

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Immunothérapie – Oncologie nucléaire »

Par

Marisa FERNANDES CAPITAO

Radiothérapie interne vectorisée alpha anti-PD-L1 dans le traitement du mélanome.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17/01/2020

Unité de recherche : Inserm 1232

Thèse N°

Rapporteurs avant soutenance :

Françoise Degoul
Nicolas Arlicot

Chargé de Recherche Inserm, UMR 1240 Inserm, Université Clermont Auvergne
Maître de conférences des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Tours

Composition du Jury :

Présidente :

Myriam Bernaudin

Directeur de Recherche Inserm, UMR 6030 - ISTCT, Caen

Examinatrices :

Sophie Tartare-Deckert
Nathalie Labarrière

Directeur de Recherche Inserm, C3M, Nice
Directeur de Recherche Inserm, CRCINA, Nantes

Directeur de thèse : Yannick Guilloux
Co-directeur de thèse : Emmanuel Scotet

Professeur des Universités, Université de Nantes
Directeur de Recherche Inserm, CRCINA, Nantes

Co-encadrante de thèse : Joëlle Gaschet

Maître de conférences des Universités, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Françoise Degoul et le Dr. Nicolas Arlicot pour m'avoir fait le grand honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le Dr. Nathalie Labarrière, le Dr. Sophie Tartare-Deckert et le Dr. Myriam Bernaudin pour leur présence et d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand Merci à mes directeurs de thèse, Yannick Guilloux, Emmanuel Scotet et tout particulièrement mon encadrante Joëlle Gaschet pour m'avoir formée à ce métier, de m'avoir fait bénéficier de ta grande compétence scientifique et pour les corrections que tu as apporté à ce manuscrit, à mes présentations ... et bien sûr pour ton accueil, sois assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse également mes remerciements à Michel Chérel et Françoise Kraeber-Bodéré de m'avoir accueilli pour cette thèse au sein de leur équipe.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide et le soutien de Sébastien Gouard alias papi Gouard. Merci pour ta disponibilité, ton regard critique et ton professionnalisme, tes histoires et ta chanson spéciale « injection iv » vont me manquer.

À tous mes collègues et membres de l'équipe 13, 3 et 1, en particulier Noémie Joalland mon fournisseur officiel de souris, les chimistes Marion Berdal et Patricia Le Saec, Zainab Tabaja et Latifa Rbah-Vidal pour votre bonne humeur et soutien.

Et bien évidemment, ma partenaire et amie qui sans toi cette thèse n'aurait pas été la même. Justine Perrin, merci pour tout, ta gentillesse, ton aide,... la liste est longue ! Nos soirées raclette/charcuterie et nos pauses sketches me manquent déjà.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui ont toujours été à mes côtés pendant cette thèse et qui m'ont toujours encouragé.

À mon mari Joni, tu m'as soutenue dans cette étape de ma vie, du début jusqu'à la fin, surtout pendant les moments difficiles et de doutes tu m'as toujours gardé dans le droit chemin. Merci pour ton soutien quotidien indéfectible.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	3
Table des Figures	7
Tables des Tableaux	9
Préambule	10
Introduction Bibliographique	13
Partie 1 : Le mélanome	14
Chapitre 1 : L'épidémiologie du mélanome : un cancer des populations caucasiennes	15
Chapitre 2 : Le développement du mélanome	17
I. Généralités	17
II. Les facteurs de risques associés au mélanome : un problème de santé publique	21
1. Les facteurs de susceptibilité individuelle	21
1.1. Les phototypes	21
1.2. Le phénotype nævique	22
1.3. Les mutations dans le mélanome : les facteurs de risques génétiques	22
1.3.1. Les mutations germinales	23
1.3.2. Les mutations somatiques	24
1.3.2.1. La voie des MAP Kinases	25
1.3.2.2. La voie PI3K/AKT	26
1.3.2.3. La mélanogénèse : implication du facteur de transcription MITF	27
2. Les facteurs extrinsèques liés à l'environnement et/ou le comportement	28
III. Dépistage et diagnostic	29
1. Diagnostic et bilan d'extension	29
2. Les stades cliniques	31
Partie 2 : Le mélanome : un défi thérapeutique	36
Chapitre 1 : Les traitements conventionnels	37
I. La chirurgie : le traitement standard du mélanome	37
II. La radiothérapie externe : peu utilisée dans le traitement du mélanome	38
III. La chimiothérapie : le traitement historique du mélanome métastatique	38
Chapitre 2 : Les thérapies ciblées : une des avancées majeures dans le traitement du mélanome	40
I. Les inhibiteurs de B-RAF	40
II. Les inhibiteurs de MEK	41
III. Résistances aux thérapies ciblées	42
Chapitre 3 : Les immunothérapies - avant les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires	44

I. Les traitements cytokiniques	45
1. Interleukine 2 (IL-2)	45
2. Interféron α -2b	45
3. Ciblage du TNF α	46
II. Les virus oncolytiques	46
III. La vaccination anti-tumorale	47
IV. Les thérapies cellulaires par transfert adoptif de LT	49
1. Le transfert adoptif de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL)	49
2. Le transfert adoptif de LT issus du sang périphérique	50
2.1. Amplification par stimulation antigénique ex vivo	50
2.2. Les modifications génétiques des lymphocytes T	51
Chapitre 4 : Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires	52
I. Généralités	52
II. Immunothérapie anti-CTLA-4	53
III. Immunothérapie anti-PD-1	56
1. La découverte du co-récepteur inhibiteur PD-1	56
2. Le profil et régulation de l'expression de PD-1	56
3. La voie de signalisation inhibitrice induite par l'interaction de PD-1 avec ses ligands	57
4. Les ligands du co-récepteur inhibiteur PD-1 : PD-L1 et PD-L2	59
5. Régulation de l'expression de PD-L1	60
5.1. Régulation par les IFN	61
5.2. Régulation par TLR4	63
5.3. Régulation par la voie PI3K/AKT	63
5.4. Régulation par des microARN	64
5.5. Régulation par l'hypoxie	64
6. Essais cliniques	64
6.1. Les anticorps anti-PD-1	64
6.2. Les anticorps anti-PD-L1	67
Partie 3 : La radiothérapie interne vectorisée pour le traitement du mélanome	68
Chapitre I : La radiothérapie interne vectorisée	69
I. Généralités	69
II. Les différentes RIV	70
1. La RIV- β	70
2. La RIV- α	72
Chapitre II : La RIV pour le traitement du mélanome	75
I. Études précliniques	75
1. Ciblage la mélanine	75
2. Ciblage de MC1R	79
3. Ciblage de MCSP	80
4. Ciblage de VLA-4	81
II. Études cliniques	81
Partie 4 : L'imagerie TEP dans le mélanome	84

Chapitre I : Généralités	85
Chapitre II : Principe de la TEP	87
Chapitre III : La TEP dans le diagnostic et le suivi du mélanome	88
Chapitre IV : Les nouvelles approches d'imagerie phénotypique pour le mélanome	90
I. La TEP vectorisée	90
1. Les benzamides ciblant la mélanine	90
2. Peptides ciblant MC1R	91
3. Peptide ciblant VLA-4	92
II. Immuno-TEP	92
Objectifs de la thèse	96
Matériels et méthodes	98
I. Modèle préclinique de xélogreffe de mélanome humain	98
1. Lignées cellulaires de mélanome humain	98
2. Animaux et xélogreffe	98
II. Anticorps anti-PD-L1 humain	98
1. Détermination de l'affinité de l'anticorps	98
2. Évaluation de l'expression de PD-L1 sur les lignées cellulaires	99
3. Radiomarquage au bismuth-213	99
III. Marquages immunohistochimiques	100
IV. Immunothérapie anti-PD-L1 humain	100
V. Escalade de doses	100
VI. Radiothérapie interne vectorisée	101
VII. Association thérapeutique	101
VIII. Suivi thérapeutique	102
1. Survie, poids et croissance tumorale	102
2. Toxicité hématologique	102
3. Toxicité hépatique, médullaire et rénale	103
IX. Biodistribution de l'Ac radiomarqué	103
X. Immuno-TEP anti-PD-L1	104
XI. Analyse des effets radiobiologiques	104
1. Prolifération cellulaire : marquage au VPD450	104
2. Cassure double brin : marquage de l' γ H2AX	105
3. Apoptose et nécrose : marquage de l'Annexine V/PI	105
4. Quantification de HMGB1, IFN β et CXCL10	105
XI. Tests statistiques	105
Résultats	107
Chapitre I : RIV-α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans le traitement du mélanome humain	108

I. Expression de PD-L1 in vitro et ex vivo	108
1. Analyse in vitro de l'expression de PD-L1 sur les lignées de mélanome M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT}	108
2. Analyse ex vivo de l'expression de PD-L1 sur les tumeurs de mélanome M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT}	109
II. Analyse ex vivo de la prolifération des tumeurs de mélanome	110
III. Détermination de l'affinité de l'AcM anti-PD-L1 humain	111
IV. Biodistribution de l'Ac radiomarqué	111
V. Immunothérapie anti-PD-L1 humain	113
VI. Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213	114
VII. Radiothérapie interne vectorisée anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213	118
1. Analyse de l'efficacité thérapeutique de la RIV- α	118
2. Analyse de la toxicité associée à la RIV- α	122
Chapitre II : Analyse des effets radiobiologiques du bismuth-213 sur les cellules de mélanome	124
I. Analyse de la prolifération cellulaire	124
II. Analyse des cassures doubles brins	125
III. Analyse de la mort cellulaire	126
IV. Analyse de la sécrétion de cytokines	127
Chapitre III : Association thérapeutique RIV-α anti-PD-L1 et immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ PD-1 KO spécifiques du mélanome	130
I. L'association RIV- α anti-PD-L1 et transfert adoptif de LT PD-1 KO améliore la réponse anti-tumorale et la survie	130
II. Analyse de la toxicité hématologique après association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8 ⁺ spécifiques	134
Chapitre IV : Développement d'une immuno-TEP anti-PD-L1 humain au zirconium-89.	135
Discussion	137
Annexe	145
Annexe n°1 : Article scientifique	145
Annexe n°2: Revue scientifique	185
Abréviations	218
Bibliographie	223

Table des Figures

Figure 1 : Les cancers de la peau.	15
Figure 2 : Classement mondial des cancers.	16
Figure 3 : Épidémiologie mondiale du mélanome.	16
Figure 4 : Les différents tissus de la peau.	17
Figure 5 : L'épiderme.	18
Figure 6 : Modèle de développement du mélanome (le modèle de Clark).	19
Figure 7 : Les voies de signalisation impliquées dans le développement des mélanomes familiaux.	24
Figure 8 : Fréquence des mutations somatiques de 26 cancers différents.	25
Figure 9 : Les voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome.	28
Figure 10 : Dommages à l'ADN par les UVB - Formation d'un dimère de thymidines.	29
Figure 11 : L'épiderme – Indice de Breslow.	32
Figure 12 : Taux de survie à cinq et dix ans selon le stade de développement du mélanome.	34
Figure 13 : Infiltrat lymphocytaire T CD8 ⁺ cytotoxique avant et après traitement de patients répondeurs ou en progression.	35
Figure 14 : Taux de survie sans rechute : comparaison Vémurafenib et Dacarbazine.	41
Figure 15 : Les mécanismes d'inhibition des LT CD8 ⁺ .	52
Figure 16 : Ciblage de la voie CTLA-4 par l'ipilimumab.	53
Figure 17 : Comparaison de la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique traité par l'ipilimumab, la vaccination gp100 ou leur association.	54
Figure 18 : Survie et taux de réponse de patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par ipilimumab et/ou dacarbazine.	55
Figure 19 : Voie de signalisation induite par l'interaction PD-1 et ses ligands.	59
Figure 20 : Mécanismes de régulation de l'expression de PD-L1.	61
Figure 21 : Expression de PD-L1 par les cellules de mélanome induite par l'IFN γ .	62
Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de PD-L1 dans des lignées cellulaires de mélanome humain après traitement à l'IFN.	63
Figure 23 : Taux de survie des patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par le Nivolumab, l'Ipilimumab ou la combinaison des deux AcM.	66
Figure 24 : Survie globale des patients traités avec le pembrolizumab ou l'ipilimumab en première intention pour un mélanome non résecable et/ou métastatique.	67
Figure 25 : Réponse d'un patient atteint de myélome multiple métastatique traité au ¹⁷⁷ Lu-pentixather.	71
Figure 26 : Survie globale des patients atteints d'un cancer médullaire de la thyroïde traités par RIV à l'iode-131.	72
Figure 27 : Réponse d'un patient atteint d'un cancer de la prostate et traité ¹⁷⁷ Lu-PSMA-617 puis à l' ²²⁵ Ac-PSMA-617.	74
Figure 28 : Schéma détaillant les mécanismes d'action potentiels d'un AcM anti-mélanine radiomarqué.	75
Figure 29 : Analyse de l'efficacité thérapeutique du 6D2- ¹⁸⁸ Re sur la croissance tumorale de mélanome humain MNT1.	76
Figure 30 : Analyse de l'efficacité thérapeutique de l'association chimiothérapie et RIV sur le développement tumoral de mélanome humain A2058.	77
Figure 31 : Efficacité thérapeutique de l'AcM ²¹³ Bi-8C3 sur le développement tumoral de mélanome syngénique murin.	77

Figure 32 : Effets thérapeutiques de la RIV avec MIP-1145- ¹³¹ I sur la croissance des tumeurs SK-MEL-3 et la survie des souris.	79
Figure 33 : Analyse de l'efficacité thérapeutique d'un analogue de l' α -MSH radiomarqué au Rhénium-188.	80
Figure 34 : Effets thérapeutiques de LLP2A- ¹⁷⁷ Lu et son association avec une combinaison d'anticorps bloquants.	81
Figure 35 : Régression complète de deux métastases pulmonaire chez un patient traité par RIV α avec l'AcM 9.2.27- ²¹³ Bi anti- MCSP.	82
Figure 36 : Réponse clinique à l'AcM 6D2- ¹⁸⁸ Re chez les patients atteints de mélanome métastatique.	83
Figure 37 : Hétérogénéité des lésions tumorales primaires et métastatiques de mélanome.	85
Figure 38 : Schéma illustrant le principe physique de la TEP.	87
Figure 39 : TEP/CT au ¹⁸ F-FDG d'un patient atteint de mélanome métastatique et présentant une réponse complète après traitement avec des inhibiteurs de B-RAF et de MEK.	89
Figure 40 : TEP/CT au ¹⁸ F-FDG d'un patient développant un mélanome métastatique résistant au vemurafenib, inhibiteur de B-RAF.	89
Figure 41 : Image TEP avec l'ICF15002 radiomarqué au fluor-18 dans différents modèles syngéniques ou xénogéniques de mélanome, pigmentés (B16F10 et SK-MEL) ou non pigmentés (A375M).	91
Figure 42 : Immuno-TEP/CT avec un AcM anti-PD-L1 radiomarqué au zirconium-89 d'une souris greffée avec 2 tumeurs de mélanome B16F10.	93
Figure 43 : Localisation des LT CD8 ⁺ au sein d'une tumeur de mélanome B16 après traitement avec un AcM anti-CTLA-4 par immuno-TEP/CT avec un nanobody anti-CD8 radiomarqué au zirconium-89.	95
Figure 44 : Schéma expérimental de la RIV anti-PD-L1 humain.	101
Figure 45 : Schéma expérimental de l'association thérapeutique RIT anti-PD-L1 humain- ²¹³ Bi + LT CD8 ⁺ cytotoxiques anti-MelanA/MART-1 WT ou PD-1 KO.	102
Figure 46 : Expression in vitro de PD-L1 sur les lignées cellulaires de mélanome M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT} .	108
Figure 47 : Expression ex vivo de PD-L1 sur les tumeurs de mélanome M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT} .	109
Figure 48 : Prolifération cellulaire au sein des tumeurs de mélanome M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT} .	110
Figure 49 : Analyse de l'affinité de liaison de l'AcM anti-PD-L1 humain nu ou radiomarqué au bismuth-213 sur les cellules M113 ^{PD-L1+} .	111
Figure 50 : Biodistribution de l'Ac anti-PD-L1 humain dans le modèle de mélanome M113 ^{PD-L1+} .	112
Figure 51 : Croissance tumorale et la survie après immunothérapie anti-PD-L1 humain dans le modèle de mélanome M113 ^{PD-L1+} .	113
Figure 52 : Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 - Survie des animaux.	114
Figure 53 : Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 - Suivi du poids	115
Figure 54 : Étude de toxicité après escalade de doses avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.	117
Figure 55 : Courbe de croissance des tumeurs M113 ^{PD-L1+} après RIV α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.	119
Figure 56 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeur M113 ^{PD-L1+} après RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.	120
Figure 57 : Effets de la RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 sur la croissance des tumeurs M113 ^{WT} et la survie des animaux.	121
Figure 58 : Étude de toxicité après RIV- α anti-PD-L1 humain au bismuth-213.	123

Figure 59 : Effet de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 sur la prolifération des lignées de mélanome humain M113 ^{WT} et M113 ^{PD-L1+} .	125
Figure 60 : Induction de cassures doubles brins par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113 ^{WT} et M113 ^{PD-L1+} .	126
Figure 61 : Induction d'apoptose et nécrose par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113 ^{WT} et M113 ^{PD-L1+} .	127
Figure 62 : Libération de IFN β , CXCL10 et HMGB1 par M113 ^{PD-L1+} et M113 ^{WT} après irradiation au bismuth-213.	129
Figure 63 : Développement tumoral après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques.	132
Figure 64 : Courbes de survie après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques.	133
Figure 65 : Toxicité hématologique après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8+ spécifiques.	134
Figure 66 : Immuno-TEP/CT avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au zirconium-89.	136

Tables des Tableaux

Tableau 1 : Phototypes cutanés selon la classification de Fitzpatrick.	22
Tableau 2 : Survie à cinq ans selon l'indice de Breslow.	32
Tableau 3 : La classification pTNM pour le mélanome.	33
Tableau 4 : Stade de développement du mélanome en fonction de la classification pTNM.	34
Tableau 5 : Classification des tumeurs.	62
Tableau 6 : Caractéristiques des émetteurs β - utilisés en RIV β .	70
Tableau 7 : Principaux émetteurs de particules α utilisés en clinique.	73
Tableau 8 : Caractéristiques physiques des principaux radioisotopes émetteurs de particules β^+ .	87
Tableau 9 : Résumé des résultats de l'induction d'apoptose et nécrose par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113 ^{WT} et M113 ^{PD-L1+} .	127

Préambule

Le **mélanome** est le plus agressif et le plus mortel des cancers cutanés dû à son haut potentiel métastatique. Depuis plusieurs décennies son incidence à travers le monde ne cesse d'augmenter malgré de nombreuses politiques de prévention dans les pays les plus à risque (Australie, Nouvelle-Zélande et USA). Cette pathologie est donc devenue un enjeu majeur de santé publique pour les populations occidentales.

