIR DES BLOCS TUMORAUX.....	24
A. <i>Fixation</i> :.....	24
B. <i>Inclusion de paraffine</i> :.....	24
C. <i>Découpe</i> :.....	24
III. IMMUNOMARQUAGE :.....	25
IV. SCAN ET ANALYSE DES LAMES :.....	26
ANALYSE DES RESULTATS	27
I. RÉSULTATS HLA TYPE I.....	28
II. RÉSULTATS B-2 MICROGLOBULINE.....	28
A. <i>Marquage $\beta 2m$ au niveau des tumeurs ayant perdu l'expression du HLA-I</i> :.....	28
B. <i>Résultats globaux du marquage $\beta 2m$</i> :.....	29
DISCUSSION	30
I. BIAS MÉTHODOLOGIQUES POTENTIELS.....	30
A. <i>Programme de quantification</i> :.....	30
B. <i>Marquage pan-CK</i> :.....	30
C. <i>Marquages $\beta 2m$ et HLA-I</i> :.....	31
II. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	32
A. <i>Résultats de l'expression HLA</i>	32
B. <i>Expression de la $\beta 2m$ dans le cadre des tumeurs HLA-I négatives</i> :.....	35
C. <i>Expression de la $\beta 2m$ dans le cadre de tumeurs gardant une expression du HLA-I</i> :.....	36
III. PERTE HLA-I ET INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE.....	36
CONCLUSION	38
REMERCIEMENTS	2
ANNEXES	39
I. ANNEXE I : PROTOCOLE DÉTAILLÉ IMMUNOHISTOCHEMIE :.....	39
II. ANNEXE II : RÉSULTATS DÉTAILLÉS MARQUAGE HLA-I :.....	40
III. ANNEXE III : RÉSULTATS DÉTAILLÉS MARQUAGE B2-MICROGLOBULINE :.....	41
BIBLIOGRAPHIE	42

INTRODUCTION

I. PRÉAMBULE

L'objectif initial de ce mémoire était de savoir s'il existait un/des type.s tumoral.aux dans le.s.quel.s nous retrouvions fréquemment des tumeurs froides exprimant l'IDO-1. Suite à un problème technique de longue durée d'un des appareils nous permettant de réaliser ce projet, **nous avons dû définir un nouvel objectif. Ce mémoire se concentre dès lors sur la fréquence de la perte du complexe HLA-I dans différents types tumoraux.**

Ces concepts sont repris et expliqués en détail dans notre introduction.

II. L'IMMUNOTHÉRAPIE, QU'EST-CE QUE C'EST ?

A. Définition

L'immunothérapie est un nouveau traitement qui utilise des molécules produites par notre corps ou en laboratoire afin de stimuler les défenses naturelles de notre corps, c'est-à-dire de stimuler notre réponse immunitaire.

Par extension, nous utilisons aujourd'hui ce terme pour définir l'ensemble des thérapies utilisant des protéines produites par notre système immunitaire (immunoglobuline, interleukines, interférons, ...), sans que l'objectif ne soit spécialement la stimulation de celui-ci (1,2).

B. Utilité dans le cadre du cancer

De manière générale, notre corps utilise notre système immunitaire afin de se défendre contre tout ce qui lui est étranger.

Au fur et à mesure de la transformation tumorale, nos cellules, qui étaient reconnues comme partie intégrante de notre organisme, vont se modifier, se dé-différencier, et commencer à produire des molécules considérées comme étrangères à notre corps (= antigènes tumoraux). Notre système immunitaire rentre alors dans un processus de reconnaissance de ces cellules « étrangères », qui aboutira, *in fine*, à leur destruction.

Ce processus peut être représenté de façon cyclique et être divisé en 7 étapes distinctes (9), représentées dans la **figure 1** :

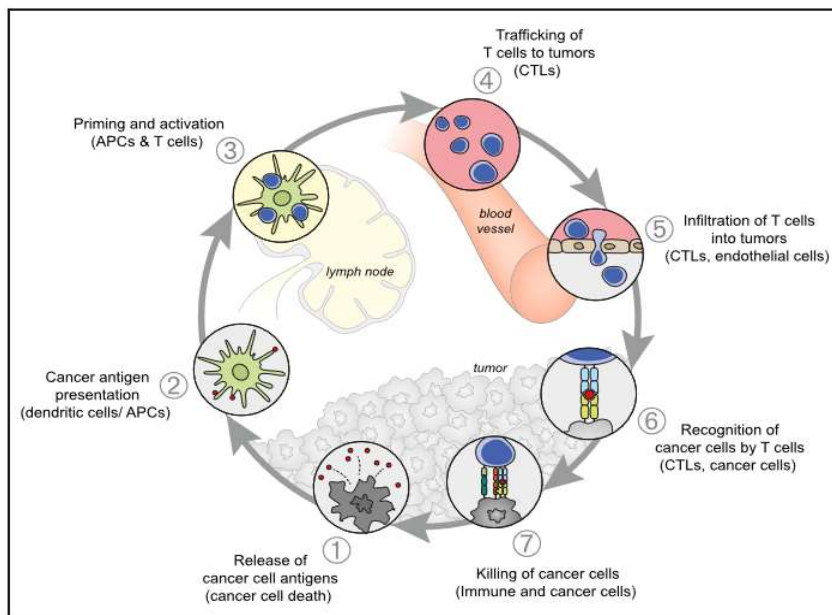


Figure 1 :
sept étapes du processus de destruction tumorale par notre système immunitaire. (9)

1. La première étape consiste en la libération d'antigènes par la cellule tumorale et à la capture de ceux-ci par les cellules présentatrices d'antigènes.
2. La deuxième correspond à la présentation aux lymphocytes T de ces antigènes étrangers par les cellules présentatrices d'antigènes.
3. La troisième se réfère à l'activation des fonctions effectrices de ces lymphocytes T contre les antigènes spécifiques de la tumeur qui leurs ont été présentés.
4. Les quatrième et cinquième étapes correspondent au déplacement des lymphocytes T des nœuds lymphatiques vers la tumeur, en passant par la circulation sanguine, et à leur infiltration de la tumeur (« homing » des lymphocytes).
6. La liaison entre le récepteur des lymphocytes T et les antigènes présents à la surface des cellules tumorales représente la sixième étape du processus. Les antigènes sont présentés à la surface des cellules cancéreuses via un complexe nommé HLA de type I.
7. La septième et dernière étape est la destruction des cellules tumorales par ces mêmes lymphocytes.

Cette destruction amène à une libération de multiples antigènes tumoraux qui sont, à leur tour, emprisonnés par les cellules présentatrices d'antigènes, ce qui nous ramène à l'étape n°1 de notre cycle.

Chez les patients qui développent un cancer, ce mécanisme de défense est mis à mal. Nous pouvons expliquer ce phénomène en faisant un parallèle avec la « sélection naturelle » évoquée dans la théorie de l'évolution où il est dit que « *ce sont les individus les mieux adaptés à leur milieu qui survivent* ». Dans le cas de cancer, les « individus » correspondent aux cellules cancéreuses et ceux-ci doivent survivre dans « leur milieu », un environnement qui leur est hostile car protégé par notre système immunitaire. Au fur et à mesure des répliques cellulaires, des mutations et remaniements génétiques surviennent au sein des cellules cancéreuses pour s'adapter à leur milieu. Ces mutations leur apportent parfois un avantage de survie par rapport aux autres ; c'est un peu comme si notre système immunitaire exerçait une pression sélective sur la population tumorale.

Cet avantage sélectif peut se présenter sous forme de différents mécanismes qui permettent aux cellules cancéreuses de passer inaperçues vis-à-vis de nos défenses naturelles.

De ce fait, on peut se retrouver devant des situations où (*liste non-exhaustive*) :

- Les antigènes tumoraux ne sont pas détectés ;
- Les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T reconnaissent les antigènes comme non-étrangers, ce qui amène à une réponse régulatrice plutôt qu'effectrice des lymphocytes T, c'est-à-dire à une tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales ;
- Les lymphocytes T dirigés contre la tumeur n'arrivent pas à infiltrer celle-ci ;
- Le micro-environnement tumoral empêche une réponse effectrice des lymphocytes T anti-tumoraux ;
- ...

Ce système de sélection tumorale, encore appelé « immuno-editing », amènerait donc à la survie des cellules tumorales les moins « immunogènes ». Cette théorie a été mise en place par Robert Schreiber sous le nom de « théorie des 3 E » (8, 11). Ces 3 « E » font référence aux 3 situations relationnelles qui se succèdent lors de la formation d'une tumeur :

- 1) **E**limination tumorale par le système immunitaire : le processus cyclique de destruction des cellules cancéreuses est opérationnel.
- 2) **E**quilibre entre la tumeur et le patient : le phénomène d'« immunoediting » se met en place.
- 3) **E**chappement des cellules tumorales : la tumeur devient invisible aux yeux de notre système immunitaire.

L'immunothérapie antitumorale consiste à stimuler l'immunité des patients afin que leur système immunitaire parvienne à nouveau à éliminer les cellules tumorales.

C. Différentes stratégies à l'heure actuelle

Il existe différentes approches dans les stratégies d'immunothérapie. Nous pouvons les classer en deux catégories :

1) Mobilisation du système immunitaire du patient.

C'est à cette approche que les oncologues font référence lorsqu'ils parlent « d'immunothérapie », dans la plupart des cas.

Au sein de cette catégorie, nous retrouvons différentes stratégies, notamment :

- Augmentation de l'immunogénicité des tumeurs (**fig. 1**, étape 2) ;
- Action sur la primo-activation (**fig. 1**, étape 3) ;
- Action sur le homing des lymphocytes T qui permettrait l'infiltration lymphocytaire des tumeurs (**fig. 1**, étape 4 et 5);
- Action sur la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T (**fig. 1**, étape 6)

2) Réalisation d'une immunisation passive du patient, consistant en l'administration au patient des molécules dont il a besoin pour se défendre. Ce n'est donc pas une stimulation de ses propres défenses mais bien une aide extérieure à son système immunitaire.

Chacune de ces approches fait appel à plusieurs techniques, mais, à l'heure actuelle, l'utilisation d'inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (« immune checkpoint inhibitor ») a déjà démontré son efficacité.

Les checkpoints dont nous parlons ici permettent, en temps normal, de réguler le système immunitaire lorsqu'il est en action, afin d'éviter qu'il ne sur-réagisse et qu'il ne provoque une réaction trop importante par rapport à la situation, ce qui nous serait délétère. Ces checkpoints correspondent donc à une modulation négative de la réponse immunitaire. Ils passent par un système de communication entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T.

Un de ces systèmes de communication, celui qui nous intéresse dans le cadre de ce mémoire, correspond à la reconnaissance de PD-1 (*Programmed cell death-1*, un récepteur se trouvant à la surface des lymphocytes T) par ses ligands, PD-L1 et, dans une moindre mesure, PD-L2.

Ceux-ci se trouvent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et de certains tissus. Certaines cellules tumorales présentent également ses ligands à leur surface, ce qui leur confère un avantage de survie (6).

Comme nous pouvons le voir ci-dessous (**figure 2**), le PD-1 n'est exprimé que tardivement par les lymphocytes T (**fig. 2**, étape 7), suite à la liaison du TCR (T-cell receptor) et à l'action de plusieurs cytokines sur ces lymphocytes T. Son interaction avec ses ligands inhibe la destruction des cellules cancéreuses par blocage de la sécrétion et de la production des médiateurs cytotoxiques.

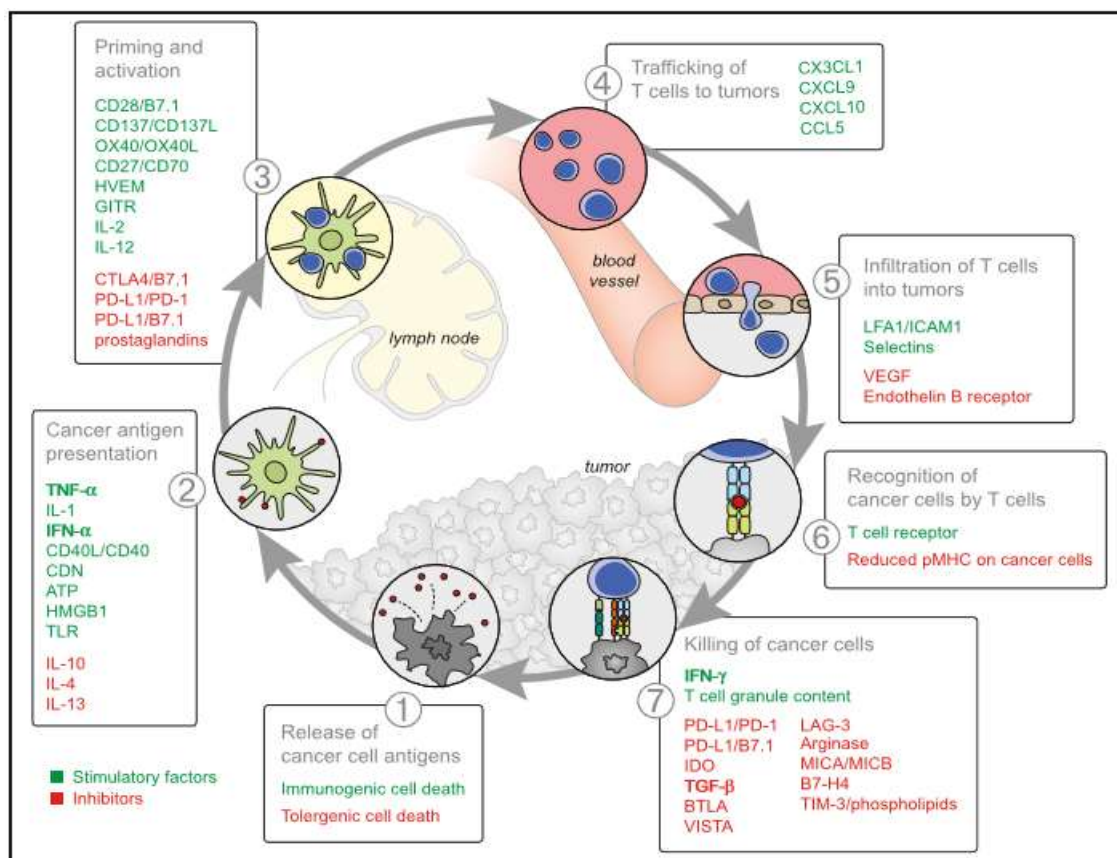


Figure 2 : différents facteurs *stimulant* ou *inhibant* les étapes du processus de destruction tumorale par notre système immunitaire. (9)
 L'expression de PD-1 au sein de la tumeur se produit à l'étape 7 du processus.