Dans la prise en charge médicale de ce cancer cutané, un diagnostic précis permettant l'identification de la pathologie est indispensable. Il déterminera le traitement qui sera adapté au stade clinique. Plusieurs examens doivent être réalisés afin d'établir le diagnostic. Tout d'abord un examen clinique reposant sur une analyse anatomique de la lésion grâce aux critères de la règle ABCDE (Asymétrie, Bordure, Couleur, Diamètre, Évolution). Cependant seul l'examen anatomopathologique des tissus prélevés en totalité suite à une exérèse diagnostique permet de confirmer le diagnostic de mélanome et de déterminer son stade. Cet examen permet d'étudier les caractéristiques histologiques des cellules cancéreuses et de déterminer le type de mélanome (mutations). En complément, un bilan d'imagerie est réalisé pour tous les stades cliniques symptomatiques, adapté à l'épaisseur de la tumeur, aux antécédents du patient et à la présence de signes cliniques. Ce bilan d'imagerie peut être réalisé sous forme d'une échographie des ganglions lymphatiques proximaux de la lésion primaire, d'un scanner (CT) thoraco-abdomino-pelvien pouvant être associé à une imagerie par résonance magnétique (IRM) lorsque des métastases cérébrales sont suspectées. L'imagerie médicale bénéficie de progrès spectaculaires, en particulier l'imagerie nucléaire qui offre des outils remarquables, précis et résolutifs, pour la compréhension des maladies et le dépistage précoce des cancers. Ainsi, la tomographie par émission de positrons (TEP) couplée à un scanner (TEP-CT) est entrain de prendre une place considérable en oncologie.

Au stade précoce, le mélanome primaire est de bon pronostic, par contre le stade métastatique est considéré comme incurable. Ce stade est réfractaire aux différents traitements conventionnels loco-régionaux comme la chirurgie et la radiothérapie externe, ainsi qu'aux traitements systémiques comme la chimiothérapie. L'arsenal thérapeutique était jusqu'à la fin des années 1990 limité à la chirurgie, la chimiothérapie conventionnelle et la radiothérapie pour lesquelles les activités de recherche et de développement s'essouffent. La **radiothérapie** externe ne permet qu'une irradiation loco-régionale d'une lésion, et n'est donc pas adaptée au stade métastatique du mélanome. De plus, des effets secondaires sur les tissus sains sont notés.

La **chimiothérapie** quant à elle utilise des composés cytotoxiques administrés par voie systémique. Leurs effets s'exercent donc sur toutes les cellules en prolifération et peuvent donc cibler les métastases. Toutefois ces composés ne sont pas spécifiques des cellules tumorales, ils peuvent agir également sur les cellules normales présentant un fort taux de renouvellement dans

le corps, dont les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau, expliquant ainsi les effets secondaires connus lié à la chimiothérapie (l'alopecie par exemple).

Depuis le début des années 2000, des stratégies thérapeutiques prometteuses ont été élaborées telles que les thérapies ciblées et les **immunothérapies**. Elles reposent sur les bases d'une meilleure connaissance des mécanismes biologiques et des altérations génétiques conduisant à l'apparition et au développement des cancers et des métastases. Ces thérapies ont pour but de cibler spécifiquement les cellules tumorales tout en limitant les effets secondaires intrinsèques à la thérapie contrairement aux traitements conventionnels.

Malheureusement de faibles taux de réponse et/ou de nombreux cas de résistances aux thérapies ciblées ou aux immunothérapies sont déjà recensés. En particulier, l'absence de traitements efficaces aux stades avancés de la maladie nous incite à une recherche constante d'innovations thérapeutiques. C'est dans ce contexte, que la **radiothérapie interne vectorisée** (RIV) est apparue comme une voie intéressante à explorer pour le traitement des pathologies cancéreuses dont le mélanome. La RIV repose sur l'utilisation de vecteurs immunologiques (anticorps entier ou fragments d'anticorps) ou non-immunologiques (peptides) couplés à un radioélément. Cette association permet d'exploiter la haute spécificité du vecteur pour sa cible tumorale et les effets cytotoxiques des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses tout en minimisant l'exposition des cellules normales.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le domaine de la RIV du mélanome à l'aide d'un vecteur immunologique de type anticorps et d'un radioélément innovant émetteur de particules α ainsi que dans la recherche de combinaisons thérapeutiques innovantes alliant RIV et immunothérapie.

Mon travail de thèse s'est divisé en 3 axes. Le premier visait à **développer et étudier la RIV- α** à l'aide d'un anticorps anti-PD-L1 humain dans un modèle préclinique de mélanome humain. Cette partie a été complétée par quelques études de radiobiologie *in vitro* sur ces mêmes cellules de mélanome. Dans le deuxième axe j'ai participé à **l'évaluation du potentiel thérapeutique de l'association de deux thérapies anti-cancéreuses : la RIV- α et le transfert adoptif de lymphocytes T** génétiquement modifiés et spécifiques du mélanome. Enfin, le troisième axe a consisté au développement d'une imagerie par **tomographie par émission de positrons (TEP)** à l'aide du même anticorps anti-PD-L1 humain (**immuno-TEP**).

L'**introduction bibliographique** qui suit est scindée en 4 grandes parties :

- Un résumé de **l'état des connaissances** sur l'épidémiologie, la physiopathologie, les facteurs de risques du mélanome.
- Un rappel sur les **traitements actuels du mélanome** avec en particulier le rôle de l'axe immunologique **PD-L1/PD-1**
- La troisième partie replace la **RIV** dans le traitement du mélanome au niveau préclinique et clinique.

- La quatrième partie illustre l'utilisation de la **TEP** dans la prise en charge du mélanome et le développement de l'**immuno-TEP**.

Suite à cette introduction, seront présentés les **résultats** de l'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* menées au cours de ma thèse complétés par les premiers résultats du développement de l'Immuno-TEP anti-PDL1 humain. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit sera dédiée à une discussion autour des résultats obtenus afin d'ouvrir vers des perspectives d'exploitation de ces travaux.

Introduction Bibliographique

Partie 1 : Le mélanome

Chapitre 1 : L'épidémiologie du mélanome : un cancer des populations caucasiennes

En 2018, les cancers cutanés représentaient 13,2 % des cancers selon le centre international de recherche sur le cancer (CIRC). Ils peuvent être classés en 3 types : le carcinome baso-cellulaire (CBC) et le carcinome épidermoïde cutané (CEC ou spinocellulaire) qui constituent les cancers de la peau de type non-mélanome (cancer NMS) et le mélanome qui représente le troisième type (**figure 1**).



Figure 1 : Les cancers de la peau.

A. carcinome baso-cellulaire **B.** carcinome épidermoïde cutané **C.** mélanome nodulaire (source : service dermatologique de Bordeaux).

Le **carcinome basocellulaire** et le **carcinome épidermoïde** sont des tumeurs malignes cutanées épithéliales d'origine kératinocytaire. Ces tumeurs sont à progression lente et loco-régionale, l'apparition de métastases restant exceptionnelle. Bien qu'ils se classent au 5^{ème} rang des cancers les plus fréquents mondialement avec 1 042 056 nouveaux cas en 2018, le taux de mortalité associé reste faible (65 155 décès en 2018) (**figure 2**).

Le **mélanome** quant à lui est une tumeur maligne cutanée d'origine mélanocytaire. En 2018, il se classait au 20^{ème} rang des cancers les plus fréquents avec 287 723 nouveaux cas de mélanomes cutanés recensés à travers le monde (**figure 2**). Son incidence mondiale est très variable avec un gradient Nord-Sud, à l'exception de l'Australie, les populations nordiques/caucasiennes étant les plus touchées (**figure 3**). Cette répartition est en partie liée au phototype (couleur de la peau et des cheveux) qui est l'un des facteurs de risque du mélanome. Les pays occidentaux très touchés par le mélanome ont un faible phototype tandis que les populations asiatiques ou africaines qui ont une faible incidence et un phototype élevé.

Bien qu'il ne représente que 3,1 % de l'ensemble des cancers de la peau, son fort potentiel métastatique fait de lui le cancer cutané le plus agressif et le plus dangereux puisqu'il a été à l'origine de 60 712 décès en 2018 (selon les chiffres de "Globocan, International Agency for Research on Cancer"). En France, son incidence augmente de manière importante depuis ces 10 dernières années. Les derniers chiffres donnés par la Haute Autorité de Santé en 2012 annoncent

que l'incidence du mélanome est de l'ordre de 7,6 pour 100 000 habitants par an chez l'homme et de 9,5 chez la femme. Le pic d'incidence se situe entre 50 et 64 ans chez l'homme et entre 15 et 64 ans chez la femme, aucune catégorie d'âge n'étant épargnée.

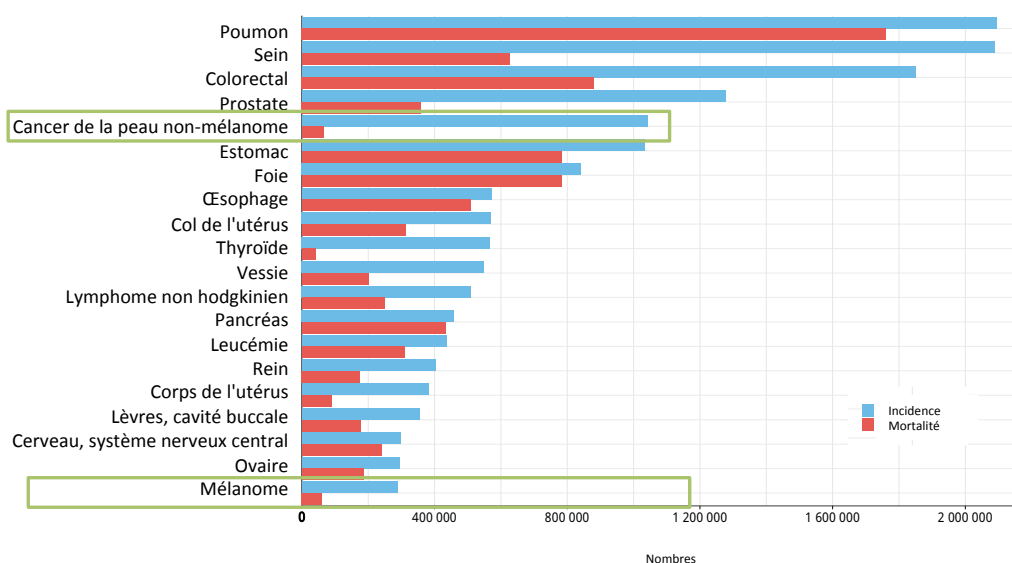


Figure 2 : Classement mondial des cancers.

Ce classement représente les 20 cancers les plus fréquents au niveau mondial. Le nombre de nouveaux cas (incidence) et nombre de décès (mortalité) associé sont représentés respectivement par une colonne bleue et rouge (source : Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer¹).

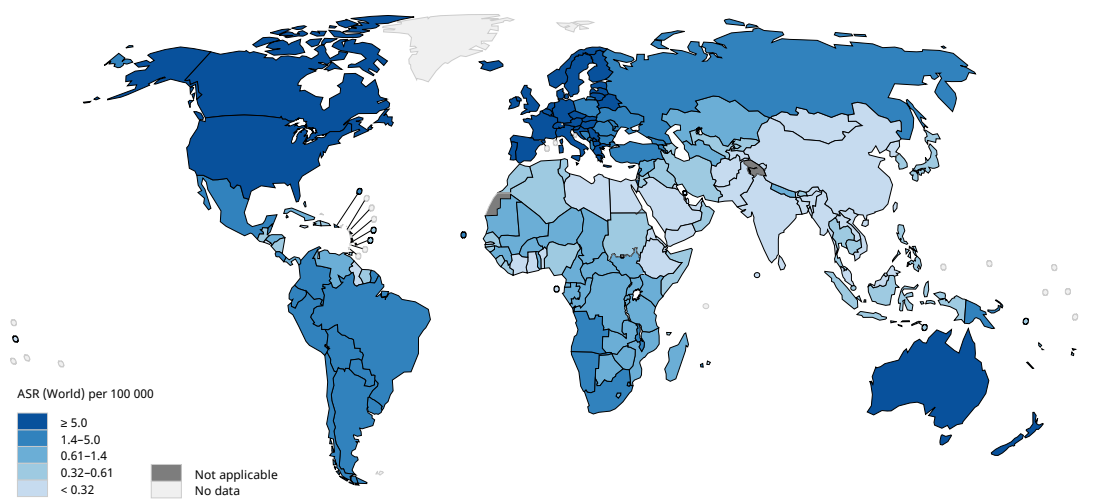


Figure 3 : Épidémiologie mondiale du mélanome.

Cette carte du monde indique la répartition du taux d'incidence du mélanome au niveau mondial. Les valeurs représentent le taux de risque annuel pour 100 000 personnes et sont standardisées par rapport à l'âge des populations. (source : Globocan 2018, International Agency for Research on Cancer¹).

¹www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018

Chapitre 2 : Le développement du mélanome

I. Généralités

Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir de mélanocytes, des cellules pigmentaires spécialisées dans la production de la mélanine à l'origine de la pigmentation de la peau et des poils. La mélanine protège la peau contre les rayons ultra-violet (UV) et prévient donc le développement de cancers cutanés. Il existe deux types de mélanine, la phéomélanine, un pigment jaune-rouge, et l'eumélanine, un pigment brun-noir qui est le seul protecteur vis-à-vis des rayonnements UV. Les mélanocytes sont présents essentiellement dans la peau mais également au niveau de l'œil, des méninges et dans les muqueuses de la cavité buccale (Cichorek 2013). C'est pourquoi le mélanome peut théoriquement se développer dans ces différents sites. En fait, 26% des mélanomes se développent à partir d'un nævus (« grain de beauté ») préexistant (Bevona 2003), une tumeur bénigne dérivant de mélanocytes. Le reste des cas de mélanome, la majorité, se développe sur une peau saine, le développement est dit *de-novo* (Elder 2006).

La peau est un organe formé de plusieurs tissus dont la principale fonction est de créer une barrière physique entre le milieu extérieur et l'organisme. Ces trois tissus sont l'hypoderme (la couche la plus profonde), le derme et l'épiderme (la couche la plus superficielle) (**figure 4**).

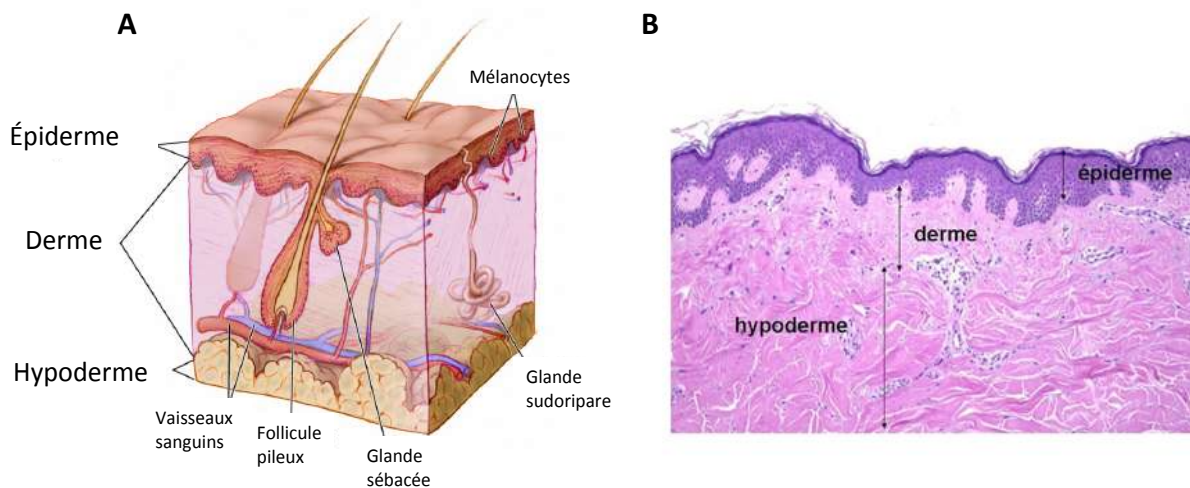


Figure 4 : Les différents tissus de la peau.

A. Schéma de la peau avec le positionnement de l'épiderme du derme et de l'hypoderme (Source : National Cancer Institute). **B.** Coupe transversale de la peau après fixation et coloration histologique à l'hémalaun-éosine (H&E) (Source : cours Pr. Nataf, Université de Lyon).

L'**hypoderme** correspond à la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu adipeux qui est composé de cellules grasses, les adipocytes. Il joue un rôle de réserve énergétique,

d'isolant thermique et de protection des organes (face aux chocs et blessures).

Le derme est un tissu conjonctif vascularisé et innervé, il assure l'hydratation et la nutrition de la peau. Les fibroblastes contenus dans ce tissu forment, remodelent et dégradent la matrice extracellulaire (MEC). Cette dernière est composée de collagène et d'élastine entourés d'un gel de glycoprotéines donnant souplesse, solidité et élasticité au derme.

Il existe une jonction entre le derme et l'épiderme qui est la jonction dermo-épidermique.

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau (**figure 5**). Elle est constituée de quatre couches (la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale) et de 4 populations cellulaires : les kératinocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merckel et les mélanocytes.

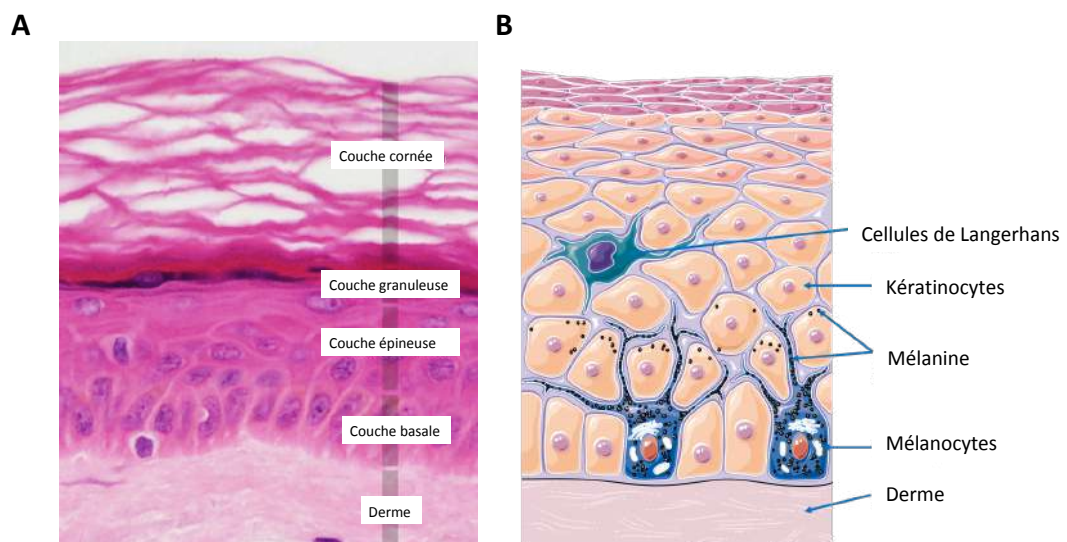


Figure 5 : L'épiderme.

A. Coupe transversale de l'épiderme après fixation et coloration histologique à H&E **B.** Schéma des quatre populations cellulaires composant l'épiderme (source : Servier Medical Art).

Les **kératinocytes** représentent 85 % des cellules de l'épiderme. Ils synthétisent la kératine dont le rôle est de rendre l'épiderme imperméable et de protéger la peau et l'organisme des agressions extérieures.

Les **cellules de Langerhans** représentent quant à elles 3 à 5 % des cellules de l'épiderme. Ce sont des cellules dendritiques, constituant une population cellulaire du système immunitaire innée. Ces cellules détectent, capturent et présentent des antigènes afin d'initier une réponse immunitaire adaptative.

Les **cellules de Merckel** (2 à 5 % des cellules de l'épiderme) sont en contact avec les

terminaisons nerveuses et jouent un rôle important dans la sensibilité de la peau.

Et pour finir les **mélanocytes**, représentent 2 à 5 % des cellules de l'épiderme. Ils produisent la mélanine qu'ils transfèrent aux kératinocytes afin de protéger l'épiderme des rayonnements UV. Les cellules progénitrices des mélanocytes se localisent au niveau de la couche basale.

L'**histogénèse des mélanomes** se déroule en plusieurs stades décrits dans un modèle élaboré par Clark et *al.* en 1984. Le **modèle de Clark** prend en compte le niveau d'invasion basé sur le concept de franchissement de barrières anatomiques. Cette classification permet de définir 5 niveaux, dénommés Clark avec un chiffre allant de I à V (Miller & Mihm 2006) (**figure 6**).

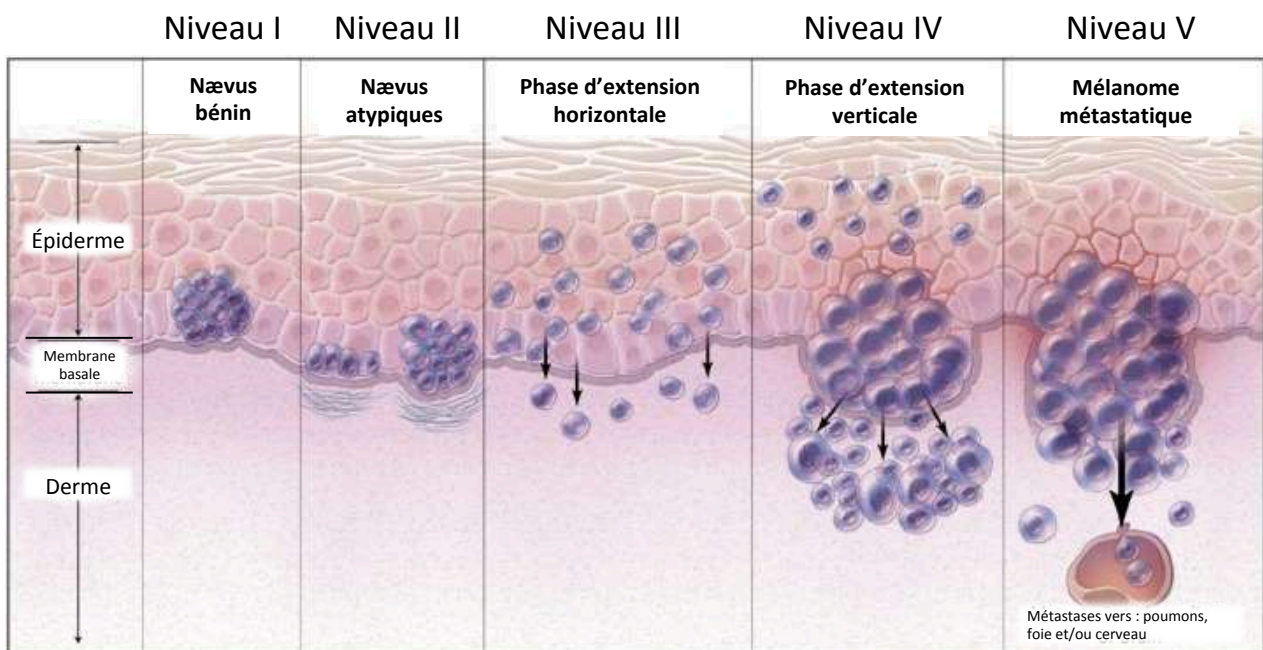


Figure 6 : Modèle de développement du mélanome (le modèle de Clark).

Le mélanome à partir de mélanocytes sains situés à au-dessus de la membrane basale. La progression tumorale peut se décomposer en plusieurs étapes successives représentées sur le schéma (adapté de Clark 1984 et Miller & Mihm 2006).

- **Niveau I** : Les mélanocytes se situent dans la couche basale de l'épiderme, ils peuvent potentiellement proliférer et former un nævus bénin.
- **Niveau II** : Sous l'action de facteurs de risques (qui seront détaillés dans la prochaine sous partie) ils se transforment en cellules malignes formant au dessus de la couche basale un **nævus atypiques** (appelé également nævus dysplasique correspondant au mélanome *in situ*).

- **Niveau III** : Les cellules malignes prolifèrent horizontalement en intra-épidermique, au dessus de la membrane basale (**phase d'extension horizontale** ou d'extension radiale).
- **Niveau IV** : Les cellules malignes envahissent verticalement les couches profondes de la peau, à savoir le derme et de l'hypoderme (**phase d'extension verticale**) et acquièrent leur potentiel métastatique.
- **Niveau V** : Des cellules cancéreuses peuvent s'en détacher et migrer vers d'autres tissus ou organes où elles forment des **métastases** (Gaggioli & Sahai 2007). Les organes où les métastases sont généralement retrouvées sont le foie, les poumons, le cerveau et les ganglions lymphatiques.

Il existe quatre principaux types de mélanome (source : Institut National du Cancer²):

- le **mélanome superficiel extensif** (SSM pour Superficial Spreading Melanoma) est diagnostiqué dans 60 à 70% des cas. Il est surtout localisé sur les membres et touche préférentiellement les femmes. Il a une croissance horizontale prolongée qui devient progressivement invasif. Il est la première cause de décès par cancer chez les jeunes adultes.
- le **mélanome nodulaire** (MN) est la forme la plus rare, 5 à 20 % des cas. Il touche essentiellement les personnes âgées de plus de 60 ans, les hommes et est localisé au niveau du tronc. Il s'agit d'un nodule noir ou brun qui apparaît et augmente de taille rapidement. Il est le seul à avoir une progression verticale et horizontale en simultané. Ce caractère invasif fait de lui le mélanome cutané le plus agressif.
- le **mélanome acro-lentigineux** (MAL). Il touche essentiellement les populations âgées africaines et asiatiques. Il apparaît préférentiellement sur les ongles, la paume des mains ou la plante des pieds.
- Le **mélanome de Dubreuilh** ou lentigo malin (5 à 10 % dans cas) touche le plus souvent les personnes âgées et survient toujours sur une peau exposée de manière chronique au soleil. Il s'agit de taches brunes hétérogènes qui s'étendent progressivement. Cette forme de mélanome pose des problèmes thérapeutiques complexes et lors de l'exérèse en raison de sa grande taille.

Des formes rares de mélanomes existent également telles que :

- **Le mélanome desmoplastique** qui apparaît chez les personnes âgées de plus de 60 ans au niveau du tissu conjonctif de la muqueuse ou de la peau. Il descend en profondeur dans la peau des zones exposées telles que le visage, le cou, et les membres ainsi que les

muqueuses.

- **Le mélanome achromique** qui comme son nom l'indique n'est pas pigmenté. Il est observé dans 40% des mélanomes desmoplastiques et 5% des mélanomes nodulaires. Il a l'aspect d'un bourgeon charnu rosé.
- **Le mélanome muqueux** prend naissance dans les muqueuses de la bouche, des cavités nasales, de l'appareil digestif (anus) ainsi que de l'appareil génital. Il n'est pas lié à l'exposition au soleil comme la plupart des mélanomes. À cause de ses localisations, il est généralement diagnostiqué à un stade tardif et a tendance à se développer et à se propager rapidement.
- **Le mélanome intraoculaire** (ou mélanome de l'uvée) se développe dans l'œil et correspond au cancer le plus fréquent de l'œil.

²www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanome-de-la-peau/Developpement

II. Les facteurs de risques associés au mélanome : un problème de santé publique

Le développement d'un mélanome est associé à des facteurs de risques bien identifiés. On retrouve d'une part des facteurs de susceptibilité individuelle liés à des caractéristiques physiques individuelles (le phototype et phénotype nœvique) mais également des caractéristiques génétiques individuelles ou familiales (présence de mutations somatiques ou germinales). D'autre part, des facteurs extrinsèques liés à l'environnement et/ou le comportement peuvent être impliqués (exposition aux UV, antécédents d'exposition et brûlures solaires).

1. Les facteurs de susceptibilité individuelle

1.1. Les phototypes

Le phototype définit la sensibilité et la réaction de la peau, des yeux, des cheveux face aux expositions aux rayonnements UV. On dénombre 6 phototypes différents (Fitzpatrick 1988), allant de l'albinisme (phototype 0) jusqu'aux peaux et cheveux foncés (phototype VI) (**tableau 1**). Les **phototypes I et II** sont les plus sensibles aux rayonnements UV et donc au développement d'un mélanome car ils possèdent majoritairement de la phéomélanine, une mélanine peu photoprotectrice. Une incidence élevée du mélanome est retrouvée dans les pays où sont présents les phototypes I et II. Cette prédisposition s'explique par une faible quantité de mélanine

noire, l'eumélanine qui protège des rayonnements UV par un renvoi de la lumière. Plus le phototype est clair plus le risque de développer un mélanome est important (Cummins 2006).

Tableau 1 : Phototypes cutanés selon la classification de Fitzpatrick.

Résumé des différents phototypes fondé à partir de la couleur des cheveux, de couleur de la peau, de la présence de taches de rousseur et de la réaction de la peau au soleil.

Phototype	Couleur des cheveux	Couleur de la peau	Taches de rousseurs	Réaction au soleil/coup de soleil	Aptitude au bronzage
0 (albinos)	Blancs	Blanche	Pas de tache	Systématique	aucune
I	Roux	Laitieuse/Claire	Très forte	Systématique	aucune
II	Blonds/Châtain clair	Claire	Forte (apparaissent au soleil)	Très fréquente	Difficile (hâle très léger)
III	Châtains	Claire	Moyenne	Très fréquente	Progressif (hâle clair)
IV	Bruns	Mate	Pas de tache	Rare	Rapide (hâle foncé)
V	Bruns	Foncée	Pas de tache	Exceptionnelle	Rapide (hâle très foncé)
VI	Noirs	Noire	Pas de tache	aucune	noir

1.2. Le phénotype nævique

Le **phénotype nævique mélanocytaire** décrit la présence de grains de beauté. Les nævi sont des tumeurs pigmentées de la peau résultant d'une prolifération des mélanocytes bénigne localisée ou diffuse. On parle de nævi mélanocytaires congénitaux (NMC) s'ils sont présents à la naissance ou de nævi mélanocytaires acquis (NMA) s'ils apparaissent au cours de la vie. Il est observé que 26 % des cas de mélanome se développent sur un nævus préexistant avec 43 % d'entre eux qui proviennent de nævi dysplasiques (appelés également nævi atypiques) et 57% d'autres types de nævi (Bevona 2003). Par ailleurs, un individu ayant un nombre élevé de nævi c'est à dire plus de 100 nævi (on parle de syndrome des nævi atypiques ou Atypical Mole Syndrome (AMS)) a 7,6 fois plus de risques de développer un mélanome qu'un individu en présentant moins de 10 (Cummins 2006).

1.3. Les mutations dans le mélanome : les facteurs de risques génétiques

Le développement du mélanome peut être également d'**ordre génétique**. En effet, 8 à 10 % des cas appartiennent à une famille développant des mélanomes provoqués par des mutations germinales, on parle de « **mélanome familial** » (Cummins 2006). Alors que les 90 % restant résultent de **mutations somatiques**.

1.3.1. Les mutations germinales

Un individu dont un parent de premier degré a été diagnostiqué pour un mélanome a 50% de risques supplémentaires de développer la maladie par rapport à un individu n'ayant aucun historique familial (Olsen 2010).

Ces familles à risques présentent des mutations germinales (ou mutations héréditaires) de certains gènes impliqués dans l'oncogenèse du mélanome. Des études ont permis d'identifier plusieurs gènes de susceptibilités *CDKN2A*, *CDK4* et *MITF* (Marzuka-Alcalá 2014).

Le gène ***CDKN2A*** code pour deux protéines suppresseur de tumeur ARF (ou p14^{ARF}) et INK4A (ou p16^{INK4A}). Dans 20 à 40 % des cas de mélanomes familiaux une mutation affectant la fonction de ces protéines est retrouvée (Goldstein 2007).

Le gène ***CDK4*** code pour la protéine Cdk4 qui se lie à la cycline D1, ce complexe participe au contrôle de la prolifération cellulaire à travers la phase G1 du cycle cellulaire (Wolowiec & French 1996). Toutes les mutations de *CDK4* sont des mutations activatrices qui induisent une modification du domaine de liaison de INK4A, entraînant une réduction de l'inhibition de l'activité de la Cdk4 kinase par INK4A et, par la suite, une progression du cycle cellulaire (Bartkova 1996 ; Puntervoll 2013) (**figure 7**).

Par ailleurs, le risque de développer un mélanome peut être lié également à des mutations du gène *MC1R* qui code pour le récepteur mélanocortine-1 (MC1R), un gène majeur de la mélanogenèse (Nelson 2009). Suite à la fixation de son ligand **α -MSH** (α -Melanocyte stimulating hormone), la signalisation est transmise jusqu'au facteur de transcription **MITF** (microphthalmia-associated transcription factor) qui est un oncogène. MITF régule des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la mélanogenèse et l'apoptose (Garcia-Borron 2014). Des mutations somatiques de MITF sont observées dans les mélanomes mais récemment une mutation germinale, p.Glu318Lys (E318K), a été mise en évidence dans des cas de mélanome et de cancer du rein (Bertolotto 2011). Cette mutation E318K altère la réponse des cellules au stress oxydant, ce qui chez les porteurs de la mutation augmente par 5 le risque de développer un mélanome (Eggermont 2014) (**figure 7**).

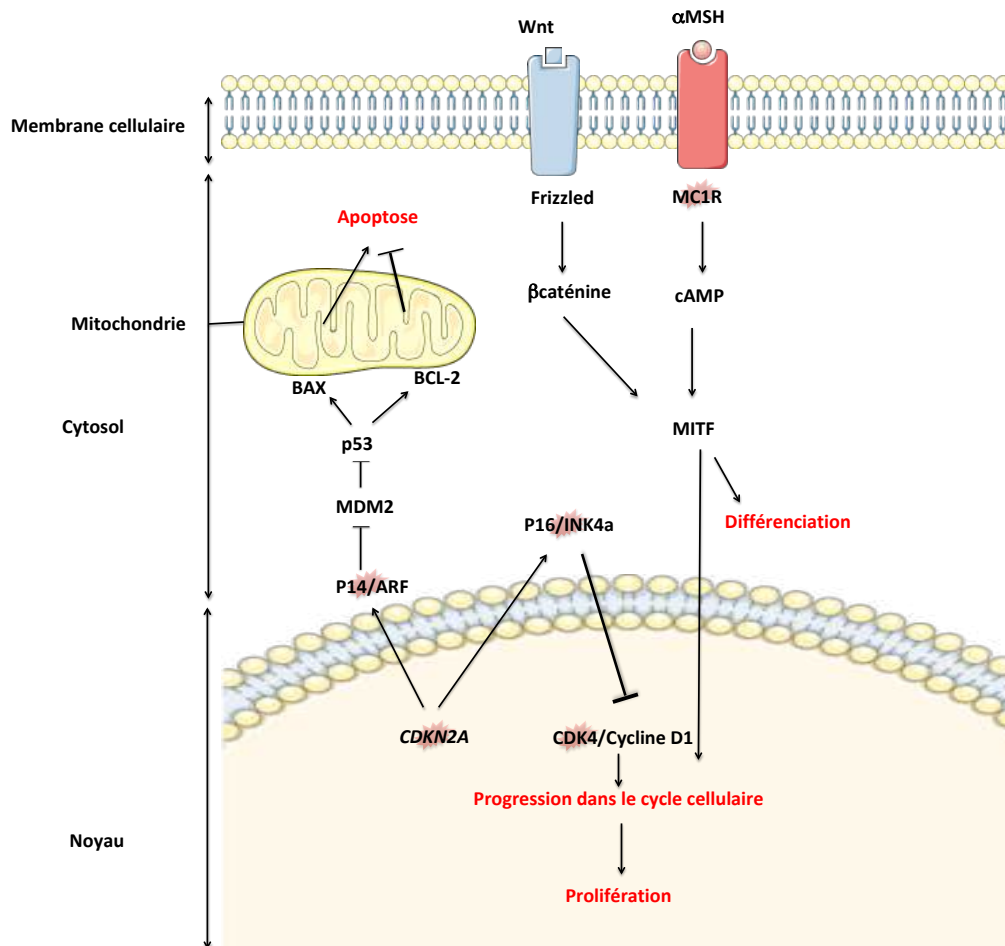


Figure 7 : Les voies de signalisation impliquées dans le développement des mélanomes familiaux.