Les données ont montré un taux de réponse significatif aux traitements par anti-PD1 (inhibiteurs du PD-1) qui ont été développés à la suite de cette découverte. La réponse aux traitements semble également stable dans la durée.

De nombreuses études documentent une amélioration de la survie des patients comparée à celle d'une chimiothérapie conventionnelle (*cf*r **Table 1**). Parmi elles, nous retrouvons des

études réalisées sur des mélanomes, des carcinomes rénaux, des cancers du poumon non à petites cellules, des carcinomes de la région tête et cou (22, 26).

Target	Drug	Condition	Treatment regimen	Treatment in control group	Objective response rate	Complete response rates	Overall survival (months)	Progression-free survival (months)	Grade 3-5 adverse events	Participants treated (and controls)	Reference		
Programmed cell death protein 1 (PD-1) signaling	PD-1 Nivolumab (IgG4a)	Melanoma (stage III/IV)	3 mg/kg/2 weeks	(vs combination therapy)	43.7%	8.9%	n/a	6.9	16.3%	316	(67)		
		Renal cell carcinoma (metastatic)	3 mg/kg/2 weeks	10 mg/day Everolimus	25% (4% control)	1% (<1% control)	25.0 (19.6 control)	4.6 (4.4 control)	19% (27% control)	406 (397 control)	(68)		
		Hodgkin's lymphoma (relapsed/refractory)	3 mg/kg/2 weeks	n/a	87%	17%	n/a	86% at 24 weeks	22%	23	(69)		
		Squamous-cell carcinoma of the head and neck (recurrent)	3 mg/kg/2 weeks	Single-agent systemic therapy (methotrexate, docetaxel, or cetuximab)	13.3% (5.8% control)	2.5% (0.8% control)	36.0%/1 year (16.6% control)	19.7% at 6 months (9.9% control)	13.1% (35.1% control)	240 (121 control)	(70)		
		Non-small cell lung cancer	3 mg/kg/2 weeks	Docetaxel	19% (12% control)	1% (<1% control)	12.2 (9.4 control)	2.3 (4.2 control)	10% (54% control)	292 (290 control)	(71)		
			3 mg/kg/2 weeks	Docetaxel	20% (9% control)	1% (0% control)	9.2 (6 control)	3.5 (2.8 control)	7% (55% control)	135 (137 control)	(72)		
		Ovarian cancer (platinum-resistant)	1 or 3 mg/kg/2 weeks	n/a	15%	10%	20	3.5	40%	20	(62)		
		Pembrolizumab (IgG4a)	Pembrolizumab (IgG4a)	Melanoma (stage III/IV)	10 mg/2 weeks or 3 weeks	(vs ipilimumab)	33.7–32.9%	5.0–6.1%	n/a	5.5–4.1	13.3–10.1%	279–277	(73)
				Merkel cell carcinoma	2 mg/kg/3 weeks	n/a	56%	16%	n/a	65% at 6 months	15%	26	(74)
				Non-small cell lung cancer	2 mg/kg/3 weeks 10 mg/kg/3 weeks 10 mg/kg/2 weeks	n/a	19.4%	n/a	12	3.7	9.5%	495	(75)
200 mg/2 weeks (PD-L1 + patients only)	Platinum-based chemotherapy				44.8 (27.8% control)	n/a	80.2% at 6 months (72.4% control)	10.3 (6 control)	28.6% (53.3% control)	154 (154 control)	(76)		
2 or 10 mg/kg/3 weeks (PD-L1 + patients only)	Docetaxel				18/18% (9% control)	0/0% (0% control)	10.4/12.7 (8.5 control)	3.9/4.0 (4.0 control)	13/16% (35% control)	345/348 (343 control)	(77)		
Progressive metastatic colorectal cancer	10 mg/kg/every 2 weeks	n/a	40/0%	0/0%	>5 months/5	>5/2.2	41% overall	10/18	(78)				
Pidilizumab (IgG1)	B cell lymphoma (after autologous stem cell transfer)	1.5 mg/42 days	n/a	51%	34%	85% at 18 months	72% at 18 months	n/a	66	(79)			

Table 1 : réponses au traitement par anti-PD1 (« Objective response rate ») et survie (« Overall survival ») comparée à celles observées dans le cadre d'une chimiothérapie classique. (26)

Malgré ces résultats prometteurs, il reste toute une série de patients qui ne répondent pas au traitement. Dans le chapitre suivant, nous détaillons les facteurs influençant cette réponse.

III. FACTEURS CORRÉLATIFS DE RÉPONSE AUX ANTI-PD1

Selon cette même revue d'articles (26), plusieurs mécanismes pourraient être corrélés à une réponse moins importante des anti-PD1. Parmi eux, nous retrouvons la prise d'antibiotiques, un certain type de micro-environnement tumoral et différentes mutations au niveau des cellules tumorales. Les deux derniers mécanismes sont importants dans le cadre de ce mémoire et dès lors développés plus en profondeur dans ce chapitre.

A. Microenvironnement tumoral

La tumeur peut échapper à la surveillance du système immunitaire en maintenant un microenvironnement immunosuppresseur, notamment en recrutant des lymphocytes T régulateurs (Treg, qui régulent négativement la réponse immunitaire) ou en produisant des molécules qui suppriment l'action anti-tumorale de notre système de défense (19,25).

Selon Taube et al. (29) l'expression de PD-L1 par la tumeur est corrélée avec une réponse significative ainsi qu'avec un bénéfice clinique des anti-PD1. Cette expression serait d'ailleurs le meilleur facteur pronostic de la réponse à ce type de traitement. Malgré tout, différentes études ont également montré qu'il est possible d'obtenir une bonne réponse aux anti-PD-1 même en l'absence de l'expression de PD-L1 par la tumeur. Il faut préciser que ces résultats sont difficilement interprétables, notamment parce qu'ils sont influencés par le nombre de patients dans les études, ainsi que par le choix de la valeur « seuil » pour décider si on considère la tumeur comme exprimant ou non le PD-L1, deux paramètres variant fortement d'une étude à l'autre.

Dans les mélanomes, la présence de lymphocytes T CD8 + (= LyT CD8+, cytotoxiques) à l'intérieur de la tumeur serait associée à l'expression de l'axe inhibiteur PD1 – PD-L1 et corrélée à une bonne réponse aux anti-PD1.

Selon de récentes études, la réponse aux anti-PD-1 pourrait également être altérée par la présence d'IDO-1 (indoleamine 2,3-dioxygénase) dans le micro-environnement tumoral. Cette découverte pourrait amener au développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique.

a. Action de l'IDO-1 sur les mécanismes antitumoraux :

L'IDO est une enzyme intervenant dans le processus de transformation du Tryptophane en Kynurenine. C'est une enzyme importante dans le système de rétrocontrôle de la réponse immunitaire qui nous permet d'éviter une réponse excessive et néfaste pour notre organisme. Elle induit donc une sorte d'immunosuppression via 2 mécanismes (20) (cfr **figure 3**) :

1) En induisant une déplétion locale en tryptophane :

Cette déplétion locale va provoquer une activation de la voie de la GCN2 kinase qui amènera à une inhibition de l'activité du complexe mTOR (mammalian target of rapamycin). En effet, la voie GCN2 est sensible à la quantité d'acides aminés se trouvant dans son environnement : via la déplétion en tryptophane, le taux d'acides aminés diminue, ce qui provoque ces différents effets.

L'activation de la voie GCN2 par cette déplétion induit différents évènements en fonction de la cellule dans laquelle elle est activée. Dans les lymphocytes T CD8+, son activation induit un arrêt du cycle cellulaire et une anergie fonctionnelle. En ce qui concerne les lymphocytes T CD4+ naïfs (non activés), cette activation bloque leur différenciation en TH17 (pro-immunogène), promeut leur différenciation en lymphocytes Treg *de novo* et promeut l'activité suppressive des Treg matures.

2) En augmentant la production de dérivés de la kynurenine :

Les dérivés de la kynurenine sont des ligands du récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR). Ce récepteur est un facteur de transcription qui peut donner différentes réponses en fonction du ligand qui le lie.

Dans le cas des métabolites de la kynurénine, il en résulte une immunosuppression via la différenciation des lymphocytes T CD4+ en Tregs, une augmentation des fonctions suppressives des Tregs matures et une suppression de l'activité et de la différenciation des lyT CD4+ en Th17.

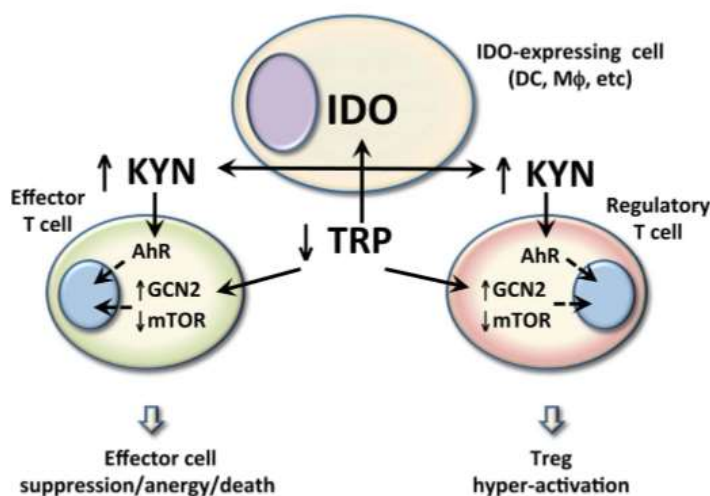


Figure 3 :
mécanismes
d'immunosuppression induite
par la production d'IDO1. (20)
A gauche : effets sur les lyT
effecteurs.
A droite : effets sur les lyT
régulateurs.

Les tumeurs utilisent ces mécanismes de rétrocontrôle à leur avantage, afin d'entretenir un environnement immunotolérant et de pouvoir échapper au contrôle immunitaire. Plusieurs études ont déjà montré que les tumeurs sur-exprimant cette enzyme ont un avantage de survie (correspondant donc à un moins bon pronostic pour les patients) par rapport à celles qui ne la sur-expriment pas.

b. Deux mécanismes d'expression de l'IDO-1 dans les tumeurs :

Comme mentionné ci-dessus, le microenvironnement tumoral est un milieu anormal dans lequel nous pouvons retrouver une sur-expression de l'IDO. Cette expression excessive peut

soit provenir des cellules associées à la tumeur, comme les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les cellules endothéliales (expression extrinsèque), soit des cellules tumorales en elles-mêmes (expression intrinsèque). Dans ce dernier cas, les cellules tumorales expriment cette enzyme selon 2 mécanismes distincts : soit l'expression est induite par les lymphocytes T infiltrants (résistance adaptative), soit la tumeur sur-exprime l'enzyme de façon constitutive, à la suite d'une mutation par exemple (expression constitutive) (30), ce qui a pour conséquence le blocage de l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes.

1) Résistance adaptative :

Dans ce cas de figure-ci, ce sont surtout les cellules tumorales se trouvant en périphérie de la tumeur qui produisent de l'IDO1. Ce phénomène est dû au fait que les lymphocytes T qui infiltrent la tumeur produisent de l'IFN- γ (interféron gamma) qui est un inducteur important de l'IDO1. De ce fait, les cellules tumorales aux alentours des lymphocytes T vont commencer à exprimer cette enzyme, ce qui leur permet d'échapper à l'effet destructeur de ceux-ci.

Le mécanisme d'expression de l'IDO1 est, dans ce cas-ci dépendant de l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes T (**figure 4, gauche**).

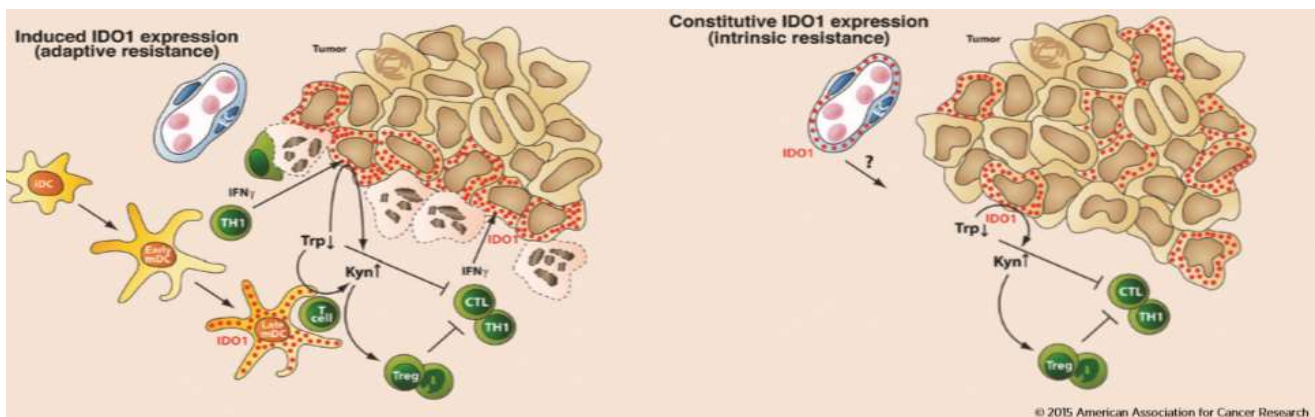


Figure 4 : Explication schématique des deux mécanismes d'expression d'IDO1 par les cellules tumorales. A gauche : expression induite par la présence de lymphocytes T. A droite : expression constitutive par les cellules tumorales. (30)

2) Expression constitutive :

Dans ce cas-ci, les cellules tumorales expriment l'IDO1 de façon constitutive. Il n'y a donc pas d'infiltration par les lymphocytes T CD8+, cette expression d'IDO1 les empêchant d'intervenir. Ces tumeurs sont de ce fait appelées « froides » car elles ne sont pas infiltrées par les lymphocytes T, à l'opposé des tumeurs « chaudes » (**figure 4, droite**).