Les gènes et protéines étoilés (CDKN2A, CDK4/MC1R, p14^{ARF}, p16^{INK4A}) sont impliqués dans le caractère héréditaire des mélanomes.

1.3.2. Les mutations somatiques

Des mutations somatiques peuvent être générées suite à l'exposition aux radiations UV ou bien lors du passage d'un nævus bénin à un nævus atypique ce qui provoque une expansion cellulaire, une réduction de l'apoptose et une diminution de la sénescence des mélanocytes (Slominski 2001). Ces altérations génétiques s'accumulent et affectent la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose conduisant à l'acquisition du phénotype tumoral (Gray-Schopfer 2007 ; Palmieri 2009). Des études décrivent que le mélanome est le cancer le plus fréquemment muté (Hodis 2012 ; Lawrence 2013) (**figure 8**).

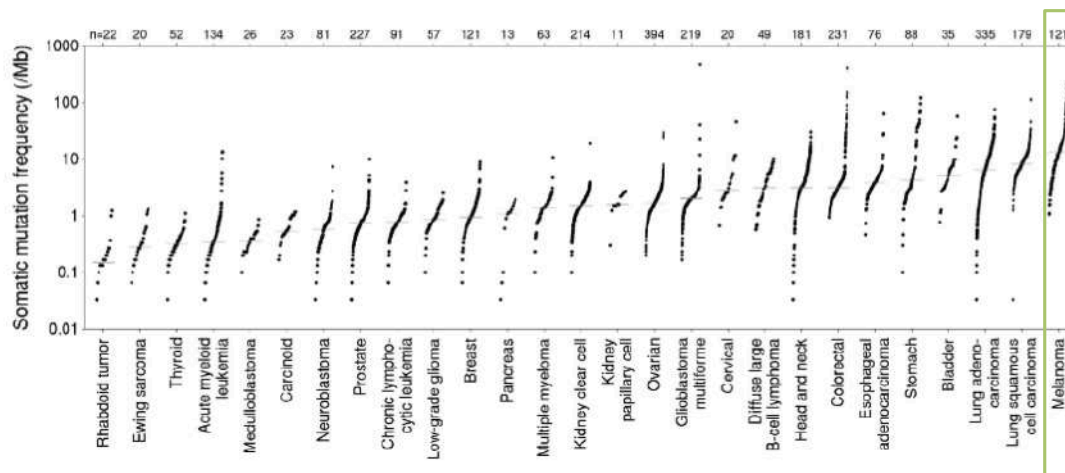


Figure 8 : Fréquence des mutations somatiques de 26 cancers différents. (d'après Lawrence 2013)

Les mutations somatiques sont principalement présentes dans des gènes qui contrôlent la prolifération (*B-RAF*, *N-RAS* et *NF1*), la croissance et le métabolisme (*PTEN* et *KIT*), la résistance à l'apoptose (*TP53*), la synthèse des télomères (*TERT*) et la différenciation mélanocytaire (*MITF*). Les voies de signalisation les mieux caractérisées en oncologie et dans le mélanome, en particulier, sont les voies MAP Kinase (voie RAS-RAF-MEK-ERK) et PI3 Kinase (PI3K-AKT-mTOR) (Slominski 2001 ; Palmieri 2009 ; Gray-Schopfer 2007).

La plupart de ces gènes mutés sont des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. Il est donc important d'identifier ces mutations et de comprendre leur rôle dans les mécanismes cellulaires responsables dans l'acquisition des propriétés cancéreuses. Ces meilleures connaissances ont permis de mettre en place des thérapies ciblant ces facteurs mutés, qu'on appelle des thérapies ciblées.

1.3.2.1. La voie des MAP Kinases

Dans 70 % des cas de mélanome cette voie de signalisation des MAPK également désignée par le sigle ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) est hyperactivée de façon aberrante et présente des mutations oncogéniques au niveau des gènes *B-RAF*, *N-RAS* et *c-KIT* (Inamdar 2010). Physiologiquement, l'activation de la voie des MAPK débute par la liaison à la surface de la cellule d'un facteur de croissance à un récepteur transmembranaire ayant une activité enzymatique de phosphorylation de résidus tyrosine, appelé « activité tyrosine kinase ou TKR » (l'EGF-R et c-KIT principalement) qui induit une cascade d'activation par phosphorylation de protéines kinases intracytoplasmiques. Les protéines RAS activées à la membrane recrutent et activent par phosphorylation les protéines RAF qui vont activer les protéines MEK qui à leur tour activent ERK. ERK activé se transloque dans le noyau où il activera des facteurs de transcription régulant le cycle

cellulaire ou la prolifération tel que c-Fos, c-Myc, c-Jun ou Junb (**figure 9**).

Les protéines **RAS** sont des GTPases et forment une famille constituée des protéines N-RAS, K-RAS et H-RAS. Des mutations activatrices du gène *NRAS* seraient responsables de 28 % des mélanomes métastatiques, les mutations de *HRAS* et *KRAS* étant très rares. La mutation dans le gène *NRAS* concerne dans 90% des cas une substitution de la glutamine en position 61 (Q61) par une arginine, une lysine, une leucine ou une histidine (Q61R, Q61K, Q61L, Q61H) (Wittinghofer 1995).

Quant aux protéines **RAF** qui sont des sérine-thréonine kinases, il existe trois isoformes : C-RAF, B-RAF et A-RAF, codées par des gènes distincts. La mutation activatrice la plus fréquente concerne l'isoforme B-RAF qui est localisée en aval de RAS. Dans 90% des cas, cette mutation du gène concerne une substitution d'une valine en position 600 par un acide glutamique (B-RAF^{V600E}) il constitue une cible thérapeutique (Bradish 2013 ; Wellbrock & Hurlstone 2010). Plus rarement, cette valine 600 peut être remplacée par une lysine (V600K) ou une arginine (V600R) (Scolyer 2011 ; Arkenau 2011). Elle induit une activation constitutive de B-RAF et donc de la voie B-RAF/MEK/ERK (Fecher 2008) favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, et le pouvoir métastatique (Wellbrock 2008). Par ailleurs, les souris transgéniques mutées B-RAF^{V600E} forment spontanément des mélanomes (Dhomen 2009).

Enfin, des cas de mélanomes sont la conséquence d'une hyperactivation du gène *KIT*. La protéine **c-KIT** qui est codée par ce gène est également un RTK qui lie un facteur de croissance des cellules souches le stem cell factor (SCF). c-KIT intervient dans la régulation du facteur de transcription MITF par l'intermédiaire de la voie des MAP-kinases. Environ 70% des mutations du gène sont localisées au niveau de l'exon 11 et de l'exon 13, et conduisent à une activation constitutive de l'activité kinase. Des amplifications du gène *KIT* ont également été observées (Curtin 2006).

1.3.2.2. La voie PI3K/AKT

Cette voie est également dérégulée dans le mélanome, en particulier au stade métastatique. Physiologiquement, l'activation de cette voie débute par l'activation de la PI3Kinase via les RTK ou par l'intermédiaire de la protéine RAS (Miller & Mihm 2006). La PI3Kinase participe à la production de phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) qui recrute et active la PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1). Cette kinase phosphoryle et active la protéine kinase AKT à la membrane. La protéine AKT a plusieurs cibles dont FKHR (forkhead transcription factors), mTOR et GSK3 β . La phosphorylation de FKHR arrête son activité inhibant ainsi l'apoptose. La phosphorylation inhibitrice de GSK3 β régule le cycle cellulaire via les cyclines D1 permettant une prolifération et une survie des cellules. AKT peut également activer indirectement mTOR via la phosphorylation de son inhibiteur TSC2 (Tuberous scléoriss complex 2) (Ma 2005) (**figure 9**).

Cette cascade PI3K/AKT est inhibée par la protéine phosphatase **PTEN**, qui est codée par le gène suppresseur de tumeur *PTEN*. PTEN régule négativement le niveau à la face interne de la membrane plasmique de PIP3 qui joue un rôle d'activateur en tant que 2nd messenger de la voie PI3K/AKT, permettant ainsi d'inhiber la prolifération et la survie cellulaire (Cantley 1999) (**figure 9**).

La perte de l'activité de PTEN induit un niveau constant et élevé de PIP3, ainsi que la phosphorylation activatrice de AKT. L'activation constitutive de AKT prolonge la survie cellulaire en inhibant l'apoptose par inactivation de BAD (BCL-2 Antagonist of cell Death) (Datta 1997), en favorisant la prolifération cellulaire par l'augmentation de l'expression de CCND1 et affecte de nombreux autres gènes impliqués dans la survie et le cycle cellulaire via l'activation du facteur de transcription FKHR (Shain 2016 ; Miller & Mihm 2006). Par ailleurs les souris transgéniques *PTEN*^{-/-} meurent dans les stades précoces de l'embryogenèse, et les souris hétérozygotes *PTEN*^{+/-} développent de nombreuses pathologies tumorales. Cependant, seules les souris *PTEN*^{+/-} *CDKN2A*^{+/-} développent des mélanomes (Chin 2003 ; Ghosh & Chin 2009). Si l'on restaure PTEN dans les cellules de mélanome, leur capacité à former des tumeurs diminue (Stahl 2003).

Des mutations plus rares peuvent survenir, telle qu'une mutation du gène codant la sous-unité catalytique de PI3K (Omholt 2006) ou bien des altérations ciblant la protéine AKT (Cheung 2008).

Toutes ces dérégulations participent à l'activation globale de la voie PI3K/AKT contrôlant la prolifération cellulaire et l'apoptose.

1.3.2.3. La mélanogénèse : implication du facteur de transcription MITF

Chez l'adulte le processus normal de différenciation des mélanocytes nécessite la sortie du stade quiescent des cellules progénitrices (qui sont à la jonction du derme et de l'hypoderme) et l'expression des gènes codant pour les protéines nécessaires à la production de pigment.

Une protéine essentielle au développement et la différenciation des mélanocytes et à la mélanogénèse est le facteur de transcription MITF. Il appartient à la cascade de signalisation induite par la fixation de l' α -MSH sur le récepteur MC1R. Il maintient les cellules progénitrices (Hodgkinson 1993) et régule l'expression de protéines mélanosomales telles que la tyrosinase (Goding 2000), gp100 (ou Pmel17) et l'expression du gène de différenciation mélanocytaire *MLANA*. *MLANA* code pour la protéine Melan-A/MART-1 dont dérive un antigène associé au mélanome qui est reconnu par les LT CD8⁺ cytotoxiques du système immunitaire adaptatif (Du 2003).

Par ailleurs, lors d'une exposition solaire, les cellules progénitrices (exprimant peu MITF) prolifèrent et se différencient en mélanocytes qui expriment fortement MITF. Ce facteur induit la synthèse des enzymes de la pigmentation comme la tyrosinase et les tyrosinases related proteins

1 et 2 (TRP1/2), mais participe également à la survie des mélanocytes en activant l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2 (McGill 2002). Des mutations germinales concernant le gène MITF sont connues mais des mutations somatiques peuvent également apparaître, provoquant une amplification du nombre gène qui est associée à un taux de survie à 5 ans plus faible. Cette amplification est retrouvée dans 10 à 16% des mélanomes métastatiques dans lequel B-RAF est muté (Garraway 2005).

Ces voies pro-tumorales sont représentées en **figure 9**.

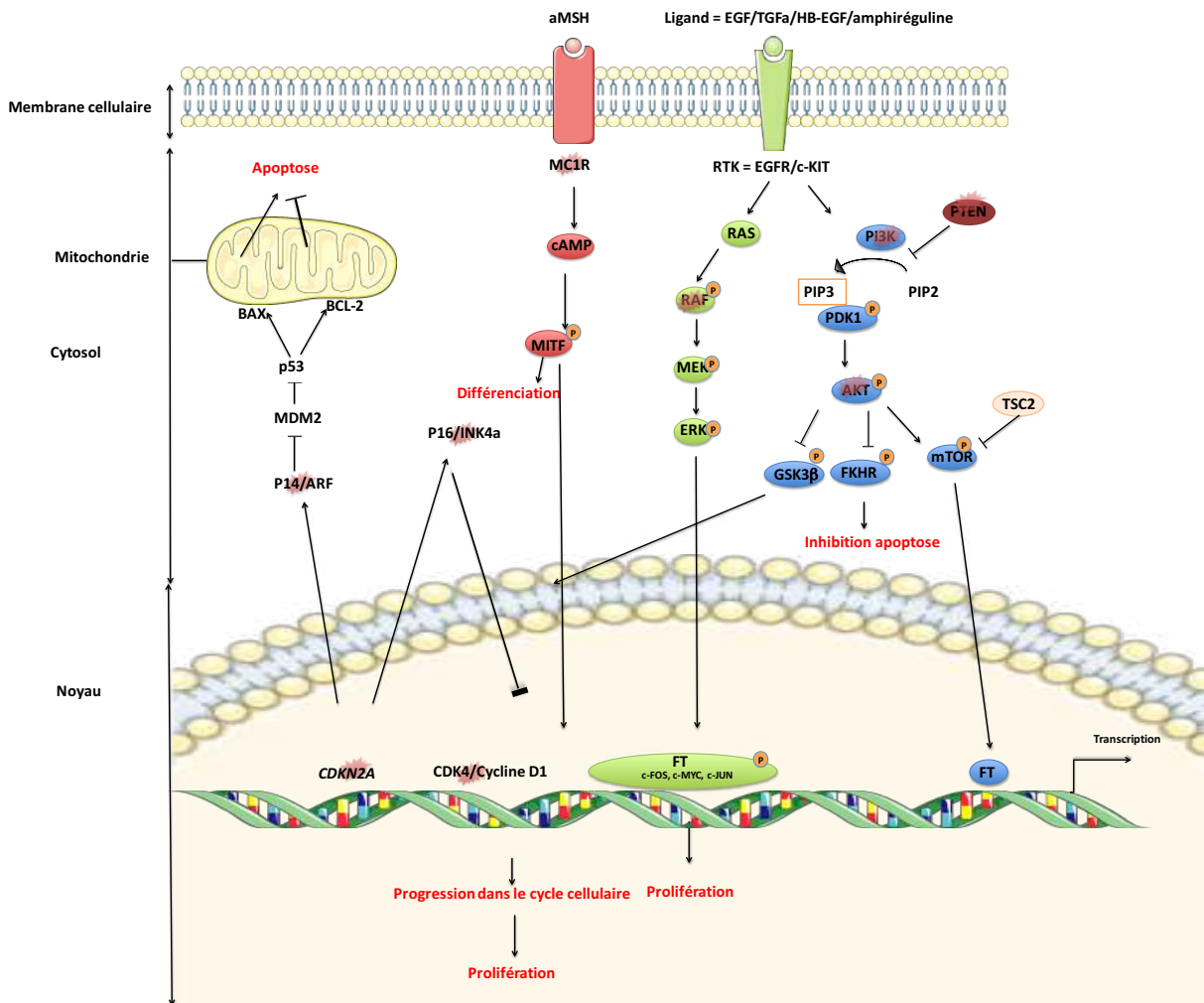


Figure 9 : Les voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome.
(adapté de Palmieri 2009 et Gray-Schopfer 2007)

2. Les facteurs extrinsèques liés à l'environnement et/ou le comportement

Le rayonnement UV est le facteur de risque le plus important du cancer de la peau. L'UV est un rayonnement électromagnétique produit naturellement par le soleil et artificiellement par les lampes à bronzer ou les lasers. Il existe trois types d'UV : les UVA, les UVB et les UVC, ces

derniers n'atteignant pas la surface terrestre. Ils sont différenciés en fonction de leurs longueurs d'ondes, et donc de leur pouvoir de pénétration dans la peau. L'exposition UVA et UVB est un facteur majeur dans la pathogénèse du mélanome (D'Orazio 2013). Ce risque varie en fonction de la sensibilité des individus aux rayonnements solaires avec une prévalence pour les phototypes clairs I et II et une exposition excessive au soleil pendant la jeunesse (D'Orazio 2013 ; Wick 2016).

Les UVA induisent la production d'espèces chimiques oxydantes, comme les dérivés réactifs de l'oxygène tels que les radicaux libres et l'oxygène singulet. Ils peuvent modifier les bases, en particulier la guanine, de par sa capacité à s'oxyder. Dès lors, elle ne s'apparie plus avec la cytosine mais avec l'adénine, et au moment de la réplication de l'ADN puis de la mitose, les guanines sont remplacées par des thymines induisant des mutations (Cadet & Douki 2011). Les bases de l'ADN peuvent également absorber efficacement les UVB, elles se retrouvent avec un excès d'énergie. Une des solutions pour retourner à leur état fondamental est de réagir chimiquement avec le voisinage, en l'occurrence les bases pyrimidiques qui sont les plus réactives. Le rayonnement induit la formation de liaisons covalentes entre deux bases pyrimidiques adjacentes créant ainsi des dimères de pyrimidines (TT ou CC) (Brash 2015) (**figure 10**). Les mutations apparaissent lors de la réplication de l'ADN, suite à des erreurs d'appariement.