Le mécanisme d'expression de l'IDO1 est différent dans ce cas-ci par rapport à celui de l'expression induite. Une étude publiée en juillet 2017 montre que cette expression est menée par la COX-2 (cyclooxygénase-2) (14). La sur-expression de l'IDO1 dans les tumeurs « froides » proviendrait alors de l'expression de COX-2 en amont, via les voies de signalisation PKC et PI3K. Le mécanisme d'expression de l'IDO1 serait donc le suivant :

1. Une mutation activatrice de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) amène à l'expression constitutive de COX-2.
2. L'expression de COX-2 amène à la production de PGE₂. (Prostaglandine E2)
3. PGE₂ est reconnu par le récepteur EP4 (prostaglandin E2 receptor 4), ce qui déclenche 2 voies de signalisation différentes qui induisent la transcription d'IDO1 :
 - a. La voie de signalisation PIK3 : PIK3 active AKT qui active mTOR. mTOR active alors le facteur de transcription ETV4 qui vient se lier au promoteur de l'IDO1.
 - b. La voie de signalisation PKC : PKC désactive GSK3β qui phosphoryle normalement la β-catenine, ce qui provoque sa dégradation. Une désactivation de GSK3β amène donc à un excès de β-catenine active qui se lie et active le promoteur de l'IDO1.
4. Expression de l'IDO1.

Nous savons déjà qu'un grand nombre de tumeurs portent des mutations sur les voies des MAPK et PI3K, ce qui pourrait donc favoriser l'expression constitutive de l'IDO1 (figure 5).

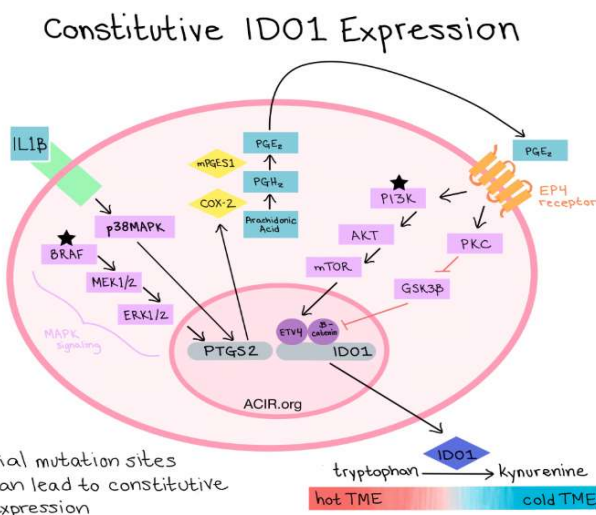


Figure 5 :
Explication schématique des différentes voies de signalisation intra-cellulaires amenant à l'expression constitutive de l'IDO1 par les cellules tumorales. (3)

c. IDO- inhibiteurs et COX2 -inhibiteurs :

À la suite de la découverte du rôle de l'IDO1 dans le pronostic vital chez les patients traités par des anti-PD1, plusieurs études ont été conduites afin de prouver l'utilité des agents inhibiteurs de l'IDO1 en association avec ce genre de traitement.

L'étude sur laquelle nous travaillons dans le cadre de ce mémoire est menée par Benoit Van den Eynde et ses collaborateurs. Ceux-ci se sont basés sur le fait que nous avons déjà à disposition un médicament facilement accessible qui inhibe la COX-2, le celecoxib, qui pourrait, de ce fait, inhiber l'expression de l'IDO1 dans le cas de son expression constitutive. Contrairement aux inhibiteurs de l'IDO1, le celecoxib ne pourrait donc agir qu'uniquement sur les tumeurs froides (non infiltrées par les lymphocytes T) et dont l'expression de l'IDO1 provient donc bien de la COX-2 et non pas de l'INF- γ .

Des tests en laboratoire ont déjà été conduits pour vérifier cette hypothèse. Des tests sur des mélanomes et autres tumeurs ont donné des résultats concluant sur la production d'IDO1. D'autres tests sur des souris de laboratoire montrent que l'administration de celecoxib induit un « réchauffement » (donc une infiltration) et souvent un rejet de la tumeur.

Ayant fini cette étape de l'étude, les auteurs veulent à présent débiter un test sur l'Homme qui combine les anti-PD1 avec le celecoxib. Pour recevoir ce traitement expérimental, les patients doivent donc être porteurs d'une tumeur froide, comme déjà dit précédemment.

Avant de commencer cette étape, il nous faut d'abord trouver un modèle de tumeur dans lequel ce phénotype se retrouve de manière significativement fréquente.

Le mélanome est la tumeur ayant le taux le plus élevé d'expression du PD1. L'équipe de Van Den Eynde a cependant déjà diagnostiqué que le taux de tumeurs froides exprimant l'IDO1 parmi les mélanomes n'était pas satisfaisant. À l'inverse, le cancer de l'endomètre semble avoir un nombre significatif de tumeurs ayant le phénotype recherché. Malheureusement, les anti-PD1 ne sont pas remboursés dans le cadre de ce cancer. Nous devons donc rechercher ce phénotype parmi d'autres types tumoraux pour définir dans le.s.quel.s le celecoxib pourrait être utilisé.

B. Mutations

a. Introduction

Comme le microenvironnement, certaines mutations au sein de la tumeur peuvent participer au manque de réponse aux anti-PD1.

Les plus étudiées et répandues à l'heure actuelle sont celles empêchant l'expression du CMH de classe I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I) à la surface des cellules cancéreuses. En perdant cette expression, la tumeur évite de se faire reconnaître par les lymphocytes T cytotoxiques. Selon Nowicki TS et al. (21), plusieurs études ont déjà été réalisées dans ce sens, montrant une corrélation entre le manque de réponse aux anti-PD1 et anti-PDL1 avec des mutations de la β 2-microglobuline ainsi qu'avec différents changements épigénétiques, comme des hyperméthylation ou acétylation d'histones. Nous développons plus en détails le rôle de ce CMH de classe I dans les sous-chapitres qui suivent.

A noter qu'il existe d'autres mutations associées à une réponse moins importante des anti-PD1. Certaines touchent la voie stimulatrice des lymphocytes passant par l'IFN- γ . Une récente étude de Hugo W. et al. (15) a également mis en évidence une certaine signature génique de mélanome lui conférant une résistance innée aux anti-PD1. Cette signature est associée à une augmentation de l'expression de gènes intervenant dans l'angiogenèse, la cicatrisation, la transition mésenchymateuse, l'adhésion cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire.

b. Mécanisme de reconnaissance lymphocytaire des cellules tumorales (4,12,13)

i. Introduction :

La reconnaissance des cellules tumorales par notre système immunitaire est une étape cruciale de notre mécanisme de défense contre le cancer. Si nous reprenons la **figure 1** illustrée au début de cette introduction, il s'agit de la 6^{ème} étape du processus.

La reconnaissance des cellules tumorales se fait via un mécanisme particulier reprenant différents acteurs :

- D'un côté, la cellule tumorale qui présente à sa surface des antigènes peptidiques via les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), également appelé Human Leucocytes Antigen (HLA), de classe I.
- De l'autre, le récepteur T des cellules lymphocytaires T cytotoxiques (également nommés Lymphocytes T CD8+) qui va se lier à l'ensemble formé par le CMH de classe I et l'antigène peptidique.

Cette reconnaissance va induire une série de réactions en chaîne dans le cytoplasme des lyT CD8+ qui amènera à la destruction de la cellule à laquelle celui-ci est lié.

ii. Présentation CMH I – peptide

1) Complexe Majeur d’Histocompatibilité de classe I :

Le CMH de classe I est un complexe exprimé par la plupart des cellules de notre corps. Il est formé de 2 chaînes (**figure 6**):

- Une chaîne alpha constituée de 3 parties produites au départ de gènes se trouvant sur un locus génique particulier au niveau du bras court du chromosome 6. Il existe un polymorphisme de ces gènes, ce qui explique les différences inter-individuelles de CMH. Les gènes classiques du CMH sont au nombre de trois et sont nommés HLA-A, HLA-B et HLA-C. Chaque allèle donnera un CMH-I différent. Chaque individu exprime donc entre 3 et 6 CMH de classe I différents à la surface de leurs cellules.
- Une chaîne beta non polymorphique appelée beta 2-microglobuline, provenant d’un gène se trouvant à l’extérieur du locus génique, au niveau du chromosome 15.

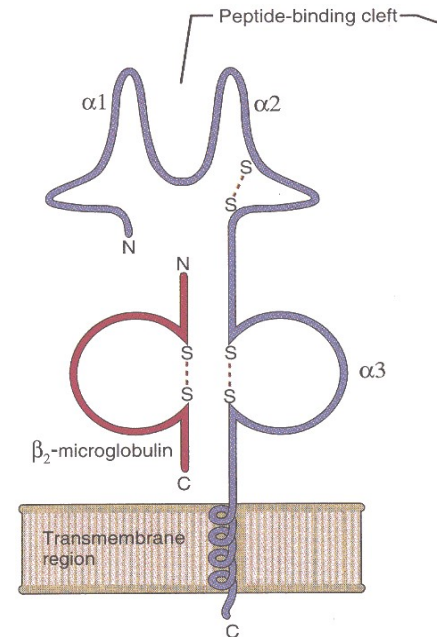


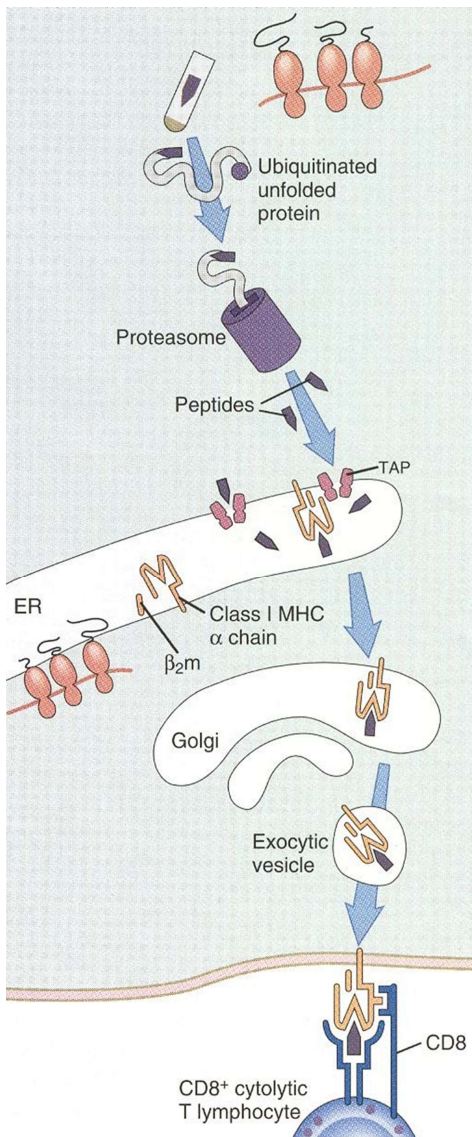
Figure 6 : Structure schématique du CMH de classe I. (13)

Ces deux chaînes sont synthétisées à l’intérieur du réticulum endoplasmique de la cellule. C’est à cet endroit qu’elles sont liées de façon non-covalente entre elles et reliées à un antigène peptidique pour former le complexe CMH-peptide qui sera reconnu par le récepteur des lymphocytes T. Cela se fait à l’aide de chaperons comme ERp57, Calnexine et calréticuline.

2) Antigène peptidique :

Les protéines cytoplasmiques sénescents doivent être dégradées. Pour se faire, elles se feront d’abord marquées par ubiquitination. Ces protéines ubiquitinées sont dirigées vers les protéasomes où elles seront dégradées en peptides de longueur variable.

Les protéasomes génèrent ces peptides avec des caractéristiques qui leur permettent de se lier aux molécules du CMH de classe I. Certaines cytokines pro-inflammatoires, en particulier l’interféron, améliorent l’efficacité du processus d’apprêtement en faisant en sorte que les peptides sortant du protéasome aient une meilleure conformation pour venir se loger dans les molécules du CMH I.



Ces peptides sont transportés du cytosol vers le réticulum endoplasmique (ER sur **figure 7**) par un transporteur dépendant de l'ATP, nommé TAP, qui est inséré dans la membrane du ER.

Là, le peptide rencontrera et se liera à l'hétérodimère formé par les 2 chaînes assemblées du CMH de classe I.

Les molécules de CMH I liées aux peptides seront stables et sortiront du RE à travers le complexe de Golgi vers la surface cellulaire.

Figure 7 : Schéma des étapes d'apprêtement de l'antigène peptidique à la surface cellulaire. (13)

En temps normal les peptides exposés par le CMH appartiennent au « soi » et le système immunitaire ne réagira pas contre eux.