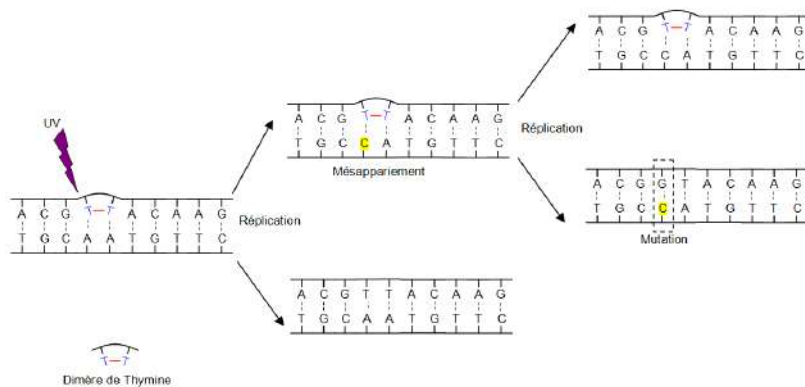


Figure 10 : Dommages à l'ADN par les UVB - Formation d'un dimère de thymidines.

Les UV provoquent la formation de liaison entre 2 thymidines adjacentes perturbant la réplication par l'ADN polymérase. Des mésappariements sont générés provoquant des mutations (adapté de Brash 2015).

III. Dépistage et diagnostic

1. Diagnostic et bilan d'extension

Le dépistage précoce est la clé du pronostic car le mélanome dépisté tardivement à plus de risque d'être invasif c'est à dire en phase verticale et déjà métastatique. Les personnes qui sont considérées comme étant à risque doivent pratiquer des auto-examens tous les 3 mois complétés par une consultation annuelle chez le dermatologue, pour examiner tous les grains de beauté ou taches sur la peau et muqueuses et repérer des lésions suspectes.

La démarche diagnostique est constituée :

- par un **examen clinique** avec analyse anatomique de la lésion grâce aux critères de la règle **ABCDE** (Asymétrie, Bordure, Couleur, Diamètre, Évolution) :
 - **Asymétrie** : grain de beauté de forme ni ronde ni ovale, dont les couleurs et les reliefs ne sont pas régulièrement répartis autour du centre
 - **Bords irréguliers, dentelés, mal limités**
 - **Couleur non homogène** (présence de plusieurs couleurs)
 - **Diamètre augmente** (en général plus de 6 mm)
 - **Évolution** : toute tache pigmentée qui change d'aspect rapidement est suspecte

Tous les mélanomes sont « A, B, C, D, E ». Cet examen clinique (ou examen visuel) permettra d'orienter sur le type de mélanome.

- L'examen clinique est complété par un **interrogatoire** du patient permettant de déterminer les antécédents personnels (brûlures solaires notamment) et familiaux (mélanomes familiaux/mutations germinales).
- La **dermoscopie** ou microscopie de surface ou «microscopie en épiluminescence» permet parfois d'orienter le diagnostic et d'augmenter sa précision. Récemment, un dermatoscope associé à une application smartphone agréé par la FDA, le MoleScope a été développé. Il fournit des images détaillées de haute résolution des lésions cutanées qui seront analysées par un dermatologue. Il ne s'agit pas d'une solution d'auto-diagnostic du mélanome mais d'une solution de télémédecine permettant un suivi par le dermatologue de l'évolution des grains de beauté à risque.

La confirmation du diagnostic est établie sur l'**examen anatomopathologique** des tissus suspects prélevés suite à une **exérèse**. Ils sont fixés dans du formol pour effectuer des études moléculaires ultérieures. Cet examen fournira précisément le type de mélanome et le stade clinique, l'indice de Breslow (épaisseur), la présence d'ulcérations et de mesurer l'indice mitotique (nombre de mitoses/mm²). L'examen anatomopathologique se fait sur une exérèse complète de la lésion et non sur une biopsie car elle peut entraîner des erreurs diagnostiques.

Le bilan d'extension est proposé après le diagnostic d'un mélanome. Il va permettre de mieux définir les caractéristiques de la tumeur, son degré d'extension (permet la détection de métastases) et sélectionner la prise en charge thérapeutique la mieux adaptée.

Ce bilan d'extension est constitué d'un ensemble d'exams médicaux regroupant :

- Un **examen moléculaire** des tissus tumoraux par le séquençage de l'ADN ou de l'ARN permettant d'identifier les mutations génétiques dans les gènes à l'origine du développement du mélanome (B-RAF^{V600E}, c-kit), afin d'orienter la prescription des

thérapies ciblées. Des marquages immunohistochimiques d'antigènes associés au mélanome (ou MAA pour Melanoma-Associated Antigens) tels que S100, gp100, **Melan-A/MART1** et tyrosinase sur des coupes de lésion peuvent être également effectués (Viray 2013).

➤ Un **bilan d'imagerie médicale**. Il peut s'agir :

- d'une **échographie** du foie ou des ganglions lymphatiques situés à proximité de la tumeur. Cet examen permet de réaliser des images de tissus mous grâce à des ultrasons et de repérer des modifications de la structure des organes dû à un envahissement de cellules cancéreuses.

- d'un **scanner** (ou tomодensitométrie (TDM) ou computerized tomography-scan (**CT-scan**)) **thoraco-abdomino-pelvien et cérébral** qui permet de produire des images en trois dimensions du **cerveau**, la **cage thoracique**, l'**abdomen** ou encore les **os**, grâce à des rayons X. Le scanner permet de détecter des anomalies ou des « taches » qui peuvent être le signe d'une propagation de la tumeur et de détecter des anomalies de petite taille (inférieure ou égale à 3 millimètres). Afin d'améliorer la qualité des clichés, un produit de contraste à base d'iode peut être injecté. Il révèle des anomalies qui ne sont pas visibles sur des radiographies standard ou à l'échographie. C'est pourquoi dans certaines situations, il est prescrit en complément de l'échographie (le plus souvent locorégionale des ganglions lymphatiques).

- d'une **TEP/CT**, examen demandé pour les stades III en complément des deux examens d'imagerie indiqués ci-dessus. Elle permet une image en 3 dimensions du corps entier. La TEP/CT est utilisée pour rechercher d'éventuelles métastases invisibles sur les images obtenues par les autres techniques d'imagerie, ou plus souvent pour vérifier s'il n'y a pas de récurrence après les traitements.

- d'une **IRM** (Imagerie par résonance magnétique), technique qui utilise des ondes radio combinées à un champ magnétique pour reconstituer des images très précises de l'intérieur du corps. C'est un examen très sensible et localisé, il permet de détecter très précocement d'éventuelles métastases au niveau du foie ou du cerveau.

➤ Un **examen biologique**, en dosant dans le sang du patient la Lactate Deshydrogénase (LDH). Cet examen est indiqué en cas de découverte de métastases car il s'agit d'un facteur pronostique du mélanome (toutefois la LDH n'est pas spécifique du mélanome).

2. Les stades cliniques

L'ensemble des informations recueillies lors du diagnostic permettent d'établir précisément le stade clinique. L'évaluation du stade fournit une information pronostique essentielle et oriente la prise en charge thérapeutique. Le but de cette évaluation a trois objectifs :

- **Thérapeutique** pour établir le traitement le plus adéquat pour le patient,
- **Pronostique** afin de prévoir l'évolution de la maladie,
- **Prospectif** pour aider de futurs patients en répertoriant la réponse au traitement et en la comparant aux réponses d'autres thérapies à un même stade. Ceci est nécessaire pour que les médecins puissent déterminer quel traitement donne les meilleurs résultats de façon à écarter les thérapies donnant les réponses les moins performantes.

Après l'exérèse chirurgicale, les oncologues décrivent le stade d'avancement de la maladie en se basant sur une classification standard internationale qui est le système pT.N.M de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8^{ème} édition de 2017.

Cette classification pT.N.M se base sur 3 paramètres, T (Tumor), N (Node) et M (Metastasis) ; p indique que le stade a été donné par l'examen anatomopathologique (Garbe 2016 ; Balch 2009).

Le **paramètre T** permet de caractériser la tumeur primaire et tient compte de différents critères dont l'ulcération, l'index mitotique et l'épaisseur de la tumeur mesurée par l'indice de Breslow (**figure 11**). En fonction de l'indice de Breslow un pronostic peut être établi (**tableau 2**).

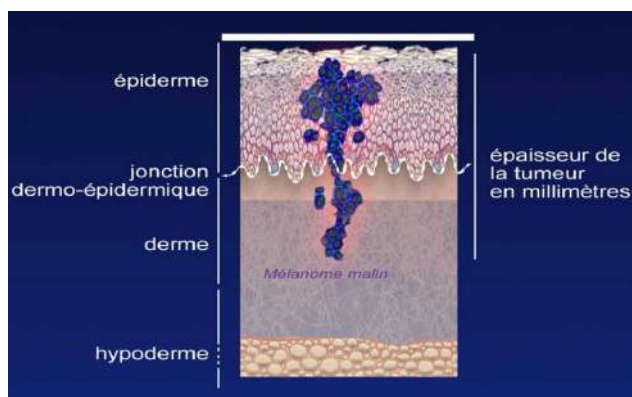


Figure 11 : L'épiderme – Indice de Breslow.

L'indice de Breslow se mesure entre la couche granuleuse de l'épiderme et la cellule tumorale la plus profonde après fixation et coloration à l'hémalum-éosine de l'exérèse (source : dermato-info.fr).

Épaisseur du mélanome (indice de Breslow)	Survie estimée à 5 ans
< 0,75 mm	99 %
0,75 mm à 1,5 mm	94%
1,6 à 2,25 mm	80%
2,26 à 3 mm	75%
> 3 mm	46%

Tableau 2 : Survie à cinq ans selon l'indice de Breslow.

L'indice de Breslow est un indice histologique qui permet de prédire la survie à 5 ans à partir de l'exérèse.

Le paramètre N est établi à partir de la présence de métastases au niveau local par rapport à la tumeur primaire ou au niveau des ganglions lymphatiques. C'est le premier niveau métastatique avant les métastases à distance.

Le troisième, **paramètre M**, est fonction de la présence ou non de métastases à distances au niveau lymphatique, pulmonaire, osseux ou viscérale. Ce paramètre se base sur deux facteurs, la localisation des métastases et l'élévation du LDH dans le sang (**tableau 3**).

Tableau 3 : La classification pTNM pour le mélanome.

La classification TNM permet aux médecins de déterminer le stade d'avancement de la maladie. (adapté de Garbe 2016 ; Balch 2009 Gershenwald JE, AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition).

Classification T			Classification N			Classification M		
	Épaisseur de la tumeur	Paramètres additionnels		Nombre de ganglions lymphatiques impliqués	Étendue des métastases dans les ganglions lymphatiques		Type de métastases à distance	LDH
Tis	NA	In situ, pas invasion	N0	0	NA	M0	Pas de métastases à distance	NA
T1	<1,0 mm	(a) sans ulcération et mitoses <1/mm ² (b) avec ulcération ou mitoses >1/mm ²	N1	1	(a) micrométastases (b) macrométastases	M1a	Peau, tissus sous-cutanés, ganglions lymphatiques	Normal
T2	1,01 - 2,0mm	(a) sans ulcération (b) avec ulcération	N2	2-3	(a) Micrométastases (b) macrométastases (c) métastases satellites ou en transit	M1b	Poumons	Normal
T3	2,01 – 4 mm	(a) sans ulcération (b) avec ulcération	N3	> 4 ou métastases en transit et ganglions lymphatique		M1c	autres organes/ tissus	Normal
T4	>4,0 mm	(a) sans ulcération (b) avec ulcération					autres organes/ tissus	Élevé

Les valeurs des paramètres T, N et M permettent de définir le stade d'avancement du mélanome qui sont exprimés par un chiffre et une lettre en fonction du TNM, allant de 0, pour le stade le moins avancé, à IV pour le plus avancé (**tableau 4**). Le stade 0 appelé mélanome *in situ* est considéré comme un état pré-cancéreux de la peau. Les stades I et II qui correspondent à des mélanomes localisés, avec au stade II des tumeurs qui sont de plus grande épaisseur et/ou ulcérées. Le stade III correspond à des mélanomes avec métastases locorégionales cutanées ou ganglionnaires. Le stade IV correspond aux mélanomes avec métastases à distance.

Tableau 4 : Stade de développement du mélanome en fonction de la classification pTNM.

La détermination du stade de développement du mélanome dépend de la classification TNM (adapté de Balch 2009).

Stade	0	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC	IV
TNM	Tis NO M0	T1a	T1b T2a	T2b T3a	T3b T4a	T4b	N1a T1-4a N2a T1-4a	N1a T1-4b N2a T1-4b N1b T1-4a N2b T1-4a N2c T1-4a	N1b T1-4b N2b T1-4b N2c T1-4b N3 tous les T	M1a tous N et T M1b tous N et T M1c tous N et T

Les stades IA et IB sont associés à un très bon pronostic puisque la survie à 5 ans est de 99% et 97 % respectivement (données de 2017). Les stades IIA, et III A sont également de bons pronostics avec une survie à 5 ans de 94 et 93 % respectivement. Alors que les stades associés à des métastases locales à savoir les stades IIB, IIC, IIIB, IIIC, les patients ont un taux de survie à 5 ans qui décroît rapidement qui sont de 87 %, 82 %, 83% et 69% respectivement (**figure 12 A et B**). Le stade IIID qui est un stade à haut risque de récurrence possède un taux de survie à 5 ans très bas de l'ordre de 32%. Au stade IV correspondant au stade métastatique à distance, l'exérèse des métastases est réalisée dans la mesure du possible selon leur accessibilité. le taux de survie à 5 ans reste très bas (5 à 19%) avec une médiane de survie de 8 à 9 mois (Miller & Mihm 2016). Malgré le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, le mélanome au stade IV reste incurable (Gershenwald 2017).

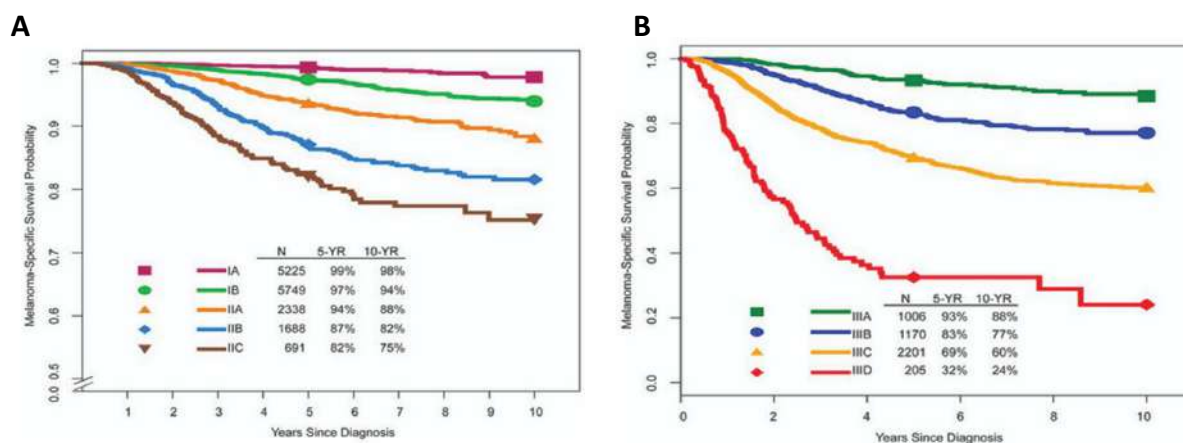


Figure 12 : Taux de survie à cinq et dix ans selon le stade de développement du mélanome.

A . Taux de survie pour les stades I et II B. Taux de survie pour le stade III (d'après Gershenwald 2017).

Cependant, le système de classification pTNM ne prend pas en compte l'environnement immunitaire de la tumeur qui s'est révélé capable d'influencer l'évolution de la maladie. En 1996,

Clemente et *al.* démontrèrent que l'existence d'un infiltrat de LT dans la tumeur (TIL) était un facteur de bon pronostic pour les patients atteints d'un mélanome cutané primaire en phase de croissance verticale (Clemente 1996). Ils classifièrent cet infiltrat lymphocytaire en 3 catégories : absence de TIL, faible infiltrat et fort infiltrat. Récemment Tume et *al.* ont démontré que la réponse clinique des patients atteints de mélanome répondants au traitement par immunothérapie anti-PD-1 était associée, avant traitement, à l'existence à la marge tumorale d'un infiltrat de LT CD8⁺ exprimant de fort niveau de PD-1. Cet infiltrat est localisé à la périphérie des tumeurs exprimant PD-L1 avant traitement. Suite à l'immunothérapie anti-PD-1, l'infiltrat de LT CD8⁺ est retrouvé à l'intérieur de la tumeur pour les patients répondeurs (tumeur dites « chaudes », contrairement aux tumeurs non répondantes dites « froides») (Tume et *al.* 2014) (**figure 13**).

L'idée d'inclure un paramètre immunologique, l'**immuno-score**, à cette classification a émergé et a été proposée par les équipes du Dr. Galon et du Pr. Pagès. Il détermine la qualité de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur (types cellulaire, densité et localisation) afin de prédire la réponse au traitement et la survie des patients atteints de cancers colorectaux amenant vers une nouvelle classification la **TNM-Immune** (TNM-I) (Ascierto 2013 ; Galon 2014). Cet immuno-score tend à être utilisé pour le mélanome en évaluant en complément l'immuno-infiltrat dans les ganglions lymphatiques mais également en analysant le profil immunologique des LT (IDO, TIM-3, CD137) (Galon 2016).