Par contre, les multiples mutations causées par la prolifération massive des cellules tumorales vont engendrer une production de protéines légèrement différentes de celles retrouvées habituellement dans les cellules saines. Celles-ci seront dégradées et les peptides

qui en découleront seront présentés à la surface de la cellule par le CMH de classe I. Par ces changements peptidiques, notre système immunitaire ne considérera plus ces peptides comme faisant partie du « soi ». Dès lors, les lyT cytotoxiques seront aptes à les reconnaître.

3) Reconnaissance CMH-peptide avec les lymphocytes T :

La liaison des lymphocytes T cytotoxiques avec le complexe CMH1-peptide se fait selon 2 axes :

- Via le Tcell receptor qui a une double spécificité. Celui-ci se lie à la fois à certaines parties du CMH I (MHC sur **figure 8**) et à certaines parties du peptide qu'il présente. Pour un individu donné, les différents clones de lymphocytes T ne peuvent déceler des peptides que lorsque ceux-ci sont présentés par les molécules du CMH de l'individu. Cette propriété porte le nom de restriction par le CMH (24).

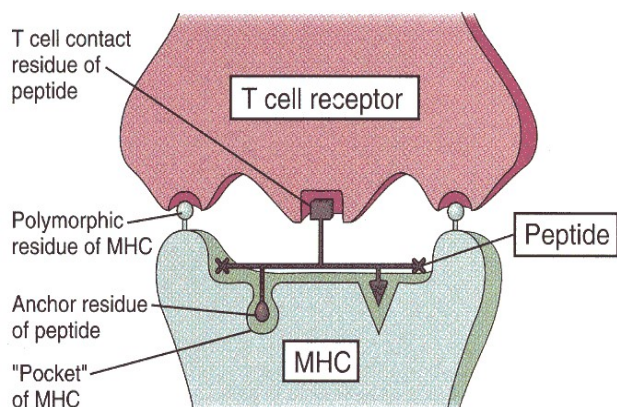


Figure 8 :

liaison TcellR et CMHI-peptide.

Certains résidus (aa) polymorphiques du CMH déterminent les spécificités de liaison pour les peptides en formant des structures appelées poches (pockets). Ils interagissent avec des résidus complémentaires sur le peptide appelés résidus d'ancre (anchor). D'autres résidus polymorphiques du CMH et quelques résidus du peptide forment une structure qui est reconnue par les lymphocytes T. (13)

- Via le CD8, qui se lie à la chaîne alpha 3 du CMH I.

Cette liaison va induire une série de réactions cytoplasmiques en chaîne à l'intérieur du lymphocyte T qui aboutira à la production de protéines cytotoxiques induisant l'apoptose de la cellule tumorale.

iii. Perte de la reconnaissance immunitaire

Comme dit plus haut (cfr II.B), la perte d'expression du CMH I peut amener à une moins bonne réponse tumorale aux anti-PD-1.

Les causes de cette perte de reconnaissance sont multiples (21) :

- Une perte d'expression ou mutation des chaînes lourdes du CMH I.
- Une perte d'expression ou mutation de la β 2-microglobuline.
- Un problème au niveau de la constitution ou du bon fonctionnement du protéasome.
- Un problème au niveau de l'expression ou du bon fonctionnement des TAP (Transporters Associated with antigens Processing).
- Une régulation négative de l'expression de l'ensemble de ces molécules.

Le plus souvent la perte totale d'expression du HLA-I provient de la somme de plusieurs des mécanismes cités ci-dessus.

Plusieurs traitements permettant de contrer ces différents mécanismes ont déjà été testés, certains donnant de bons résultats (21).

Le travail réalisé par le Dr Alexia Degraewe et l'équipe du professeur Baurain sur les mélanomes en 2018 a déjà mis en évidence une perte importante voir complète du CMH I dans près de 50% des mélanomes analysés. Une grande partie de ceux-ci était associée à une perte d'expression de la β 2-microglobuline. (10) Cette étude a également mis en lumière qu'une

perte d'expression de la $\beta 2m$ seule empêchait l'acheminement de la chaîne lourde du HLA-I à la surface cellulaire. Ceci a été illustré par l'observation d'un pattern d'expression particulier de ces molécules dans cette situation, représenté à la **figure 9**. Nous pouvons y observer une accumulation du HLA-I dans le cytoplasme cellulaire, la perte de la $\beta 2m$ empêchant son expression membranaire.

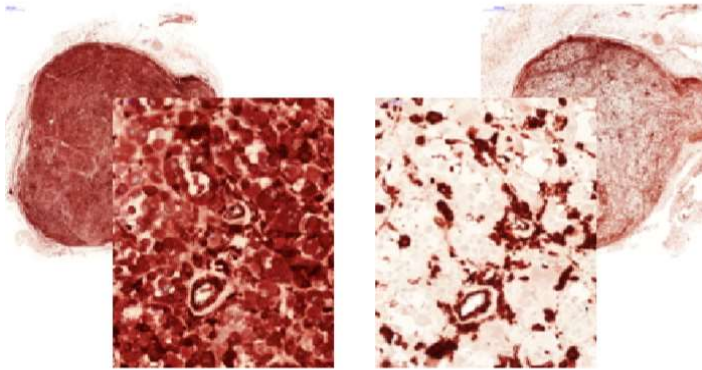


Figure 9 :
illustration d'une métastase d'un mélanome. Sur la gauche : expression principalement cytoplasmique et non membranaire du HLA-I. Sur la droite : le marquage de la $\beta 2m$ ne se retrouve qu'au niveau des cellules non tumorales, les cellules tumorales ayant totalement perdu l'expression de la molécule. (10)

Plusieurs autres études ont déjà démontré une perte importante de l'expression du HLA-I dans différents types tumoraux, jusqu'à 90% pour certains (12).

iv. Petite note à propos des cellules NK (17)

Les cellules NK (Natural Killer) font partie de notre immunité innée. Elles ont la capacité d'induire la mort cellulaire (apoptose) des cellules tumorales sans avoir besoin d'une activation préalable et de manière indépendante à la présentation d'antigène.

Il existe à la surface de ces cellules NK des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs de sa fonction lytique. Lors de sa rencontre avec une autre cellule, la lyse de celle-ci ne sera enclenchée que si les signaux activateurs surpassent les signaux inhibiteurs.

Le signal inhibiteur le plus important de ces cellules est la présence du HLA-I à la surface cellulaire via son interaction avec les récepteurs KIR (killer cell Ig-like receptor). Ces récepteurs reconnaissent les différents allèles du HLA-I. Ceci est représenté dans la partie gauche de la **figure 10**.

En perdant totalement l'expression du HLA-I à leur surface, les cellules tumorales échappent à l'action des lymphocytes T cytotoxiques mais n'ont plus le signal inhibiteur leur permettant de se protéger des cellules NK.

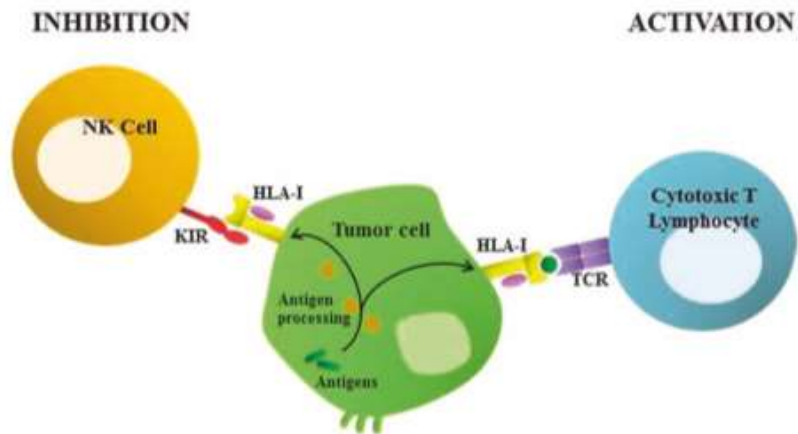


Figure 10 :

Liaison HLA-I avec cellules NK. Les molécules HLA-I se trouvant à la surface des cellules tumorales interagissent avec les récepteurs inhibiteurs des cellules NK et inhibent leur fonction (12).

Plusieurs mécanismes permettent à la tumeur d'échapper à leur attaque. Parmi ceux-ci :

- La perte d'une partie des gènes composant le HLA-I. Certaines de ces pertes n'empêchent pas l'acheminement du complexe HLA-I vers la surface cellulaire. Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK reconnaissant plusieurs allèles du HLA-I sans restriction particulière continueront à être inhibés. Cependant, ces pertes peuvent induire une moindre voire non-reconnaissance des cellules tumorales par le lymphocyte T cytotoxique.
- L'inhibition des cellules NK par le microenvironnement tumoral.

Nous ne détaillerons pas ces différents mécanismes, ceux-ci s'écartant des objectifs de ce mémoire. Il reste cependant important d'être conscient de leur existence.

OBJECTIFS

Comme développé dans l'introduction, il existe plusieurs facteurs corrélatifs de la réponse aux anti-PD1. Ceux-ci peuvent se regrouper principalement sur deux sortes de mécanismes : ceux liés au microenvironnement tumoral et ceux liés aux mutations au sein des cellules tumorales. L'objectif initial de ce mémoire était de s'intéresser au premier groupe, en portant notre attention sur l'expression constitutive de la molécule immunosuppressive IDO-1 par les cellules tumorales. En effet, ce mémoire s'inscrivait dans une étude de plus grande ampleur dont le but final serait d'utiliser le celecoxib pour pallier le manque de réponse de certaines tumeurs aux anti-PD1.

L'objectif initial de ce mémoire était donc de trouver un/des type.s tumoral.aux dans le.s.queles nous retrouvions fréquemment le phénotype sur lequel le celecoxib agit, c'est-à-dire des tumeurs froides exprimant l'IDO-1. Ceci nous aurait donc permis de déterminer sur quel.s type.s de tumeur.s ce traitement pourrait être efficace.

Pour sélectionner les tumeurs présentant ce phénotype, nous avons impérativement besoin du scanner fluorescent. Comme stipulé dans notre « préambule », cet équipement nous a fait défaut à un moment crucial de notre étude.

Afin de mettre à profit le matériel tumoral à notre disposition, il a dès lors été décidé de réorienter l'objectif de ce mémoire vers les mécanismes de l'autre groupe, à savoir les mutations au sein des cellules tumorales, et plus spécifiquement celles empêchant la reconnaissance de ces cellules par les lymphocytes T cytotoxiques.

La question scientifique posée sera donc : **« La perte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 est-il un phénomène fréquent au sein des cellules tumorales de différents types tumoraux ? »**

On notera que cette nouvelle approche reste pertinente dans le contexte global de la problématique de base du mémoire. En effet, en supposant que nous aurions pu éliminer le rôle joué par le microenvironnement tumoral en ciblant l'IDO-1 via le celecoxib, un manque potentiel d'efficacité de cette nouvelle thérapeutique pourrait être lié à l'action combinée de la perte du complexe CMH-I (ou HLA-I) à la surface cellulaire.

MATERIEL

Pour cette étude, 10 échantillons tumoraux de chaque type tumoral ont été utilisés : ORL, poumon, rein et vessie. Ces échantillons étaient préservés dans de la paraffine.

Différents marquages immunohistochimiques ont été utilisés :

- Un marqueur anti-pancytokératine qui nous permet de délimiter les zones tumorales sur les échantillons. Les cytokératines sont des molécules présentes à la surface des cellules dérivées de tissus épithéliaux. Les tumeurs que nous avons analysées proviennent toutes de cellules épithéliales et expriment donc ces cytokératines à leur surface (16).
- Un marquage révélant le HLA de classe I, qui nous permet de voir si celui-ci est correctement exprimé dans la tumeur et, si oui, s'il se trouve bien au niveau des membranes cellulaires et non bloqué dans le cytoplasme des cellules tumorales.
- Un marquage révélant la β 2-microglobuline. Comme pour le HLA, celui-ci nous permet de vérifier la bonne expression membranaire de la molécule.

Pour se faire, les échantillons ont été colorés à l'aide des anticorps monoclonaux EMR8-5 contre la chaîne lourde HLA-ABC (Abcam), D8P1H (CST) qui reconnaît la chaîne légère β 2-m et AE1 / AE3 (Dako), spécifique des cytokératines.

METHODES

La méthodologie utilisée dans ce projet peut être divisée en plusieurs étapes (**figure 11**).



Figure 11 : Différentes étapes de notre méthodologie.

I. SÉLECTION DES TUMEURS

Nous avons recherché les 40 blocs tumoraux nécessaires à cette étude parmi les différents échantillons stockés dans la banque biologique des Cliniques Universitaires Saint-Luc.

La **table 2** reprend la liste des échantillons tumoraux sélectionnés après analyse des dossiers histologiques des différents patients et des lames correspondantes.

Organe	N°	Type
Vessie (V)	1	Carcinome urothélial infiltrant
	2	Carcinome urothélial infiltrant
	3	Carcinome urothélial avec aspects rhabdoïdes
	4	Carcinome urothélial papillaire de haut grade
	5	Carcinome urothélial
	6	Carcinome urothélial micro-papillaire de haut grade
	7	Carcinome urothélial papillaire
	8	Carcinome urothélial micro-papillaire de haut grade
	9	Carcinome urothélial papillaire de haut grade infiltrant
	10	Carcinome urothélial avec composante micro-papillaire focale
Rein (R)	1	Carcinome à cellules claires
	2	Carcinome à cellules claires
	3	Carcinome à cellules claires
	4	Carcinome à cellules claires
	5	Carcinome à cellules claires
	6	Carcinome à cellules claires
	7	Carcinome papillaire de type I
	8	Carcinome à cellules chromophobes
	9	Carcinome urothélial
	10	Carcinome à différenciation sarcomatoïde
ORL (O)	1 : langue	Carcinome épidermoïde, moyennement-peu différencié, kératinisation focale
	2 : vallécule épiglottique	Carcinome épidermoïde, moyennement-peu différencié
	3 : joue	Carcinome épidermoïde, moyennement différencié, non kératinisant
	4 : épiglotte	Carcinome épidermoïde, peu différencié, non kératinisant
	5 : Plancher buccal	Carcinome épidermoïde, moyennement différencié, kératinisant, infiltrant
	6 : arythénoïde droite	Carcinome épidermoïde, bien-moyennement différencié, kératinisant
	7 : larynx	Carcinome épidermoïde, moyennement-peu différencié, infiltrant
	8 : peau cervicale antérieure	Carcinome épidermoïde, bien différencié, kératinisant
	9 : corde vocale	Carcinome épidermoïde, bien-moyennement différencié, kératinisant
	10 : sinus maxillaire	Carcinome épidermoïde, peu différencié
Poumon (P)	1	ADC, composante acinaire prédominante
	2	ADC papillaire, focalement mucoïde et micro-papillaire
	3	Carcinome épidermoïde
	4	Carcinome épidermoïde moyennement à peu différencié
	5	ADC, focalement micro-papillaire et solide
	6	ADC acinaire, papillaire et focalement micro-papillaire
	7	ADC solide
	8	Carcinome épidermoïde infiltrant
	9	Carcinome épidermoïde moyennement différencié, kératinisant
	10	Carcinome épidermoïde

Table 2 : Références et types d'échantillons tumoraux sélectionnés.