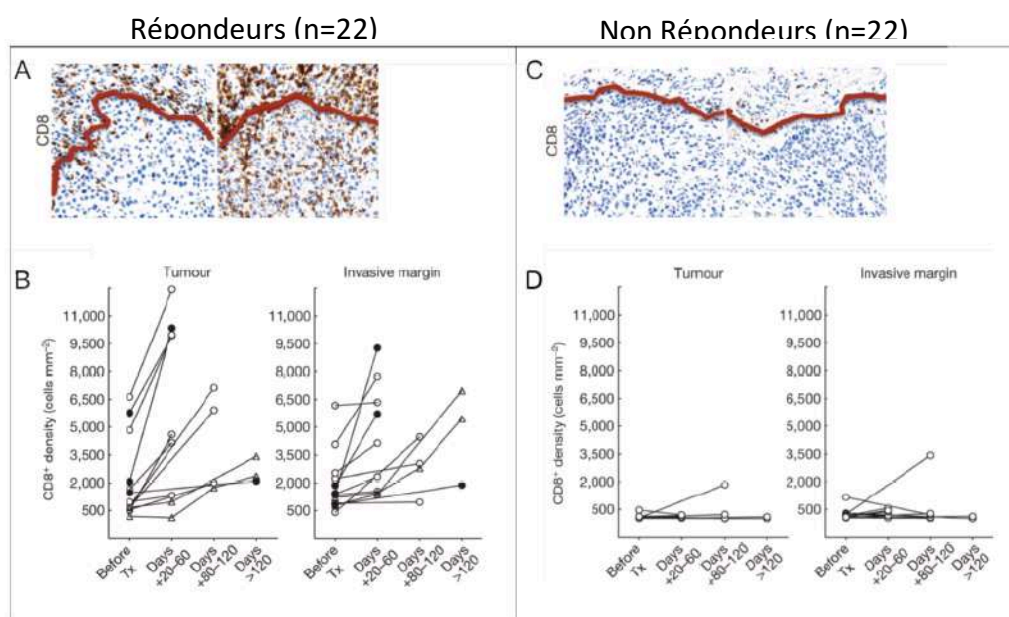


Figure 13 : Infiltrat lymphocytaire T CD8⁺ cytotoxique avant et après traitement de patients répondeurs ou en progression.

Immunohistochimie anti-CD8 révélant la présence de LT CD8⁺ cytotoxiques chez **A.** un patient répondeur et **C.** un patient non répondeur, en progression. La densité de l'infiltrat dans la tumeur ou à la marge avant et après traitement (anti-PD-1) chez **B.** un patient répondeur et **D.** un patient non répondeur, en progression.

Partie 2 : Le mélanome : un défi thérapeutique

Chapitre 1 : Les traitements conventionnels

La majorité des mélanomes diagnostiqués (90%) sont des tumeurs primaires non métastatiques (stade I) et sont systématiquement traitées par exérèse chirurgicale, avec un taux de survie à 5 ans approchant 90%. Comme mentionné dans la première partie, le problème du traitement se pose lorsqu'il y a dissémination métastatique dans ce cas la survie à 5 ans n'excède pas les 5 à 19%.

L'arsenal thérapeutique à disposition des oncologues s'est largement élargi avec le développement des thérapies ciblées (inhibiteurs de B-RAF et de MEK) et des immunothérapies (anticorps bloquants, vaccination thérapeutique, transfert adoptif de cellules du système immunitaire). Selon les caractéristiques de la tumeur, c'est à dire la localisation, le stade clinique et le profil génétique (recherche des mutations B-RAF), les options thérapeutiques sont adaptées au cas par cas. Les patients peuvent être traités par un ou plusieurs des traitements qui sont présentés.

I. La chirurgie : le traitement standard du mélanome

La chirurgie reste le traitement de référence pour le mélanome de stade I à IIIB. Elle consiste à pratiquer une exérèse de la tumeur et de ses métastases accessibles mais également des ganglions lymphatiques sentinelles s'ils sont atteints. Elle peut être associée à un autre traitement et/ou une radiothérapie externe.

La chirurgie de la tumeur primaire s'effectue en deux fois, la première permet de retirer la lésion qui sera analysée lors de l'examen anatomopathologique pour confirmer ou infirmer le diagnostic, elle est appelée « exérèse diagnostic ». Si un mélanome est diagnostiqué, une deuxième excision appelée « exérèse locale large » est réalisée pour enlever de la peau saine autour de la tumeur. Cette chirurgie est le premier traitement pour le mélanome de stade précoce, le mélanome locorégional ou une récurrence locale (Garbe 2011). Chez les patients ayant une tumeur supérieure à 1,5 mm et/ou ulcérée, une biopsie du ganglion sentinelle est effectuée. Si des métastases sont trouvées alors un curage ganglionnaire (l'ensemble des ganglions) dans la zone de drainage de la tumeur est effectué. Lorsque le stade IV métastatique est atteint, l'exérèse des métastases est effectuée si elles sont accessibles (Garbe 2011).

II. La radiothérapie externe : peu utilisée dans le traitement du mélanome

Dans le traitement du mélanome la radiothérapie externe est très peu utilisée. Cependant une radiothérapie adjuvante peut être effectuée pour détruire les cellules cancéreuses qui restent après une chirurgie afin de réduire le risque de récurrence du cancer. Une radiothérapie palliative peut également être réalisée pour soulager la douleur ou maîtriser les symptômes d'un mélanome métastatique, notamment des métastases osseuses qui entraînent une douleur ou une compression (par exemple compression de la moelle épinière avec un risque de paralysie). Enfin, elle peut être utilisée pour des métastases cérébrales qui sont difficiles d'accès (Strojan 2010 ; Khan 2011).

III. La chimiothérapie : le traitement historique du mélanome métastatique

Actuellement, la chimiothérapie est utilisée après l'échec des traitements par immunothérapie et thérapies ciblées ou bien lorsque ces traitements sont contre-indiqués. Malgré un bénéfice très limité pour les patients, elle peut être proposée pour traiter les mélanomes de stade III qui ne sont pas opérables, ou les mélanomes de stade IV (d'après l'Institut National du Cancer). Les principaux agents chimio-thérapeutiques sont : la **dacarbazine**, la **fotémustine** et le **temozolomide**. Ce sont des agents alkylants, molécules formant des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN et inhibant ainsi la réplication (Jilaveanu 2009).

La **dacarbazine** est un agent chimiothérapeutique approuvé en 1974 par la FDA pour les mélanomes de stades IV. Elle est injectée par voie intraveineuse aux patients sous forme d'une pro-drogue qui est métabolisée par le foie et plus précisément par le cytochrome p450 réductase en une molécule active (Rooseboom 2004). Le taux de réponse objective associé à cet agent est de 20%, avec un taux de rémission complète de 5% et une médiane de durée de réponse de 5 à 6 mois seulement. En dépit de ces résultats, la dacarbazine seule reste le traitement chimiothérapeutique de référence pour le mélanome de stade IV car l'association avec d'autres chimiothérapies notamment le cisplatine n'améliore ni le taux de réponse ni la survie des patients (Serrone 2000).

La **fotémustine** est un composé nitroso-urée liposoluble qui est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. C'est la seule molécule de cette famille utilisée dans le traitement du mélanome lorsqu'il y a des métastases cérébrales (Miller & Mihm 2016). Un traitement par la fotémustine induit une réponse objective de 15,2% contre 6,8% pour la dacarbazine mais pas d'allongement de la survie globale (Avril 2004).

L'association de la fotemustine et la dacarbazine a montré des taux de réponses plus importants (entre 11,7 et 33%) mais sans amélioration de la durée de survie qui était accompagnée de toxicités très variables (Serrone 2000).

Plusieurs polychimiothérapies ont aussi été testées telles que la BOLD (bléomycine/vincristine/lomustine/dacarbazine). Cependant, elles n'ont pas amélioré la survie ni le taux de réponse par rapport à une monochimiothérapie et la toxicité était plus importante (Garbe 2011). C'est pourquoi actuellement, les polychimiothérapies ne sont pas prescrites pour le traitement du mélanome métastatique.

Le **temozolomide** est une pro-drogue administrée par voie orale ayant le même mode d'action que la dacarbazine (Bei 2010). Elle est prescrite comme agent chimiothérapeutique pour des tumeurs au cerveau et à la moelle épinière puisqu'elle passe la barrière hémato-méningée. Une étude de phase III menée chez des patients atteints d'un mélanome de phase IV a démontré qu'il n'apportait pas de bénéfice supplémentaire par rapport à la dacarbazine (Middleton 2000).

Chapitre 2 : Les thérapies ciblées : une des avancées majeures dans le traitement du mélanome

Les thérapies ciblées sont de plus en plus explorées et développées dans de nombreux types de cancers dont le mélanome. L'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques intervenant dans le développement du mélanome ont permis l'émergence de ces thérapies ciblées. Elles visent à inhiber spécifiquement des protéines, des voies mutées et/ou dérégulées dans le mélanome tout en épargnant les cellules saines de l'organisme. Elles perturbent principalement les signaux des voies : MAP Kinase et PTEN/PI3K/AKT/mTOR qui sont les voies les mieux connues à ce jour (Singh 2008 ; Seetharamu 2009 ; Davies 2010).

I. Les inhibiteurs de B-RAF

Comme il a été évoqué précédemment 70% des cas de mélanome d'origine génétique se développent suite à une mutation activatrice et constitutive de la voie des MAPK (B-RAF/MEK/ERK), voie conduisant à la prolifération et à la survie des cellules tumorales. Plus précisément l'identification de la mutation B-RAF^{V600E} a constitué une avancée majeure dans le traitement de ce cancer (Gray-Schopfer 2007 ; Ascierto 2012).

Le **sorafenib** a été le premier inhibiteur utilisé en thérapie ciblée. C'est un inhibiteur à large spectre de l'activité des tyrosines kinases telles que le VEGFR, le PDGFR et RAF. Des essais cliniques de phase III ont été entrepris pour le mélanome cependant cette molécule n'apportait aucun bénéfice et provoquait de nombreux effets indésirables (apparition de naevi, troubles du développement kératinocytaire) (Bennani-Lahlou 2008 ; Jantzen 2009). De ce fait, il a été progressivement abandonné et un inhibiteur ciblant spécifiquement la forme mutée de B-RAF, B-RAF^{V600E} a été développé : le **vémurafénib**.

Le **vémurafénib**, utilisé en phase I sur des patients portant cette mutation, a induit 81% de réponses objectives (Flaherty 2010). Une étude en phase III a été menée en comparant le vémurafénib à la dacarbazine avec de bons résultats, la médiane de survie sans rechute étant de 5,7 mois pour le vémurafénib contre 1,6 mois pour la dacarbazine (Chapman 2011) (**figure 14**). Il est important de rappeler que la prescription de cet inhibiteur est restreinte aux tumeurs exprimant la protéine B-RAF^{V600E}. Il est indiqué en première ligne dans le traitement de mélanome métastatique B-RAF^{V600E}, permettant ainsi d'inhiber efficacement la voie de signalisation en aval (MEK/ERK).

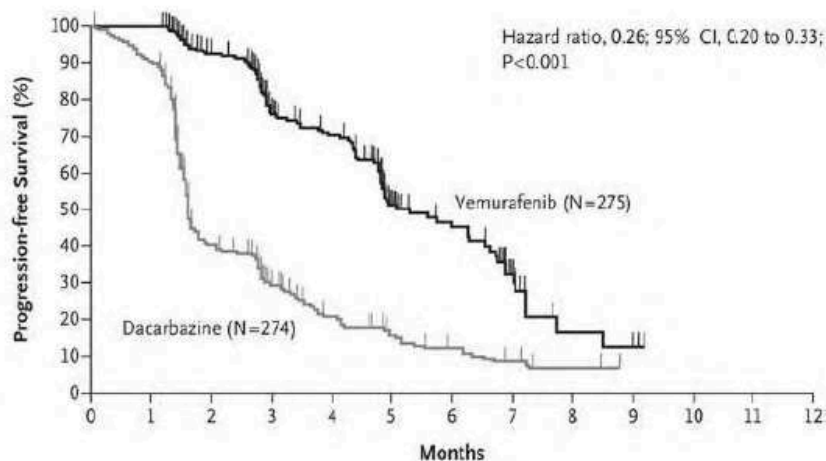


Figure 14 : Taux de survie sans rechute : comparaison Vémurafenib et Dacarbazine.
(d'après Chapman 2011)

Le **dabrafénib** est le second inhibiteur de B-RAF^{V600E} à avoir été approuvé par la FDA en 2013 pour le traitement du mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation B-RAF^{V600E}. Les résultats obtenus après l'essai clinique de phase III ont révélé que le dabrafénib a un effet thérapeutique supérieur à la chimiothérapie. Le temps de survie sans rechute et le taux de réponse objective étaient de 5,1 mois et 50 % après le traitement à la dabrafénib et seulement 2,7 mois et 6% après le traitement par chimiothérapie (Hauschild 2012).

Des effets secondaires variés peuvent apparaître suite aux traitements par le vémurafenib ou le dabrafenib. Ils peuvent provoquer des hyperkératoses, de l'arthralgie, ou encore des carcinomes à cellules squameuses (Russo 2018). De plus, dans une minorité de patients, ils ont induit le développement de nouveaux mélanomes primitifs (Zimmer 2012).

II. Les inhibiteurs de MEK

Différents inhibiteurs de la kinase MEK ont été développés : le tramétinib, le sélumétinib et le cobimétinib. Ces inhibiteurs agissent plus en aval que l'anti-B-RAF pour bloquer la prolifération des cellules cancéreuses puisque la protéine MEK intervient en aval de B-RAF dans la voie des MAP kinases (Flaherty 2012).

Le **tramétinib** est à ce jour l'inhibiteur de MEK le mieux étudié dans le mélanome. Un essai de phase III mené chez des patients atteints d'un mélanome métastatique de stade III résecable ou IV, ayant reçu au maximum une ligne de traitement, a démontré un taux de réponse de 22% et une médiane de survie sans rechute de 4,8 mois comparativement à la dacarbazine (8% et 1,5 mois) (Flaherty 2012). Il reste inefficace en deuxième ligne de traitement chez des patients pré-

traités par les inhibiteurs de B-RAF ce qui révèle l'émergence de mécanismes de résistance induits par les traitements anti-B-RAF. Les résultats de l'essai indiquent que le tramétinib n'est pas aussi efficace que le dabrafénib ou le vemurafénib. C'est pourquoi il est préconisé que l'utilisation des inhibiteurs de MEK en thérapie soit combinée avec des inhibiteurs de B-RAF.

III. Résistances aux thérapies ciblées

L'efficacité thérapeutique des thérapies ciblées est notable mais restreinte dans le temps. En effet des phénomènes de résistance apparaissent généralement quelques mois après le traitement, limitant les bénéfices à long terme (Kozar 2019).

- Les lignées cellulaires qui ont la cycline D1 amplifiée dans 15 à 20 % des cas de mélanomes (CCND1) étaient plus résistantes au traitement anti-B-RAF (Sauter 2002).
- Le statut mutationnel du suppresseur de tumeur, PTEN, est un autre biomarqueur prédictif, de mauvais pronostic. En effet une délétion ou une perte de sa fonction via une mutation inhibitrice entraîne dans 10 % des mélanomes une signalisation accrue de la voie PI3K (Shain 2016 ; Miller & Mihm 2006 ; Irvine 2018). Cette voie permet de prendre le relais dans la prolifération des cellules si la voie des MAPKinases est inhibée par les traitement anti-B-RAF.
- Récemment, deux groupes ont décrit l'importance du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et son interaction avec son récepteur cMET, dans la médiation de la résistance intrinsèque à l'inhibition de B-RAF (Wilson 2012 ; Straussman 2012). La co-culture de cellules stromales avec des cellules de mélanome B-RAF mutant sensibles à l'inhibiteur de B-RAF a conduit au développement d'une résistance. L'analyse protéomique a montré que l'axe HGF/c-MET jouait un rôle important dans ce processus et que l'ajout d'un inhibiteur de HGF ou de c-MET à celui de B-RAF rétablit la sensibilité de l'inhibiteur de B-RAF.
- La protéine RAS peut phosphoryler MEK en passant par C-RAF (protéine kinases de la famille RAF), contournant ainsi l'inhibition de B-RAF. C'est pourquoi l'action des thérapies ciblées anti-B-RAF est à présent systématiquement renforcée par un inhibiteur de la kinase MEK pour permettre de contrecarrer cette résistance. De plus le traitement avec des inhibiteurs de B-RAF ont l'inconvénient de se restreindre aux tumeurs/patients porteurs de la mutation V600E (Flaherty 2010).

- En outre, la kinase COT (connue sous le nom de TPL2 ou MAP3K8) active directement la signalisation MEK / ERK de manière indépendante de RAF. Elle est souvent surexprimée dans les tumeurs résistantes aux inhibiteurs de B-RAF et est probablement responsable de la résistance dans environ 10 % des mélanomes B-RAF mutant (Johannessen 2010).
- Des travaux démontrent également que le vémurafenib active ERK et ainsi augmente la prolifération et la migration des cellules de mélanome B-RAF^{V600E} (Halaban 2010).

Chapitre 3 : Les immunothérapies - avant les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires

Au début du XXème siècle le concept de l'immunosurveillance des tumeurs par le système immunitaire a été énoncé par Paul Ehrlich. Puis il a été repris par Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas qui formulèrent l'hypothèse que nos cellules peuvent subir des mutations somatiques amenant au développement de tumeurs et qu'il doit exister des mécanismes immuns éliminant ces cellules cancéreuses par le fait qu'elles expriment à leur membrane des molécules différentes des cellules saines (Dunn 2004). Le Pr. Robert Schreiber a revisité le concept d'immuno-surveillance et proposé le concept **d'immunoédition** (cancer immunoediting) **ou théorie des 3E**. Dans cette théorie, l'interaction entre le système immunitaire et la cellule tumorale peut conduire à l'Élimination de la tumeur, à un état d'Équilibre (maîtrise de la prolifération des cellules tumorales sans éradication) ou à un Échappement de la cellule tumorale au contrôle immunologique. Lors de cette dernière phase le système immunitaire est devenu inefficace pour contrôler la croissance tumorale, en raison entre autre de la création d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Dunn 2004 ; Schreiber 2011).