II. PRÉPARATION DES LAMES À PARTIR DES BLOCS TUMORAUX

La découpe des blocs tumoraux doit elle-même se faire en suivant différentes étapes. Celles-ci sont représentées schématiquement dans la **figure 12**.



Figure 12 : Etapes de préparation des lames à partir de blocs tumoraux.

A. Fixation :

Cette étape permet de fixer les différents composants des échantillons dans leur état physiologique et d'éviter leur dégradation.

Pour cela, les blocs sont plongés dans une solution de formaldéhyde 4% à 4°C à raison de 1 heure par millimètre d'épaisseur de l'échantillon.

B. Inclusion de paraffine :

Afin de pouvoir couper les blocs en fines tranches, nous devons solidifier les échantillons avec de la paraffine.

Celle-ci étant une substance hydrophobe, il faut d'abord déshydrater les tissus. Pour se faire, un automate traite les tissus en les faisant passer dans des bains d'éthanol en concentration croissante puis de toluène et enfin de paraffine liquide.

C. Découpe :

La découpe des tissus inclus en paraffine - en sections d'une épaisseur de 5 µm - se fait à l'aide d'un microtome.

Afin de retirer les plis qui peuvent se faire lors de la découpe, nous utilisons un bain-marie rempli d'eau distillée à 40°C. Il est ensuite nécessaire d'enlever l'excès d'eau et de sécher les coupes à 60°C pendant 15 minutes.

III. IMMUNOMARQUAGE :

Afin de mettre en évidence les différents antigènes que nous voulons analyser, nous utilisons différentes techniques d'immunomarquage.

L'immunomarquage utilise le principe de reconnaissance anticorps-antigènes afin de fixer le marqueur uniquement sur les antigènes que nous voulons observer.

La technique utilisée dans ce mémoire est l'immunohistochimie classique.

Le marquage se fait selon différentes étapes, reprises ci-dessous (*cf* **annexe 1** pour protocole détaillé) :

- 1) Déparaffinage et réhydratation.
- 2) Blocage de l'activité des peroxydases endogènes 20 min avec du peroxyde d'hydrogène à 3% dans du méthanol.
- 3) Démasquage des antigènes par chauffage au micro-ondes dans un tampon citrate 10 mM, pH 5,7.
- 4) Blocage des sites aspécifiques, qui risqueraient de lier l'anticorps primaire et fausseraient les résultats, en incubant pendant 30 minutes les lames dans une solution de TBS contenant 1% de BSA et 0.1% de Tween20.
- 5) Incubation avec l'anticorps primaire pendant 1 heure dans une solution de TBS contenant 1% de BSA et 0.1% de Tween20.
Les différents anticorps primaires utilisés sont détaillés dans le chapitre *Matériel*.
- 6) Incubation avec la solution commerciale Envision (Agilent) correspondant à l'anticorps primaire (polymères conjugués à des peroxydases et à des anticorps secondaires anti-immunoglobulines de souris ou de lapins).
- 7) Révélation avec le substrat de la peroxydase (DAB / Vector red).
- 8) Contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline.

Ces différentes étapes sont séparées par des étapes de lavage, sauf entre le blocage et l'incubation par l'anticorps primaire.

Cette technique est pratique mais limitée car elle permet difficilement de différencier plusieurs antigènes (révélés avec des enzymes différentes et des substrats de couleur différente) sur une même coupe. Elle ne permet donc pas de comparer l'ensemble des marquages sur une même lame, engendrant dès lors de potentiels problèmes d'interprétation ultérieurement.

IV. SCAN ET ANALYSE DES LAMES :

Les lames immunomarquées ont été digitalisées au grossissement x20 avec un scanner de lames SCN400 (Leica Biosystems).

Les marquages ont ensuite été quantifiés avec des applications logicielles ("APP") à l'aide de l'outil d'analyse d'images Author (version 2017.2, Visiopharm).

Les régions tumorales identifiées sur base du marquage pan-CK (pan-cytokératine) ont été délimitées manuellement et transposées sur les scans HLA-I.

Dans ces régions tumorales, le marquage HLA-I a ensuite été détecté à haute résolution (x20) en utilisant une méthode de classification par seuillage sur base de la coloration DAB (matrice HDAB-DAB du logiciel). Le seuil a été ajusté sur les régions représentatives marquées vs non marquées. Les mêmes paramètres ont été maintenus constants pour toutes les lames.

Les résultats ont été exprimés :

- 1) En % de surface marquée ((surface marquée / surface analysée)*100)
- 2) En intensité moyenne de marquage (intensité moyenne des pixels au-dessus du seuil)
- 3) En un indice de marquage (% surface marquée * intensité moyenne de marquage).

Nous ne nous sommes basés que sur le pourcentage de surface marquée pour la discussion de nos résultats, ce paramètre nous semblant être le plus relevant pour caractériser l'expression des différentes molécules.

En ce qui concerne la quantification du marquage β 2-microglobuline, il n'a été d'abord réalisé que sur les tumeurs considérées comme n'exprimant pas le HLA-I, l'intérêt de ce marquage étant de vérifier si la perte du complexe HLA-I pourrait être liée à la perte de la β 2-microglobuline. Nous l'avons finalement étendue à l'entièreté des échantillons afin de ne pas être biaisé dans notre analyse.

Le chapitre sur "HLA and cancer" du XII^{ème} atelier international d'Histocompatibilité (XII IHW) qui s'est tenu à Paris en 1996 a classifié les sections de tissu tumoral comme « positive » lorsque plus de 75% des cellules sont marquées, « hétérogène » quand le pourcentage de cellules marquées est situé entre 25% et 75% et « négative » lorsqu'il y a moins de 25% de cellules positives. Nous avons donc fixé le seuil d'expression à 25% de surface marquée.

Les résultats détaillés sont repris en **annexe 2 et 3**.

Nous avons ensuite regardé les scans des tumeurs considérées comme n'ayant pas perdu leur expression du HLA-I afin de vérifier la localisation de l'expression de cette molécule au niveau des cellules (membranaire ou cytosolique).

ANALYSE DES RESULTATS

Code	HLA % stained area	B2M % stained area	HLA	B2M
V1	48,6	29,5	H	H
V2	55,5	9,6	H	-
V3	65,6	41,8	H	H
V4	14,0	4,3	-	-
V5	60,8	40,3	H	H
V6	51,5	19,3	H	-
V7	51,1	12,9	H	-
V8	20,8	9,5	-	-
V9	43,1	17,2	H	-
V10	41,3	5,9	H	-
R1	47,5	26,1	H	H
R2	51,9	11,7	H	-
R3	71,5	68,3	H	H
R4	15,7	9,1	-	-
R5	68,1	59,9	H	H
R6	59,3	16,1	H	-
R7	71,7	51,7	H	H
R8	60,4	56,6	H	H
R9	28,3	24,5	H	-
R10	35,6	20,7	H	-
O1	38,4	28,5	H	H
O2	47,3	27,2	H	H
O3	71,2	38,0	H	H
O4	70,8	31,9	H	H
O5	80,8	33,7	+	H
O6	16,5	34,8	-	H
O7	32,6	12,4	H	-
O8	72,4	35,2	H	H
O9	48,5	34,8	H	H
O10	65,9	47,4	H	H
P1	55,8	33,0	H	H
P2	55,1	33,7	H	H
P3	46,0	35,0	H	H
P4	52,9	40,5	H	H
P5	52,1	27,4	H	H
P6	62,0	40,4	H	H
P7	67,7	52,9	H	H
P8	63,4	36,1	H	H
P9	66,6	49,8	H	H
P10	67,5	44,4	H	H

Table 3 :

Résultats des marquages de la chaîne lourde du complexe HLA-I et de sa chaîne légère, β2-microglobuline.

Selon les critères du XII^{ème} atelier international d'Histocompatibilité :

+ = Positif : > 75% de surface marquée

H = Hétérogène : entre 25% et 75% de surface marquée

- = Négatif : < 25% de surface marquée

En Vert : HLA- / B2M +

En Orange : HLA+ ou H / B2M-

En Rouge : HLA- / B2M-

I. RÉSULTATS HLA TYPE I

Sur les 40 échantillons tumoraux que nous avons analysés, nous ne retrouvons que 4 échantillons considérés comme ayant perdu l'expression du HLA de type I (HLA « - » dans **table 3**).

Les deux premiers échantillons proviennent de tumeurs vésicales.

Le premier (V4) est un carcinome urothélial de haut grade, dont seulement 14% de la surface tumorale exprime le HLA de type I.

Le deuxième est également un carcinome urothélial de haut grade, exprimant le HLA-I sur 20.8% de sa surface.

Le troisième provient d'une tumeur rénale (R4), un carcinome à cellules claires n'exprimant le HLA que sur 15.7% de sa surface.

Le quatrième est un échantillon d'une tumeur d'un aryténoïde (O6), un carcinome épidermoïde kératinisant bien différencié, n'exprimant le HLA de type I que sur 16.5% de sa surface.

Il est intéressant de préciser que la plupart des tumeurs (35/40) sont considérées, en suivant les seuils mis en place lors du XII IHW, comme exprimant le HLA-I de façon hétérogène (25-75% de la surface marquée).

Il n'y a qu'une tumeur dans notre cluster qui est considérée comme HLA positive (O5).

Ces résultats sont repris en termes de pourcentage dans la **table 4**.

	HLA négatives	HLA hétérogènes	HLA positives
Total	10%	87.5%	2.5%
Vessie	20%	80%	0%
Rein	10%	90%	0%
ORL	10%	80%	10%
Poumon	0%	100%	0%

Table 4 : pourcentage de tumeurs HLA négatives, hétérogènes ou positives dans les différents types tumoraux analysés.

II. RÉSULTATS B-2 MICROGLOBULINE

A. Marquage β 2m au niveau des tumeurs ayant perdu l'expression du HLA-I :

Sur les 4 tumeurs exprimant peu le HLA de type I, trois sont considérées comme ayant également perdu l'expression de la β 2m. Il s'agit des échantillons V4, V8 et R4 où elle n'est exprimée que sur respectivement 4.3, 9.5 et 9.1% de la surface tumorale.

Son expression est cependant plus importante au niveau de O6, calculée à 34.8% de la surface tumorale.

B. Résultats globaux du marquage $\beta 2m$:

Sur les 40 tumeurs analysées, 13 ont perdu l'expression de la $\beta 2m$.

Sur les 13 échantillons, 7 proviennent de carcinomes vésicaux (V2,V4,V6,V7,V8,V9,V10), 5 de cancers rénaux (R2,R4,R6,R9,R10), 1 d'un cancer ORL (O7) et aucun de cancers pulmonaires.

Ces résultats sont repris en termes de pourcentage dans la **table 5**.

	$\beta 2m$ négatives	$\beta 2m$ hétérogènes	$\beta 2m$ positives
Total	32.5%	67.5%	0%
Vessie	70%	30%	0%
Rein	50%	50%	0%
ORL	10%	90%	0%
Poumon	0%	100%	0%

Table 5 : pourcentage de tumeurs $\beta 2M$ négatives, hétérogènes ou positives dans les différents types tumoraux analysés.

Comme déjà expliqué dans notre introduction (cfr II.B.a.iii), il existe un pattern typique d'une perte de $\beta 2m$ sans perte du HLA-I. Celui-ci correspond à un marquage cytosolique du HLA-I et non membranaire, la molécule ne pouvant être acheminée à la surface cellulaire. Nous avons donc analysé les 10 tumeurs HLA-I H ou + et $\beta 2m$ - pour déterminer si nous retrouvions ce même pattern dans notre étude, ce qui n'a pas été le cas. Nos tumeurs gardent donc une bonne expression membranaire du HLA-I malgré la perte d'expression de la $\beta 2m$ (**figure 13**).

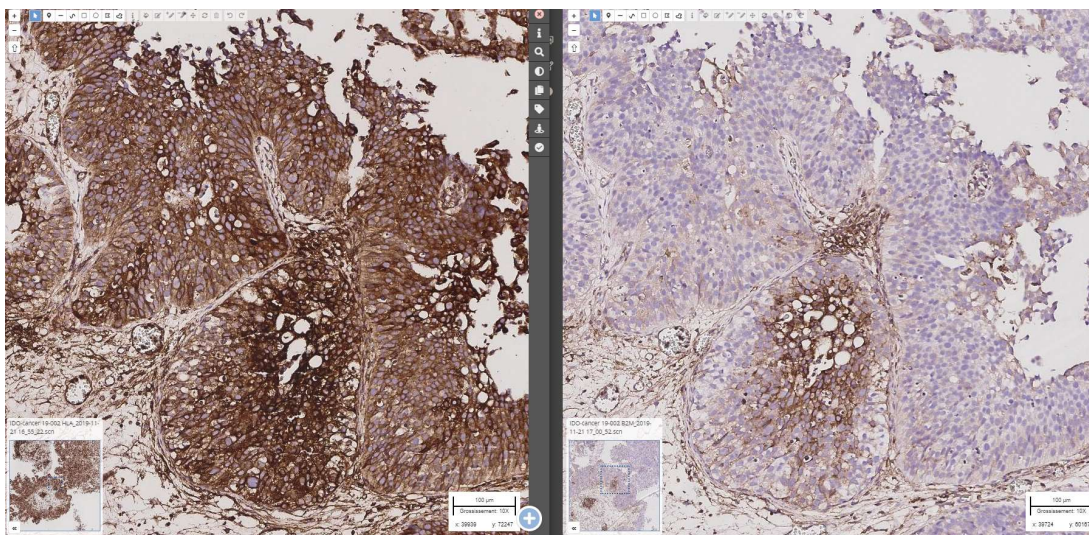


Figure 13 : échantillon V2 (HLA-I H / $\beta 2M$ -). A gauche : présence d'une expression membranaire du HLA-I sur les cellules tumorales. A droite : la plupart des cellules tumorales n'expriment pas la $\beta 2m$ à leur surface.

DISCUSSION

I. BIAIS MÉTHODOLOGIQUES POTENTIELS

A. Programme de quantification :

Les résultats présentés ci-dessus sont basés sur une analyse des différentes coupes réalisée par un programme informatique. Les échantillons analysés ne reprennent pas que la tumeur mais également les tissus avoisinants celle-ci. Afin de ne pas prendre en compte ces tissus sains dans l'analyse de l'expression du HLA-I et de la β 2-microglobuline, nous avons délimité sur chaque coupe les zones tumorales et calculé l'expression de ces deux molécules uniquement dans le cadre de cette délimitation (*cfr méthodes*).

Malgré ces précautions, l'expression de ces molécules décrite par le programme utilisé ne reflète pas toujours la réalité.

Par exemple, une tumeur n'exprimant pas le HLA-I mais étant fortement infiltrée ou entourée par un important interstitium cellulaire pourrait être considérée comme HLA-I positive ou hétérogène à tort.

A l'inverse, une tumeur exprimant encore le HLA-I pourrait être considérée à tort comme négative si elle se trouve infiltrée par des cellules ou substances n'exprimant physiologiquement pas le complexe. Ceci pourrait se rencontrer dans le cadre de tumeurs présentant un important phénomène de kératinisation. Pour rappel, la kératinisation est un processus physiologique qui consiste en la différenciation des kératinocytes (cellules épidermiques) en cornéocytes. Ces cornéocytes sont des cellules apoptotiques remplies de filaments de kératine. Certaines tumeurs provenant de cellules épidermiques subissent encore ce phénomène de kératinisation. Il a été démontré que les cellules kératinisées et les zones kératinisées ne montrent pas d'expression de HLA-I (12). Le programme ne quantifierait donc, à tort, qu'une pauvre expression de ce complexe dans ce type de tumeur.

B. Marquage pan-CK :

Nous avons utilisé lors de cette étude un marquage pan-CK pour délimiter les zones tumorales. Le marquage HLA-I n'a été analysé qu'à l'intérieur de ces délimitations.

Deux biais potentiels peuvent ressortir de cette méthode :

- 1) Les résultats du marquage HLA-I des tumeurs urothéliales analysées dans ce mémoire peuvent être en partie faussés. En effet, une étude réalisée sur le marqueur AE1/AE3

(marqueur pan-CK utilisé dans cette étude) sur des tumeurs mal différenciées montre une perte du marquage des cellules tumorales de 3 tumeurs urothéliales sur les 5 analysées (18).

- 2) Les trois marquages utilisés dans le cadre de ce mémoire ont été réalisés sur des coupes adjacentes de chacune des tumeurs. La démarcation des zones tumorales a été dessinée sur les lames HLA-I selon le marquage des lames pan-CK. Ces délimitations ont ensuite été retranscrites sur les lames $\beta 2m$ par le programme informatique par superposition avec les lames HLA-I. Il est donc raisonnable de penser qu'il puisse exister des erreurs et que les zones analysées sur les lames $\beta 2m$ ne soient pas exactement les mêmes que celles analysées sur les lames HLA-I et ne correspondent donc pas toujours uniquement aux zones tumorales.

C. Marquages $\beta 2m$ et HLA-I :

En observant les lames considérées comme $\beta 2m$ négatives et en les comparant aux lames HLA-I correspondantes nous remarquons régulièrement une différence d'intensité des marquages. Les cellules saines, que nous utilisons comme témoins positifs, ressortent de façon plus intense au niveau du marquage HLA-I qu'au niveau du marquage de la $\beta 2m$ (cfr **figure 14**).

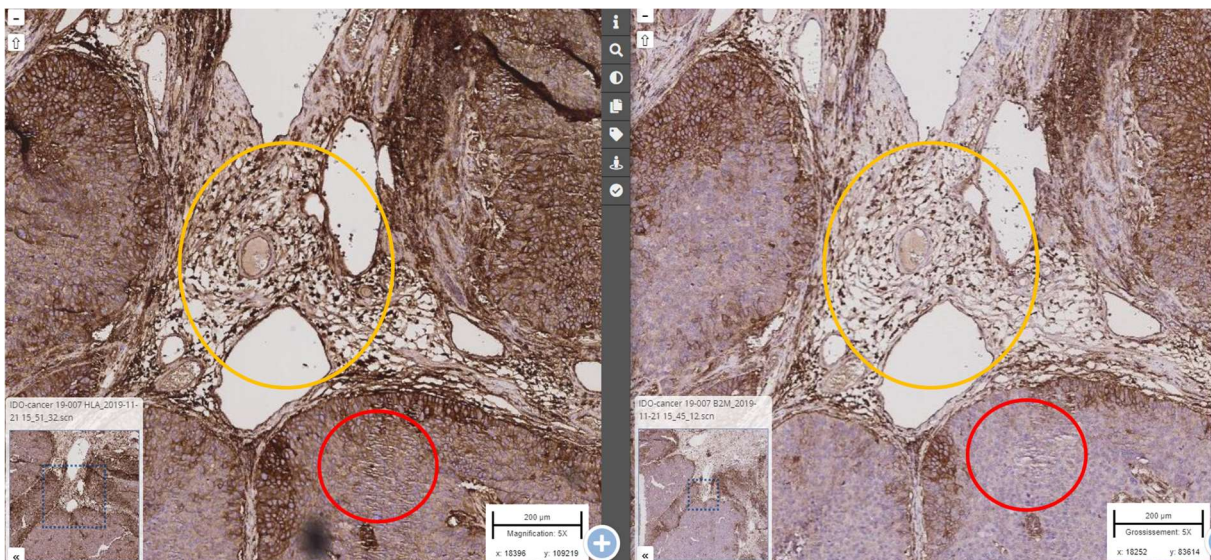


Figure 14 : Echantillon V7 (HLA H / B2M -). A gauche : marquage HLA-I. A droite : marquage B2M.

Cercle jaune : cellules saines. Nous remarquons une intensité du marquage HLA-I (gauche) plus importante que celle du marquage de la B2M (droite).

Cercle rouge : cellules tumorales. On retrouve la présence d'un marquage HLA-I (gauche) alors que les cellules ne marquent peu (voir pas) la B2M.

Ces cellules étant saines, elles doivent normalement exprimer le HLA-I et la $\beta 2m$ de la même manière. La seule explication à cette différence d'intensité serait donc un problème au niveau du marquage, ce qui fausserait les résultats de l'expression de la $\beta 2m$.

Ceci pourrait expliquer l'importante proportion de tumeurs HLA-I + / $\beta 2m$ – que nous retrouvons dans ce mémoire.

Il est possible, par exemple, que la structure de la $\beta 2m$ se fragilise avec le temps de conservation des lames. Cette fragilisation empêcherait l'anticorps utilisé pour le marquage de reconnaître correctement la molécule.

Cette hypothèse expliquerait également la raison pour laquelle la plupart de ces tumeurs HLA-I H ou +/ $\beta 2m$ - sont des échantillons de tumeurs vésicales. En effet, la plupart des échantillons vésicaux que nous avons utilisés datent d'il y a plus de 3 ans et sont plus anciens que les échantillons des autres tumeurs analysées.

Peut-être serait-il intéressant, à l'avenir, de calculer le ratio d'intensité entre les zones saines marquées HLA-I et celles marquées $\beta 2m$ et de rectifier les résultats $\beta 2m$ en fonction de ce ratio. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de le faire dans le cadre de ce mémoire.

II. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A. Résultats de l'expression HLA

Pour ce chapitre, nous nous sommes basés sur le livre de F. Garrido « MHC class-I loss and cancer immune escape », qui présente une revue des travaux réalisés sur le sujet jusqu'à présent.

Il existe une discordance entre les résultats obtenus dans ce mémoire et ceux présentés dans la plupart des études répertoriées.

La **figure 15** présente une synthèse du pourcentage de perte du HLA de classe I dans différents cancers humains. Celle-ci a été réalisée à partir de données obtenues par différents laboratoires (12). Les données obtenues dans le cadre de notre étude y sont également représentées.

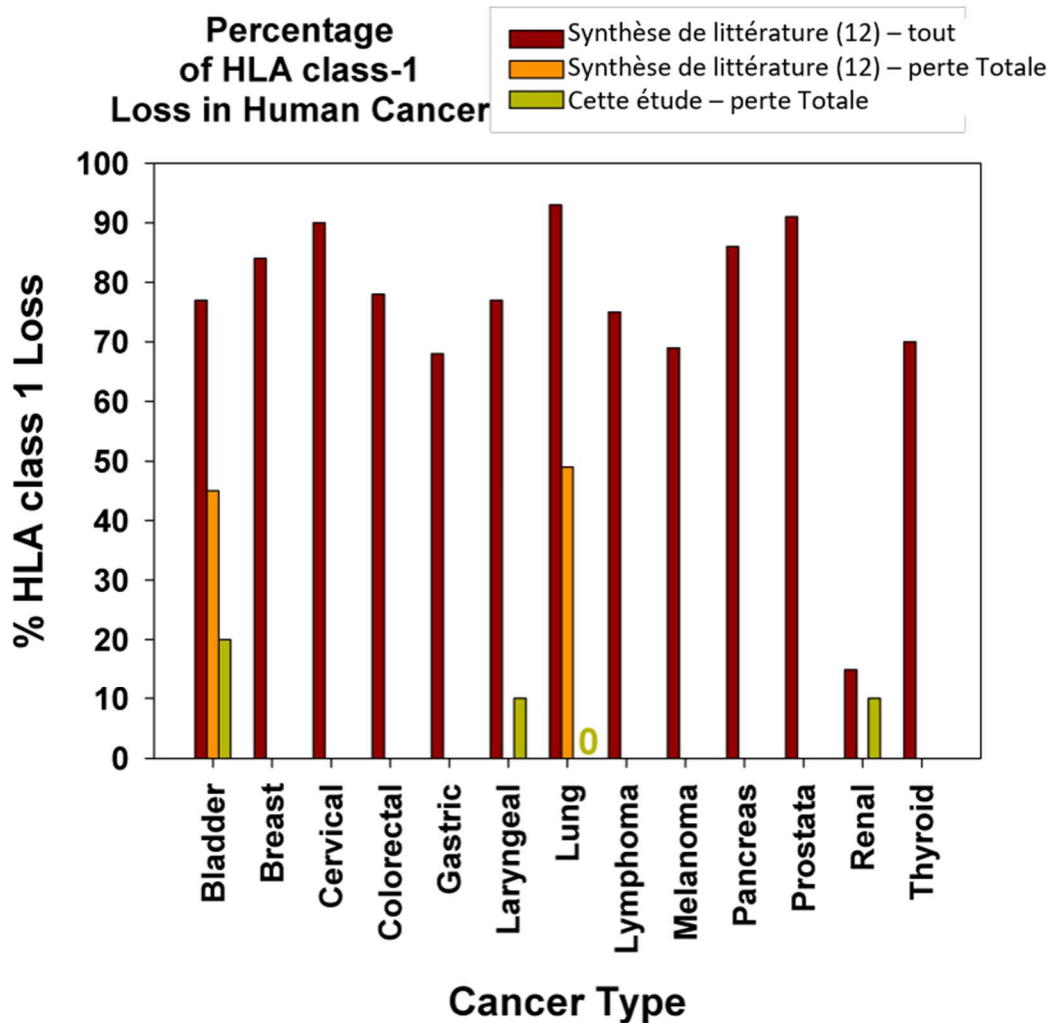


Figure 15 : Pourcentage de la perte du HLA-I dans différentes tumeurs humaines. Données obtenues de plusieurs analyses immunohistochimiques de tissus tumoraux en utilisant différents anticorps monoclonaux reconnaissant une perte complète du HLA-I (barres oranges), une perte d'un locus spécifique ou encore une perte d'un allèle particulier du complexe (ensemble des trois : barres rouges). (12) Les résultats de notre étude sont présents pour les groupes de tumeurs équivalents (barres vertes).

Comme on le constatera, à l'exception du cancer rénal, ces résultats diffèrent significativement de ceux présentés dans notre étude.

Une explication potentielle de ce constat est que la synthèse de la **figure 15** (barres rouges) ne reprend pas uniquement les tumeurs ayant totalement perdu l'expression de leur complexe, elle comptabilise également celles n'ayant perdu qu'une partie de celui-ci (un haplotype, locus, voire allèle unique, non décelés par notre marquage global mais par des marquages plus spécifiques). Ces modifications n'induisent pas une perte totale d'expression

du HLA-I à la surface tumorale mais peuvent empêcher la reconnaissance correcte des cellules par les lymphocytes T (comme expliqué dans notre introduction). L'anticorps utilisé dans ce mémoire (EMR8-5) reconnaît tous les complexes HLA-I classiques et est incapable de repérer ce type de mutations plus spécifiques.