Ce concept a été renforcé par le fait qu'un nombre de patients ont vu leur tumeur régresser spontanément à différents stades de la maladie (Bramhall 2014 ; Kalialis 2009). Il a été observé que la présence d'un infiltrat de TIL est un marqueur de bon pronostic attestant qu'un recrutement intra-tumoral des effecteurs de l'immunité favorise l'élimination du mélanome (Erdag 2012). Au vu de ces observations de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-tumorales ciblant le système immunitaire ont été développées.

Dans le traitement du mélanome ces immunothérapies agissent à différents niveaux dans le but (Domingues 2018) :

- de stimuler la réponse anti-tumorale endogène via des traitements cytokiniques, l'utilisation de virus oncolytiques, ou des approches de vaccination anti-tumorale.
- d'apporter des effecteurs de la réponse anti-tumorale par le transfert adoptif de TIL ou CAR (chimeric antigen receptor) T cells.
- d'empêcher la tolérance immunitaire par le blocage des points de contrôle CTLA-4, PD-1 et PD-L1 (appelés également immune checkpoints).

I. Les traitements cytokiniques

1. Interleukine 2 (IL-2)

L'interleukine 2 est une cytokine découverte en 1976 comme facteur de croissance sécrété par les lymphocytes T activés *in vitro* (Morgan 1976). Lorsque l'IL-2 se fixe à son récepteur de haute affinité (formé des chaînes α , β et γ , exprimé de manière transitoire par les LT effecteurs) elle permet de développer des réponses immunes à médiation lymphocytaire.

En 1998, elle fut l'une des premières stratégies d'immunothérapies pour le traitement du mélanome métastatique (Keilholz 1998 ; Krieg 2010). Une récente méta-analyse montre que le taux de réponse objective n'excède pas les 4% (Bright 2017). Des traitements administrant l'IL-2 en intratumoral montraient des résultats encourageants pour les patients atteints de métastases cutanées sans atteinte des ganglions lymphatiques, avec un taux de réponse objective de 36,7% (Weide 2011). Les effets secondaires sévères ont fait reconsidérer l'utilisation de l'IL-2 à des doses plus faibles ou comme adjuvant. Cependant la découverte *in vivo* que l'IL-2 joue un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs (LT_{reg}, exprimant de manière constitutive le récepteur de haute affinité) et le contrôle des réponses auto-immunes et inflammatoires a mis à mal la vision de l'IL-2 en tant que facteur induisant des réponses immunitaires anti-tumorales. Ce paradigme a des conséquences majeures sur l'utilisation de l'IL-2 en thérapie. Il suscite de nouvelles stratégies s'orientant vers la manipulation de la balance entre lymphocytes T effecteurs (forte dose d'IL-2 mais présence de toxicités importantes) et LT_{reg} (faible doses d'IL-2) (Jacques & Mortier 2016).

2. Interféron α -2b

L'IFN α -2b est une cytokine sécrétée par les cellules en réponse à des infections virales. Il a des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et immunomodulateurs comme l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages et l'augmentation de la cytotoxicité spécifique des LT. En 1995 la thérapie avec une forte dose d'IFN α -2b a été approuvée par la FDA comme adjuvant thérapeutique dans le traitement du mélanome de stade IIB/III (Rafique 2015).

Un essai clinique de phase III été effectué chez des patients atteints de mélanome de stade II et III, afin de déterminer la dose à administrer par voie systémique. Ils ont démontré qu'à faible dose ou à dose intermédiaire, l'IFN α -2b n'avait pas d'effet thérapeutique puisqu'aucune amélioration de la médiane de survie n'était observée. Le traitement à forte dose permet d'allonger la durée de vie sans rechute cependant sans modifier la survie globale (Punt & Eggermont 2001).

Des études démontrent qu'une meilleure sélection des patients permettrait une amélioration des réponses cliniques. En effet, des patients présentant peu de ganglions envahis (stade III-N1) par rapport aux patients III-N2 de même que ceux qui présentent une ulcération de la tumeur primaire répondent mieux au traitement par l'interféron. Cependant la survie globale n'est toujours pas améliorée (Eggermont 2008 ; Wheatley 2003).

3. Ciblage du TNF α

Le Tumor Necrosis Factor α (TNF α), est une cytokine produite par les LT activés, les NK et les cellules phagocytaires. En onco-immunologie le TNF α joue un double rôle puisque comme son nom l'indique il induit la nécrose des cellules tumorales (Carswell 1975). Néanmoins il peut induire des effets pro-tumoraux en facilitant l'accumulation et l'activité biologique des LT_{reg}, des lymphocytes B régulateurs et des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) qui sont des modulateurs négatifs du système immunitaire anti-tumoral (Chen 2007 ; Schioppa 2011 ; Zhao 2012).

Dans le traitement du mélanome, contrairement aux cytokines cités ci-dessus, le TNF α n'est pas utilisé en tant que tel mais neutralisé par un Ac anti-TNF α . Dans ce contexte, une étude préclinique, menée sous la direction du Pr. Bruno Ségui, montre que la neutralisation du TNF α ou de son récepteur, le TNFR1, potentialise la réponse aux anti-PD-1 dans des modèles de mélanome, de cancer du poumon et de cancer du sein. Le traitement par des anti-PD-1, utilisés seuls, induit une forte production de TNF α dans le microenvironnement tumoral, lequel augmente l'expression de points de contrôle immunitaires secondaires (TIM-3). La signalisation par le TNF α dépendante de TNFR1 entraîne donc une inactivation des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur de mélanome murin syngénique (B16K1) et conduisant à la résistance aux immunothérapies (Bertrand 2017). Ces résultats ont conduit en 2018 à de deux essais cliniques (TICIMEL et MELANF[alpha]).

II. Les virus oncolytiques

La virothérapie anti-tumorale repose sur l'injection de virus oncolytiques conçus pour se répliquer de manière sélective dans les cellules tumorales et conduire à leur mort immunogène. En 2015, la FDA a approuvé l'utilisation du premier **virus oncolytique T-VEC** (Talimogène laherparepvec) pour le traitement du mélanome métastatique non-résécable. Ce virus oncolytique est un virus génétiquement modifié issu du virus HSV-1 (virus herpes simplex de type 1) qui est délété pour les facteurs ICP34.5 et ICP47 impliqués respectivement dans la pathogénicité et la réplication virale, ce n'est donc pas une souche virale pathogène (Pol 2015 ; Borrie 2018). Ces deux délétions permettent une restriction de la réplication virale aux cellules cancéreuses et rétablissent la capacité de présentation antigénique des cellules infectées (Goldsmith 1998 ; Liu 2003). Il a été également modifié afin d'induire la production de GM-CSF (Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor) permettant le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et ainsi induire une réponse T anti-tumorale (Conry 2018).

L'efficacité thérapeutique de ce virus repose à la fois sur un effet direct, par élimination des cellules tumorales permettant la libération d'antigènes tumoraux et sur un effet indirect par induction d'une réponse immunitaire locale. L'utilisation du T-VEC dans le traitement de mélanomes de stade III et IV non résectables a généré un taux de réponse objective global de 26,4% et une amélioration de la médiane de survie globale à 23,3 mois (Andtbacka 2015). Cette stratégie thérapeutique n'entraîne pas de toxicité élevée contrairement aux autres thérapies citées ci-dessus, mais elle peut induire de la fatigue, des frissons, des nausées, un syndrome grippal et des douleurs aux sites d'injections.

Récemment, Ribas et *al.* lors d'un essai clinique de phase 1 ont associé cette virothérapie à une immunothérapie chez des patients atteints de mélanome avancé et réfractaire à un anti-PD-1. Les patients ont été traités par une injection intratumorale du virus oncolytique (T-VEC) et l'administration systémique de l'anticorps anti-PD-1 (pembrolizumab) (Ribas 2017). Le traitement était généralement bien toléré, la fatigue, la fièvre et les frissons étant les effets indésirables les plus courants. Le taux de réponse objective est de 62%, avec un taux de réponse complète de 33%. Les patients présentent une augmentation intratumorale du nombre de LT CD4⁺ et CD8⁺ exprimant PD-1, une augmentation de l'expression du gène IFN- γ et une expression accrue de la protéine PD-L1 par les cellules tumorales.

III. La vaccination anti-tumorale

La vaccination anti-tumorale repose sur la reconnaissance par les LT de peptides tumoraux, injectés seuls pour une vaccination peptidique ou présentés par des cellules dendritiques (DC) qui sont les CPA les plus efficaces pour initier des réponses lymphocytaires T primaires, puisqu'elles expriment constitutivement des molécules de CMH-I et II et des molécules de co-stimulation lymphocytaire (CD80, CD86, CD40).

Les **vaccins tumoraux** consistent à utiliser un lysat ou des cellules tumorales irradiées comme source antigénique brute. Cette stratégie vaccinale a été étudiée dans un essai clinique où les patients ont reçu un vaccin à base de cellules de mélanome autologues irradiées associé à un adjuvant, le 2,4-dinitrophenyl (DNP). Une augmentation des réponses lymphocytaires T CD8⁺ et CD4⁺ induites par le vaccin a été observée, ainsi qu'une augmentation de la réponse humorale (Lotem 2009).

Bien que l'utilisation de cellules tumorales comme source d'antigènes permet d'induire des réponses immunitaires polyclonales, certaines lésions tumorales peuvent être inaccessibles. Ainsi

l'utilisation de peptides tumoraux (associé à l'IL-2) évite le prélèvement de cellules tumorales. **Un vaccin peptidique** basé sur l'utilisation de la protéine **gp100** a aussi été étudié. La protéine gp100 est reconnue par les CTL et son administration génère une réaction immunitaire adaptative (Aris 2012). Dans une étude clinique de phase 3, l'association thérapeutique d'un vaccin peptidique gp100 combiné à des injections systémiques d'IL-2 a permis une augmentation du taux de réponse clinique associée à un allongement significatif du temps de survie sans rechute par rapport à des injections d'IL-2 seule (2,2 mois versus 1,6 mois) (Schwartzentruber 2011).

Une autre stratégie vaccinale, **la vaccination thérapeutique à base de DC**, a été développée en se basant sur l'observation que les DC chargées avec des antigènes tumoraux pouvaient induire une protection anti-tumorale, voire une régression des lésions tumorales (Chang 2002). La découverte des cytokines GM-CSF et l'IL-4 a permis la différenciation de ces cellules et leur expansion *ex vivo*, à partir de monocytes ou de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ circulantes, ce qui a contribué à leur utilisation en thérapie anticancéreuse par vaccination (Shortman & Liu 2002 ; Palucka & Banchereau 2012). Ces cellules peuvent être chargées en antigènes tumoraux soit directement à l'aide de peptides synthétiques, soit indirectement via la capture *in vivo* ou *ex vivo* de peptides (par exemple vaccin peptidique gp100) ou de cellules tumorales irradiées ou de lysats tumoraux (Palucka & Banchereau 2012).

L'équipe du Dr. Banchereau a démontré lors d'un essai clinique de phase I que la vaccination thérapeutique à base de DC dérivées de cellules CD34⁺ et chargées avec les antigènes MAGE-3, MART-1, tyrosinase et gp100 chez des patients atteints de mélanome de stade IV induisait une réponse immunitaire adaptative médiée par des LT et dirigée contre de multiples antigènes (Banchereau 2001). Cette réaction immunitaire s'est accompagnée d'une stabilisation ou d'une régression chez 10 des 18 patients traités. Cependant certaines difficultés sont retrouvées limitant les effets thérapeutiques d'une vaccination à base de DC. L'existence de plusieurs phénotypes de DC et leur plasticité phénotypique sont utilisés par les tumeurs afin d'orienter leur différenciation vers des DC tolérogènes par la sécrétion de l'IL-10, l'IL-6 ou la PGE2 (Ven 2013). De plus, une maturation incomplète ou inappropriée des DC peut conduire à une tolérance immunitaire (Cintolo 2012).

Pour améliorer la présentation d'antigènes tumoraux par les DC, l'équipe du Dr. Zitvogel a utilisé des exosomes qui sont des vésicules sécrétées par les cellules dendritiques au moment de leur différenciation. Ils expriment les molécules de CMH-I et II, la protéine HSP70 (Heat shock protein 70) et des molécules de co-stimulation. Les exosomes peuvent donc être chargés avec des peptides tumoraux et théoriquement initier des réponses immunitaires. Un essai clinique de phase I a montré la faisabilité et la sécurité de la vaccination à base d'exosomes autologues chargés en peptide MAGE-3 (maintenant appelé MAGE-A3) chez des patients atteints de mélanomes de phase II à IV. Cependant, aucune réaction immunitaire de type LT cytotoxique (CTL) spécifique de MAGE-A3 n'a été détectée dans le sang périphérique, les ganglions lymphatiques ou les lésions après cette vaccination (Escudier 2005).

IV. Les thérapies cellulaires par transfert adoptif de LT

Le transfert adoptif (ACT pour adoptive cell transfer) de LT CD8⁺ spécifiques d'antigènes de tumeurs consiste à réinjecter des LT amplifiés *ex vivo*. L'efficacité thérapeutique attendue repose d'une part sur la spécificité anti-tumorale des LT réinjectés mais également sur leur capacité à migrer, à persister et à s'amplifier *in vivo* (Rohaan 2019). Ces LT peuvent être des TIL isolés à partir de la tumeur ou provenir du sang périphérique des patients. Ces LT peuvent être alors activés par stimulation antigénique ou modifier génétiquement (CAR-T cells, TCR transgénique).

1. Le transfert adoptif de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL)

Dans les années 80, avant l'identification des antigènes tumoraux, l'équipe du Dr. Rosenberg avait mené les premiers essais cliniques d'ACT de TIL, sans analyser leur spécificité ni leur réactivité anti-tumorale. Leurs travaux ont porté sur la stimulation de TIL infiltrant des mélanomes malins par de fortes doses d'IL-2 *ex vivo*. Une fois stimulés, ces TIL ont été réinjectés aux patients et ont permis de développer de grandes perspectives dans le domaine l'immunothérapie. Lors du premier essai clinique, cette thérapie a entraîné environ 30 % de réponses objectives, cependant ces résultats n'ont pas pu être reproduits (Dillman 1991 ; Goedegebure 1995).

L'ACT a principalement été étudiée chez des patients atteints d'un mélanome au stade IV. Un essai clinique de phase II/III, réévalua l'efficacité de l'ACT de TIL à contrôler le développement de la maladie chez les patients atteints d'un mélanome de stade III après résection complète de la tumeur et en fonction du nombre de ganglions envahis. Les patients ont été traités par des TIL autologues associés à l'IL-2 en adjuvant ou par l'IL-2 seule. La médiane de survie a augmenté avec l'association thérapeutique TIL + IL-2 (49,9 mois) en comparaison avec l'IL-2 (19,96 mois) (Labarrière 2002 ; Dréno 2002). L'analyse rétrospective de la spécificité des TIL injectés a permis d'associer les réponses cliniques à la présence de TIL spécifiques des Ag de mélanome, Melan-A et MELOE-1 (Benlalam 2007 ; Godet 2008).

Ces résultats démontrent une inefficacité du transfert adoptif de TIL probablement lié en partie à un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, en particulier à la présence de LT_{reg} inhibant les TIL injectés, même si leur activité anti-tumorale a été vérifiée *ex vivo* (Disis 2010). Le groupe du Dr Rosenberg a étudié l'apport d'une lymphodéplétion (par chimiothérapie et/ou radiothérapie) avant l'ACT afin d'améliorer l'efficacité du traitement et éliminer les LT_{reg}. Ils ont ainsi obtenu 50 % de réponses objectives et durables (Dudley 2002, 2008 ; Goff 2016).

Un des problèmes majeurs du transfert adoptif de TIL est la nécessité de disposer d'un grand nombre de cellules dont la génération est difficile et prend du temps, puisqu'ils proviennent de fragments de tumeur. Cela nécessite également une infiltration des tumeurs par les LT, or les

tumeurs solides comme le mélanome forment des îlots de cellules tumorales protégées par des fibres de la matrice extracellulaire qui empêchent l'accès des LT (Salmon & Donnadieu 2012). C'est pourquoi l'utilisation des LT du sang périphérique a été développée comme alternative.

2. Le transfert adoptif de LT issus du sang périphérique

Les LT spécifiques d'antigènes tumoraux administrés chez le patient peuvent être issus de son sang périphérique puis stimulés *ex vivo* ou modifiés génétiquement.

2.1. Amplification par stimulation antigénique *ex vivo*

Mackensen *et al.* ont analysé les effets thérapeutiques de l'injection de LT enrichis en cellules spécifiques de l'antigène **Melan-A/MART1**. Ce transfert n'a pas montré d'effet thérapeutique chez les patients atteints de mélanome métastatique, puisqu'une seule réponse complète a été obtenue sur les 11 patients traités (Mackensen 2006).

Au début des années 2000, des essais d'ACT avec des clones T spécifiques de gp100, chez des patients développant un mélanome de stade IV après lymphodéplétion, ont été conduits. Malheureusement aucun bénéfice thérapeutique n'a été noté (Dudley 2001). L'hypothèse émise est que l'activation des LT par stimulation peptidique en présence de fortes doses d'IL-2 provoquerait un grand nombre de divisions entraînant ainsi leur sénescence avant leur réinjection chez le patient.

Vignard *et al.* étudièrent dans une étude clinique I/II, menées chez 16 patient atteints d'un mélanome de stade IV le traitement par ACT de CTL anti-Melan-A/MART1 associé à une injection de IL-2 et IFN α . Six patients ont présenté une régression des métastases ou une stabilisation de la maladie, et un patient a présenté une réponse complète. Cet ACT est associé à l'initiation d'une réponse anti-tumorale qui entraîne la génération d'un répertoire de CTL spécifique de Melan-A (Vignard 2005).