Pour comparer ce qui est comparable, il nous faut donc tenir compte uniquement du pourcentage de tumeurs ayant totalement perdu l'expression du HLA-I (**figure 15**, barres oranges).

Malgré cela, les chiffres diffèrent encore de nos mesures (**figure 15**, barres vertes). Pour ce qui est du cancer de la vessie, F. Garrido rapporte 45% de perte totale du HLA à la surface des cellules tumorales alors que nous n'arrivons qu'à 20%. Dans le cancer du poumon, une perte totale dans 49% des tumeurs est recensée, alors qu'aucun de nos échantillons pulmonaires n'est ressorti HLA négatif.

Ces discordances pourraient être le résultat de la différence de méthodologie entre les études. La plupart des études reprises par Federico Garrido dans sa synthèse ont utilisé un matériel cryopréservé. Les auteurs ont principalement utilisé le w6/32 comme marquage du complexe HLA-I, un anticorps monoclonal reconnaissant un déterminant monomorphique commun à tous les allèles HLA-I. Ce déterminant est formé par un épitope conformationnel de la chaîne lourde du complexe HLA-I et de la $\beta 2m$.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé des lames paraffinées et l'anticorps monoclonal EMR8-5. Celui-ci reconnaît également un déterminant monomorphique commun aux allèles HLA-I classiques mais ne reprenant que la chaîne lourde du complexe, indépendamment de la $\beta 2m$.

Il est donc possible que nos différences avec les autres études soient partiellement liées :

- Au site d'ancrage de ces 2 anticorps. Une mutation particulière de la $\beta 2m$, par exemple, pourrait modifier le site d'ancrage du w6/32 sans modifier celui de l'EMR8-5. Il a d'ailleurs déjà été démontré que la région amino-terminale de la $\beta 2m$ est essentielle à la reconnaissance par le marqueur w6/32 (27). Une modification de cette région pourrait, par exemple, amener à ce type de phénomène. A l'inverse, une mutation du site d'ancrage de l'EMR8-5 pourrait provoquer une perte du marquage sans entraîner de modification au niveau du marquage par w6/32.

Cette hypothèse reste peu probable. En effet, il faudrait que ces mutations n'empêchent pas l'acheminement du complexe vers la surface tumorale et qu'elles n'altèrent que peu la conformation tridimensionnelle de la molécule.

- Aux différences de méthodes de conservation. En effet, La conservation d'un échantillon de tissu vivant peut amener à modifier et abimer partiellement celui-ci. Les modifications retrouvées dans les échantillons cryopréservés sont différentes de celles observées au niveau de ceux conservés dans de la paraffine (5). Cela pourrait également avoir une influence sur les différents marquages.

Il est possible que les différences de population, de grade ou de stade tumoral entre notre étude et celles réalisées antérieurement jouent également un rôle sur les résultats obtenus.

Il se pourrait en effet que :

- Soit nous ayons justement sélectionné des tumeurs en train d'évoluer vers une perte du HLA-I, ce qui s'exprime par cette grande proportion de résultats hétérogènes.
- Soit les tumeurs sélectionnées font justement partie des tumeurs qui utilisent un autre système défense contre notre système immunitaire que la perte du complexe HLA-I.

Ces biais d'échantillonnage sont d'autant plus plausibles que notre nombre d'échantillons est extrêmement restreint (10 par type tumoral) et potentiellement statistiquement non-significatif.

Notre analyse se trouve réduite à ces interprétations mais celles-ci mettent clairement en évidence la complexité du système de reconnaissance et de la morphologie du HLA-I. On soulignera également l'importance de l'impact du choix de la méthodologie et du nombre d'échantillons analysés dans les études réalisées sur le sujet.

B. Expression de la β 2m dans le cadre des tumeurs HLA-I négatives :

Sur les 4 tumeurs exprimant peu le HLA de type I, trois ont perdu l'expression de la β 2m. Cela pourrait plaider en faveur d'un mécanisme de perte de l'expression du HLA passant par une perte de la β 2-microglobuline ou par un mécanisme transcriptionnel qui régulerait de façon négative à la fois l'expression des gènes HLA et celui de la β 2m.

La dernière, cependant, exprime encore correctement cette molécule. Cela pourrait s'expliquer par une hétérogénéité au sein de la tumeur des mécanismes de suppression de l'expression du CMH de classe I. Certaines cellules pourraient avoir perdu leur HLA par perte de la β 2m, d'autres par un mécanisme indépendant à celle-ci.

C. Expression de la β 2m dans le cadre de tumeurs gardant une expression du HLA-I :

Comme décrit dans la section « Résultats », 10 tumeurs sur nos 40 échantillons montraient une perte d'expression de la β 2m sans perte d'expression du HLA-I. Celles-ci gardaient une bonne expression membranaire du HLA-I malgré la perte d'expression de la β 2m. Il est donc possible que, contrairement à ce que nous pourrions penser, le complexe HLA-I puisse être acheminé vers la surface cellulaire sans être associé à la β 2m.

Une étude réalisée en 1992 a démontré que ce phénomène était présent chez les souris. Cependant, la présence du complexe au niveau de la surface cellulaire était généralement moindre que dans les cellules gardant une bonne expression de la β 2-microglobuline et l'activation des lymphocytes cytotoxiques s'avérait moins efficace (7).

Une autre étude réalisée en 1989 montrait l'existence d'une grande quantité de HLA-I non associés à la β 2M à la surface des cellules lymphocytaires activées (28). Il est possible qu'une mutation particulière au niveau des cellules tumorales amène à ce même phénomène, ce qui expliquerait la présence de marquage membranaire HLA-I sans marquage β 2M associé. Les molécules trouvées dans cette étude ont cependant une conformation tridimensionnelle fort différente des complexes HLA-I lorsqu'ils sont associés à la β 2M. Il reste donc fort peu probable que l'anticorps anti-HLA que nous avons utilisé dans cette étude (EMR8-5) puisse reconnaître ces complexes particuliers.

III. PERTE HLA-I ET INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE

Avant de conclure la rédaction de ce mémoire, il nous paraît judicieux de rappeler ici la motivation principale de ce mémoire.

Celui-ci rentre en effet dans le cadre d'une étude d'une plus grande ampleur, visant à déterminer si le celecoxib (anti-COX2) pourrait être utilisé en association avec les anti-PD1 afin de maximiser le taux de réponse à ce traitement.

Le celecoxib ne fonctionnerait que sur des tumeurs froides exprimant l'IDO-1. Ces tumeurs froides sont, par définition, peu infiltrées par les cellules de notre système immunitaire.

Il a déjà été démontré que la perte d'expression du HLA-I dans certaines tumeurs est inversement corrélée à l'infiltration tumorale par les lymphocytes T (12.). Les tumeurs gardant

une bonne expression du complexe sont généralement celles qui sont bien infiltrées par les lymphocytes T, tandis que celles l'ayant perdu ne montrent plus cette infiltration.

Cette corrélation a notamment déjà été démontrée pour les cancers de la vessie et du poumon (12, 23).

Si nous trouvons le profil tumoral que nous recherchons (tumeurs froides exprimant l'IDO-1) parmi ses deux types tumoraux, ce sera donc probablement au niveau des échantillons exprimant peu le HLA-I. Dans ce cadre, si nous décidons qu'il est intéressant d'utiliser le celecoxib pour ces tumeurs, il nous faudra probablement l'associer à un traitement permettant de garder ou réinstaurer une expression correcte du complexe HLA-I à la surface des cellules tumorales.

N'ayant pas retrouvé cette corrélation dans les études réalisées sur les cancers de la sphère ORL et des cancers rénaux, ceux-ci seraient peut-être de meilleurs candidats quant à l'utilisation du celecoxib.

Le cancer du rein retient tout particulièrement notre attention étant donné qu'il est le cancer montrant la plus faible proportion de tumeurs ayant perdu leur complexe HLA-I, selon la revue de littérature de F. Garrido (12).

CONCLUSION

Sur les 40 échantillons analysés dans ce mémoire, 4 (10%) sont considérés comme n'exprimant plus le HLA-I à la surface des cellules tumorales : 2 de vessie, 1 de rein et 1 de la sphère ORL. Une perte de la β 2m est associée à la perte du HLA-I dans $\frac{3}{4}$ des cas, suggérant que le mécanisme induisant la perte de ce complexe passe par une perte de la β 2m ou par un mécanisme de régulation négative des deux molécules.

Un quart (25%) de nos échantillons ont perdu leur expression de la β 2m sans perdre l'expression membranaire de la chaîne lourde du HLA-I. Ces résultats étonnants pourraient être en partie faussés par un biais de marquage de la β 2m.

La grande majorité (87.5%) des tumeurs analysées lors de ce mémoire présentent un profil d'expression du HLA de classe I de type hétérogène.

Ces résultats diffèrent de ceux retrouvés dans les études réalisées antérieurement sur ce même sujet, surtout en ce qui concerne les cancers du poumon et de la vessie. Ceci pourrait être lié à la méthodologie et au matériel tumoral utilisés. Il est donc possible que la proportion de tumeurs ayant perdu leur expression de HLA-I est en réalité plus importante que ce qui est décrit dans ce mémoire.

En outre, certaines mutations du complexe ne sont pas repérées par l'anticorps que nous avons utilisé pour le marquage HLA-I. Ces mutations pourraient également empêcher la reconnaissance des cellules par les lymphocytes T.

Si nous nous basons sur la revue de littérature de F. Garrido, les cancers du rein et de la sphère ORL seraient probablement de meilleurs candidats à l'utilisation du celecoxib de par leur moindre dépendance à la perte du HLA-I dans le processus de développement et d'infiltration tumorale.

ANNEXES

I. ANNEXE I : PROTOCOLE DÉTAILLÉ IMMUNOHISTOCHEMIE :

STEP	SOLUTION	DILUTION	TEMP	TIME
Deparaffinization	Toluene		RT	3x5 min
	Isopropanol 100%		RT	3x5 min
Endo. Px inactivation	H2O2 in Methanol	3%	RT	20 min
Washing	dist. H2O		RT	5 min
Antigen retrieval	Citrate buffer pH 5.7 + 540 µl Triton 20%		900 Watts	4 min 10
			90 Watts	15 min
			900 Watts	1 min 30
			back to RT	15 min
Washing	dist H2O		RT	5 min
	TBS/Tween 0.1%		RT	5 min
Dako Pen				
Block	BSA 5% in TBS/Tween		RT	30 min
Primary Antibody #1	Voir liste in BSA 1%/ TBS /Tween 0,1%	liste	RT	1h
Washing	TBS /Tween 0,1%		RT	3x3 min
Secondary Antibody #1	Voir liste	RTU	RT	40 min
Washing	TBS /Tween		RT	3x3 min
Substrate/chromogen	DAB (DAKO #K3468) batch 10122731}		RT	5 min
Washing	tap H2O		RT	5 min
	dist H2O		RT	5 min
Counterstaining	Hematoxylin		RT	5 min
	(DAKO #S3301) { batch}			
	tap H2O		RT	5 min
	dist H2O		RT	5 min
Mounting	colleuse de lame Sakura			

Liste Ac Ire

anti-B2M : rabbit, monoclonal, clone : D8P1H, Cell Signaling, ref.12851S, lot :1 => dilution : 1/1000

anti-HLA : mouse, monoclonal, clone: EMR8-5, Abcam, ref.ab70328, lot: GR3220489-2 => dilution : 1/2000

mouse anti-panCK : monoclonal, clone : clone AE1/AE3, Dako, ref : M3515, lot : 10139535 => dilution : 1/50

Liste Ac lire

Envision anti-rabbit-HRP : Dako, ref. K4003, lot : 1012758

Envision anti-mouse-HRP : Dako, ref. K4001, lot : 10116850

II. ANNEXE II : RÉSULTATS DÉTAILLÉS MARQUAGE HLA-I :

Ti:

Code	Organe	Type de Tumeur	Surface totale	Surface marquée	Mean intensity	% stained area	Staining index
V1	Vessie	Carcinome urothélial infiltrant	99761256	48514172	71,94041443	48,6	8902
V2	Vessie	Carcinome urothélial infiltrant	46749516	25924870	66,95583344	55,5	10428
V3	Vessie	Carcinome urothélial. Avec aspects rhabdoïdes	3345504	2193567,75	69,62882996	65,6	12154
V4	Vessie	Carcinome urothélial papillaire de haut grade	80217296	11228963	81,65748596	14,0	2426
V5	Vessie	Carcinome urothélial	230761632	140193136	69,88603973	60,8	11246
V6	Vessie	Carcinome urothélial de haut grade de type micro-papillaire	23359052	12028023	69,75852203	51,5	9538
V7	Vessie	Carcinome urothélial papillaire	88576776	45283700	81,87010193	51,1	8851
V8	Vessie	Carcinome urothélial micro-papillaire de haut grade	171936544	35688592	80,70035559	20,8	3618
V9	Vessie	Carcinome urothélial papillaire de haut grade infiltrant	160479856	69209200	71,615448	43,1	7909
V10	Vessie	Carcinome urothélial associé focalement à une composante micro-papillaire	55788660	23044552	78,03777313	41,3	7310
R1	Rein	Carcinome à cellules claires	46369960	22018448	64,77016449	47,5	9033
R2	Rein	Carcinome à cellules claires	81617080	42344576	68,4134903	51,9	9680
R3	Rein	Carcinome à cellules claires	128355512	91728352	60,75755692	71,5	13881
R4	Rein	Carcinome à cellules claires	180787920	28463626	94,11319733	15,7	2533
R5	Rein	Carcinome à cellules claires	163689616	111496416	56,19334412	68,1	13542
R6	Rein	Carcinome à cellules claires	17430726	10337185	64,3970871	59,3	11304
R7	Rein	Carcinome papillaire de type I	205358544	147225392	67,10723877	71,7	13470
R8	Rein	Carcinome à cellules chromophobes	45189892	27303878	61,32997894	60,4	11702
R9	Rein	Carcinome urothélial	109856008	31118324	87,85321045	28,3	4735
R10	Rein	Carcinome à différenciation sarcomatoïde	36177764	12882592	71,64894104	35,6	6529
O1	ORL (langue)	Carcinome épidermoïde moyennement-peu différencié ulcéré, focalement kératinisant	30652650	11771908	99,08010101	38,4	5988
O2	ORL (Vallécule épiglottique)	Carcinome épidermoïde moyennement-peu différencié	62736660	29665012	71,17562866	47,3	8692
O3	ORL (joue)	Carcinome épidermoïde moyennement différencié, non kératinisant et maturant	35404844	25222860	58,78434372	71,2	13979
O4	ORL (épiglotte)	Carcinome épidermoïde infiltrant peu différencié, non kératinisant	50127304	35480980	79,8783493	70,8	12395
O5	ORL (Plancher buccal)	Carcinome épidermoïde moyennement différencié kératinisant, infiltrant la muqueuse jugale	25992330	20997652	63,98122406	80,8	15431
O6	ORL (aryténoïde droite)	Carcinome épidermoïde bien à moyennement différencié, kératinisant	10324560	1702516	100,2326202	16,5	2552
O7	ORL (larynx)	Carcinome épidermoïde modérément à peu différencié infiltrant	19777780	6455493,5	80,66847992	32,6	5690
O8	ORL (Peau cervicale antérieure)	Carcinome épidermoïde bien différencié, kératinisant	63399952	45874632	55,99993134	72,4	14399
O9	ORL (Corde vocale)	Carcinome épidermoïde infiltrant bien à moyennement différencié, kératinisant	52064856	25242172	64,52416229	48,5	9235
O10	ORL (Sinus maxillaire)	Carcinome épidermoïde peu différencié	42094808	27735306	57,38874054	65,9	13020
P1	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire de composante acinaire prédominante	77553688	43287548	65,71595001	55,8	10565
P2	Poumon (lobe inf.)	Adénocarcinome papillaire focalement mucoïde et micro-papillaire	91938088	50615208	72,97823334	55,1	10021
P3	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde	109966576	50535356	74,54808044	46,0	8293
P4	Poumon	Carcinome épidermoïde moyennement à peu différencié	98524504	52104340	68,42993927	52,9	9867
P5	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire focalement micro-papillaire et solide	81731408	42600440	67,98631287	52,1	9748
P6	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome acinaire, papillaire et focalement micropapillaire	150229424	93118504	62,38579178	62,0	11939
P7	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire de type solide	68841696	46612888	53,12382126	67,7	13669
P8	Poumon (lobe inf.)	Carcinome épidermoïde infiltrant la plèvre viscérale	121545096	77115264	66,51077271	63,4	11959
P9	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde kératinisant, moyennement différencié	137089360	91294480	59,6686058	66,6	13008
P10	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde	27850760	18797232	56,55474854	67,5	13394

III. ANNEXE III : RÉSULTATS DÉTAILLÉS MARQUAGE B2-MICROGLOBULINE :

Code	Organe	Type de Tumeur	Surface totale	Surface marquée	Mean intensity	% stained area	Staining index
V1	Vessie	Carcinome urothélial infiltrant	98128200	28902300	93,17749786	29,5	4766
V2	Vessie	Carcinome urothélial infiltrant	45361700	4338020	90,64689636	9,6	1572
V3	Vessie	Carcinome urothélial Avec aspects rhabdoïdes	2891530	1209360	93,12190247	41,8	6770
V4	Vessie	Carcinome urothélial papillaire de haut grade	86468712	3704719	102,0538254	4,3	655
V5	Vessie	Carcinome urothélial	242376000	97679504	86,84500122	40,3	6777
V6	Vessie	Carcinome urothélial de haut grade de type micro-papillaire	24443500	4706280	100,7009964	19,3	2971
V7	Vessie	Carcinome urothélial papillaire	92865000	11964800	99,35049774	12,9	2006
V8	Vessie	Carcinome urothélial micro-papillaire de haut grade	191635664	18263166	99,18481445	9,5	1485
V9	Vessie	Carcinome urothélial papillaire de haut grade infiltrant	161068000	27648700	90,28070068	17,2	2828
V10	Vessie	Carcinome urothélial associé focalement à une composante micro-papillaire	56239500	3311390	104,401001	5,9	887
R1	Rein	Carcinome à cellules claires	13775900	3588950	90,21499634	26,1	4305
R2	Rein	Carcinome à cellules claires	86859104	10197100	99,18560028	11,7	1829
R3	Rein	Carcinome à cellules claires	120002624	81959368	62,36569214	68,3	13157
R4	Rein	Carcinome à cellules claires	177882064	16238383	102,5248642	9,1	1392
R5	Rein	Carcinome à cellules claires	169976992	101898000	66,44519806	59,9	11304
R6	Rein	Carcinome à cellules claires	34676200	5573910	101,8880005	16,1	2461
R7	Rein	Carcinome papillaire de type I	195895712	101374336	93,21659088	51,7	8372
R8	Rein	Carcinome à cellules chromophobes	28301500	16011700	79,24289703	56,6	9944
R9	Rein	Carcinome urothélial	111420112	27251880	88,23391724	24,5	4079
R10	Rein	Carcinome à différenciation sarcomatoïde	47301000	1377620	86,79519653	20,7	3477
O1	ORL (langue)	Carcinome à différenciation moyennement-peu différencié ulcéré, focalement kératinisant	48282600	13739800	100,2330017	28,5	4404
O2	ORL (Vallécule épiglottique)	Carcinome épidermoïde moyennement-peu différencié	69742896	18943200	96,30770111	27,2	4310
O3	ORL (joue)	Carcinome épidermoïde moyennement différencié, non kératinisant et maturant	34859344	13237582	92,69063568	38,0	6164
O4	ORL (épiglotte)	Carcinome épidermoïde infiltrant peu différencié, non kératinisant	53539300	17079600	102,3669968	31,9	4869
O5	ORL (Plancher buccal)	Carcinome épidermoïde moyennement différencié kératinisant, infiltrant la muqueuse jugale	25806482	8701506	94,74526978	33,7	5404
O6	ORL (aryténoïde droite)	Carcinome épidermoïde bien à moyennement différencié, kératinisant	107112202	3727483,5	88,69345093	34,8	5787
O7	ORL (larynx)	Carcinome épidermoïde modérément à peu différencié infiltrant	6821260	842761	106,7020035	12,4	1832
O8	ORL (peu cervicale antérieure)	Carcinome épidermoïde bien différencié, kératinisant	62072832	21824228	86,64270782	35,2	5919
O9	ORL (Cordé vocale)	Carcinome épidermoïde infiltrant bien à moyennement différencié, kératinisant	62761200	21865700	82,32420349	34,8	6015
O10	ORL (Sinus maxillaire)	Carcinome épidermoïde peu différencié	42259200	20045200	76,83730316	47,4	8451
P1	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire de composante acinaire prédominante	70781400	23347700	86,24659729	33,0	5566
P2	Poumon (lobe inf.)	Adénocarcinome papillaire focalement mucoïde et micro-papillaire	105255000	35485700	92,23899841	33,7	5487
P3	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde	124638000	43672000	94,62809753	35,0	5619
P4	Poumon	Carcinome épidermoïde moyennement à peu différencié	89892704	36429800	73,39109802	40,5	7360
P5	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire focalement micro-papillaire et solide	104226000	28527200	93,82910156	27,4	4411
P6	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome acinaire, papillaire et focalement micropapillaire	133630000	62006100	89,77799988	40,4	6668
P7	Poumon (lobe sup)	Adénocarcinome pulmonaire de type solide	63149600	33400900	69,76390076	52,9	9797
P8	Poumon (lobe inf.)	Carcinome épidermoïde infiltrant la plèvre viscérale	129612000	46772700	90,6190033	36,1	5932
P9	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde kératinisant, moyennement différencié	125746000	62597200	83,53240204	49,8	8536
P10	Poumon (lobe sup)	Carcinome épidermoïde	32783800	14569400	85,09860229	44,4	7551

BIBLIOGRAPHIE

Liens informatiques :

- (1) Immunotherapy The Canadian Cancer Society 09/04/2020
[En ligne] <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/diagnosis-and-treatment/chemotherapy-and-other-drug-therapies/immunotherapy/?region=on>
Consulté le 10/04/2018
- (2) Understanding Immunotherapy The American Society of Clinical Oncology Cancer.net 2020
[En Ligne] <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/understanding-immunotherapy> Consulté le 10/04/2018
- (3) Constitutive IDO1 expression in human tumors is driven by cyclooxygenase-2 and mediates intrinsic immune resistance Lauren Hitchings Acir.org 08/04/2020
[En Ligne] <https://acir.org/weekly-digests/2017/august/constitutive-ido1-expression-in-human-tumors-is-driven-by-cyclooxygenase-2-and-mediates-intrinsic-immune-resistance>
Consulté le 15/04/2018
- (4) De l'immunité innée à l'immunité adaptative et complexe majeur d'histocompatibilité Matthieu Simon Cours Pharmacie 2009
[En Ligne] <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/de-limmunité-innée-a-limmunité-adaptative-et-complexe-majeur-d%E2%80%99histocompatibilité.html> Consulté le 20/11/2019
- (5) IHC Sample Preparation (Frozen VS. Paraffin) Novus Biologicals 04/2020
[En Ligne] <https://www.novusbio.com/sample-preparation-for-ihc-experiments> Consulté le 05/03/2020

Bibliographie :

- (6) Angela Orcuto. Bases moléculaires de la réponse immunitaire cellulaire contre les tumeurs. Service d'Oncologie médicale CHUV Lausanne, 2016.
- (7) Bix M. and Raulet D. Functionally Conformed Free Class I Heavy Chains Exist On The Surface Of b2 Microglobulin Negative Cells. J. Exp. Med. Vol 176 p.829-834. Septembre 1992.
- (8) Claire Deligne. Etude de l'immunité anti-tumorale à long-terme induite par traitement par un anticorps anti-CD20 de souris porteuses de tumeur. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB019ff. tel-01138499
- (9) Daniel S. Chen and Ira Mellman. Oncology Meets Immunology : The Cancer-Immunity Cycle. Immunity July 25 2013; 39: 1-10
- (10) Degraeuwe A, van Baren N, Van Eeckhout P, Cornelis F, Baurain JF. Loss of HLA class I expression and T-cell infiltration or PD-L1 expression are associated with different response patterns to pembrolizumab in melanoma. European Society of Medical Oncology (ESMO). October 2018, Munich.
- (11) Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. Annu. Rev. Immunol. 22, 329–360
- (12) Garrido F (2019) MHC class-I loss in cancer cells. Adv Exp Med Biol 1151:11–78.
- (13) Graux C. Cours d'Immunologie générale. [Notes de cours de 2^{ème} année de bachelier], Université de Namur, 2015-2016.

- (14) Hennequart M., Pilotte L., Cane S., Hoffmann D., Stroobant V., De Plaen E., Van den Eynde B.J. Constitutive IDO1 Expression in Human Tumors Is Driven by Cyclooxygenase-2 and Mediates Intrinsic Immune Resistance. *Cancer Immunol Res.* 2017 Jul 21.
- (15) Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* (2017) 168(3):542.
- (16) Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene.* 2011;30:127–138. doi: 10.1038/onc.2010.456.
- (17) Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225–274
- (18) Listrom MB, Dalton LW. Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK-6, AE1:AE3 and CAM-5.2. *Amer J Clin Pathol* 1987;88(3):297- 301
- (19) Munn DH, Mellor AL. IDO in the tumor microenvironment : inflammation, counter-regulation and tolerance. *Trends Immunol.* 2016; 37 (3):193-207.
- (20) Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013; 34:137–143.
- (21) Nowicki TS, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Mechanisms of resistance to PD-1 and PD-L1 blockade. *Cancer J.* 2018;24:47–53
- (22) Parakh S., Park J. J., Mendis S., Rai R., Xu W., Lo S., et al. (2017). Efficacy of anti-PD-1 therapy in patients with melanoma brain metastases. *Br. J. Cancer* 2017 ; 116 : 1558–1563.
- (23) Perea F, Sanchez-Palencia A, Gomez M, Bernal M, Concha A, Mendez Garcia M, Gonzalez-Ramirez R, Kerick M, Martin J, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N (2018) HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T cell-infiltration and immune escape. *Oncotarget* 9(3):4120–4133
- (24) Sandberg JK, Karre K, Glas R. Recognition of the major histocompatibility complex restriction element modulates CD8(+) T cell specificity and compensates for loss of T cell receptor contacts with the specific peptide. *J Exp Med.* 1999;189(6):883–894.
- (25) Santarpia M, Karachaliou N. Tumor immune microenvironment characterization and response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Biol Med.* 2015;12(2):74–78
- (26) Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol.* (2018) 8:86.
- (27) Shields MJ et al. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. *HLA Immune Response Genetics* 1998 May;51(5):567-70.
- (28) Schnabl E, Stockinger H, Majdic O, Gaugitsch H, Lindley IJ, Maurer D, et al. Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. *J Exp Med.* 1990;171:1431–42.
- (29) Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20:5064-5074.
- (30) Van Baren N., Van Den Eynde B.J. Tumoral immune resistance mediated by enzymes that degrade tryptophan. *Cancer Immunol Res* 2015 ; 3(9) : 978-85.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté de médecine et médecine dentaire

Avenue Mounier, 50 bte B1.50.04, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgique | www.uclouvain.be/mede