Plus récemment, des techniques de sélection par tri des LT spécifiques d'antigènes tumoraux à partir de prélèvements de sang périphérique des patients ont été conçues. La sélection est basée sur l'expression de marqueurs membranaires d'activation (PD-1, CD137, récepteur à IL-2) ou sur les spécificités antigéniques de LT. La sélection a recouru à l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces marqueurs ou bien de tétramères CMH-peptides couplés à des billes magnétiques. L'équipe du Dr. Labarrière a ainsi débuté l'essai clinique MELSORT, essai de phase I/II analysant l'effet thérapeutique de l'ACT de LT CD8⁺ autologues spécifiques des antigènes de mélanome Melan-A/MART1 et MELOE-1 chez des patients atteints de mélanome métastatique. Après stimulation des LT périphériques avec les peptides Melan-A/MART1 ou MELOE-1, un tri magnétique des LT CD8⁺ spécifiques est effectué à l'aide de

tétramères CMH-I-peptides. Les LT spécifiques sélectionnés sont ensuite amplifiés *in vitro* pour obtenir un nombre suffisant de cellules pour l'ACT (source : <https://clinicaltrials.gov>, NCT02424916).

2.2. Les modifications génétiques des lymphocytes T

La limite aux stratégies d'ACT évoquées ci-dessus et la nécessité que les patients aient des LT spécifiques de la tumeur pré-existants qui puissent être amplifiés *ex vivo*. Pour pallier à cette limite, l'idée de modifier génétiquement les LT a émergé. Deux approches de **modifications génétiques des LT** ont ainsi été développées :

- **les TCR transgéniques ou haTcRT (*high affinity TcR-engineered T-cell*)**

Dans cette approche un transfert des chaînes $\alpha\beta$ du TCR présentant une forte affinité pour l'antigène tumoral est effectué dans des LT CD8⁺. Ce transfert génère des cellules qui continuent d'exprimer leur TCR endogène. Lors des premiers essais cliniques, des patients atteints de mélanome métastatique ont été traités avec des lymphocytes T modifiés avec un TCR transgénique spécifique de Melan-A/MART-1. Deux des 17 patients traités ont montré une réponse comparable à ceux obtenus avec des TIL (Morgan 2006). De plus, lors d'un essai ciblant MAGE-A3, une neurotoxicité est apparue suite à une cross-réactivité entre MAGE-A3 et MAGE-A12 qui est exprimé sur les neurones mais également une toxicité cardiaque (Morgan 2013 ; Linette 2013).

- **les CAR-T cells (*chimeric antigen receptor engineered T cells*)**

Ces LT du patient expriment un récepteur particulier constitué des parties variables d'un anticorps spécifique d'un antigène tumoral, fusionné à une région transmembranaire et à une ou plusieurs unités de transduction du signal permettant l'activation des LT. L'activation des CAR T cells n'implique donc pas les molécules du CMH. Actuellement, dans le traitement du mélanome, plusieurs essais cliniques de CAR-T cells ciblant cMET, CD70, GD2, VEGFR2 sont en cours d'évaluation ou de recrutement (Simon & Uslu 2018 ; Li 2019).

Chapitre 4 : Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires

I. Généralités

Les réponses immunitaires T sont contrôlées par un équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs. Ces points de contrôle (appelés Immune Checkpoint, IC) limitent la durée et l'intensité de la réaction immune T pour maintenir la tolérance au soi et prévenir l'auto-réactivité (Chen & Flies 2013). Le signal de co-inhibition est déclenché par la reconnaissance du CMH-peptide par le TCR, ce qui induit l'expression de co-récepteurs inhibiteurs tels que **CTLA-4** (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ou CD152) et **PD-1** (Programmed cell death 1). Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les LT sont inhibés par liaison CTLA-4/B7 (CD80 et CD86) (signal inhibiteur précoce). Une régulation supplémentaire de l'activité des LT est également exercée dans les tissus périphériques (lors de la phase effectrice des LT, signal inhibiteur tardif) par des molécules inhibitrices telle que **PD-1**, qui se lie à son ligand PD-L1. Cependant pour échapper à l'immunité anti-tumorale, les cellules tumorales sont capables de détourner ces points de contrôles en exprimant les ligands de ces co-récepteurs inhibiteurs (**figure 15**).

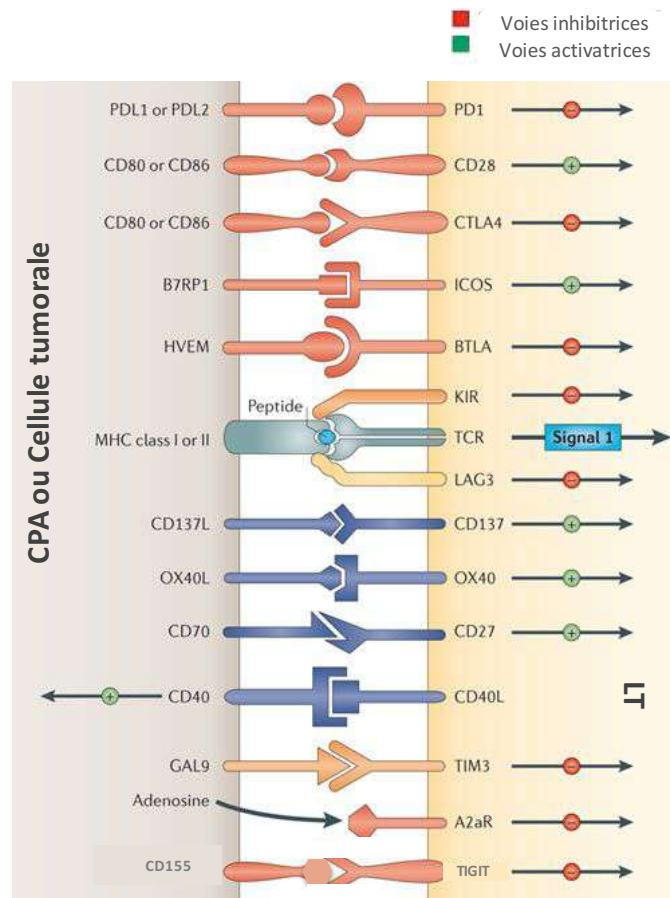


Figure 15 : Les mécanismes d'inhibition des LT CD8⁺.

Les voies inhibitrices des fonctions lymphocytaires sont indiquées en rouge (PD-1-PDL1/2, CTLA-4-CD80/86, TIM3-galectine9, BTLA-HVEM, LAG3/TCR/KIR-CMH I/II, A2aR-Adénosine, TIGIT-CD155). Les voies activatrices sont indiquées en vert (OX40-OX40L, CD40L-CD40, ICOS-B7RP1, CD27-CD70, CD137-CD137L) (adapté de Marin-Acevedo 2018 et Pardoll 2012).

Cette découverte fondamentale a été à la genèse du développement des thérapies ciblant les points de contrôle immunitaire (ou anti-immune checkpoint inhibitors (ICI)). Les ICI sont basés sur l'utilisation d'AcM dirigés contre les co-récepteurs inhibiteurs CTLA-4, PD-1 ou le ligand PD-L1, bloquant la liaison ligand/récepteur, CTLA-4/B7 et PD-1/PD-L1, afin de lever l'inhibition et de restaurer les fonctions effectrices des CTL.

II. Immunothérapie anti-CTLA-4

Le co-récepteur CTLA-4 peut inhiber au stade précoce l'activation des LT qui l'expriment en se liant aux ligands B7 (CD80 et CD86). L'engagement CTLA-4/B7 génère une interaction entre la partie intracytoplasmique de CTLA-4 et la tyrosine phosphatase SHP-2 (Marengere 1996) et la sérine/thréonine phosphatase PP2A (Chuang 2000). Ces phosphatases déphosphorylent AKT, inhibant ainsi la prolifération et la production d'IL-2 suite à la signalisation activatrice du TCR (Walunas 1996). CTLA-4 peut augmenter la mobilité des LT provoquant une rupture de la synapse immunologique formée par la liaison TCR/CMH-peptide nécessaire à une bonne activation des LT (Schneider 2006).

CTLA-4 fut la première cible appartenant à la famille des molécules de co-signalisation qui soit entrée dans l'ère de l'immunothérapie et qui a permis une avancée thérapeutique majeure dans le traitement du mélanome métastatique chez l'homme. Deux AcM ciblant CTLA-4 ont été développés en clinique : l'**ipilimumab** et le **tremelimumab** (figure 16).

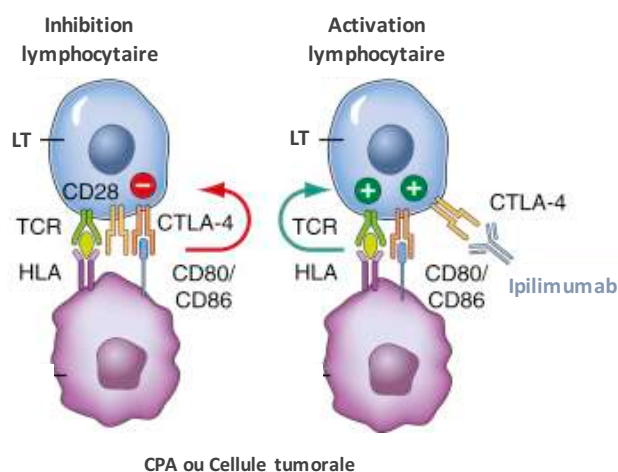


Figure 16 : Ciblage de la voie CTLA-4 par l'ipilimumab.

Une signalisation inhibitrice des LT par CTLA-4 se produit suite à l'engagement par ses ligands CD80/CD86 (ligands B7) sur CTLA-4. L'ipilimumab, AcM anti-CTLA-4, bloque l'interaction CTLA-4 et CD80/CD86 et donc le signal inhibiteur restaurant ainsi la fonction effectrice des LT (d'après Bell 2018).

L'**ipilimumab** est une IgG1 humanisée anti-CTLA-4 et est le premier ICI autorisé par la FDA en 2011 pour le traitement du mélanome métastatique. Il a été utilisé seul ou en combinaison avec un vaccin peptidique gp100 en première ligne de traitement du mélanome métastatique. Cette étude de phase III a montré que l'ipilimumab avait une efficacité clinique supérieure à la vaccination, en améliorant la survie globale des patients qui était de 10 mois pour l'ipilimumab contre 6,4 mois pour la vaccination (**figure 17**). D'autre part, l'ipilimumab associé à la vaccination gp100 n'était pas plus efficace que l'ipilimumab seul, ce qui démontrait qu'il n'y avait pas de bénéfice à associer ces 2 thérapies (Hodi 2010).

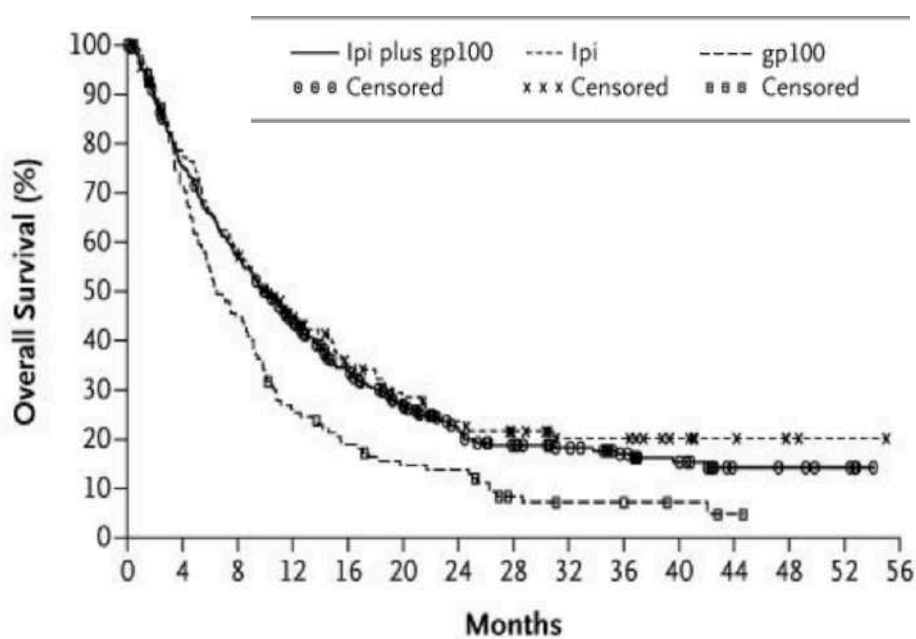


Figure 17 : Comparaison de la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique traité par l'ipilimumab, la vaccination gp100 ou leur association. (d'après Hodi 2010)

Ces résultats prometteurs ont été suivis d'une étude de phase III comparant l'association thérapeutique ipilimumab et dacarbazine, (traitement de référence des mélanomes de stade IV) avec la dacarbazine seule. Pour la première fois, cette étude a démontré que l'association chimiothérapie et immunothérapie induisait une augmentation de la survie globale et du taux de réponse pour des patients atteints de mélanome métastatique par rapport à la chimiothérapie seule (Robert 2011) (**figure 18**). Néanmoins des effets secondaires de grade 3 ou 4 ont été observés chez 56,3 % des malades recevant l'association thérapeutique contre 25,7 % dans le groupe dacarbazine mais il n'y a pas eu de perforation digestive ni d'effet secondaire fatal.

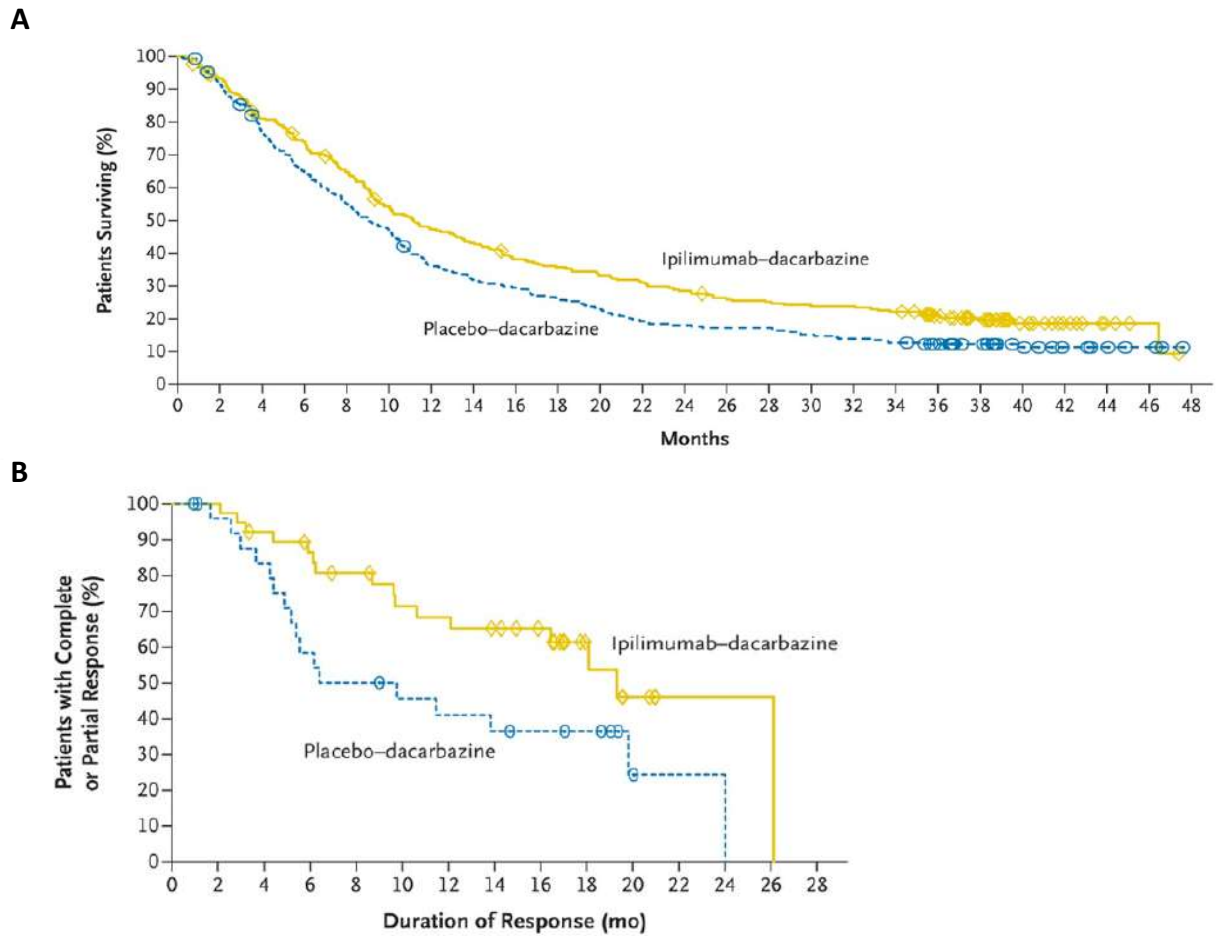


Figure 18 : Survie et taux de réponse de patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par ipilimumab et/ou dacarbazine.

A. La survie globale a été significativement augmentée dans le groupe recevant ipilimumab et dacarbazine (médiane 11,2 mois vs 9,1 mois) avec des taux de survie à 1 an de 47,3 % et à 3 ans de 20,8 % vs 12,2 %. **B.** Taux réponse complète ou partielle, la durée médiane est de 19,3 mois sous ipilimumab-dacarbazine contre 8,1 mois sous dacarbazine seule (d'après Robert 2011).

Suite aux résultats encourageants des études menées sur les virus oncolytiques, des associations ont également été entreprises, conduisant à des stratégies thérapeutiques combinatoires de T-VEC et l'ipilimumab. Ces combinaisons semblent être tolérées et efficaces avec un taux de réponse globale objective de 56% dont 33% de réponse complète (Nakamura 2016).

Cependant, l'utilisation d'anti-CTLA-4 provoque chez 60% des patients des effets secondaires de grade 3 et 4. En effet, la levée des voies d'inhibitions du système immunitaire favorise la survenue de manifestations apparentées à des maladies auto-immunes. Elles peuvent toucher tous les organes notamment la peau (vitiligo, exacerbation de psoriasis), les glandes endocrines (insuffisance hypophysaire, thyroïdite), les reins, les articulations, le foie et l'intestin (Champiat 2016) avec une grande variabilité interindividuelle et chronologique. De plus la survenue d'entérocolites associés à l'ipilimumab n'est pas surprenante puisque des mutations

germinales du gène codant pour CTLA-4 sont à l'origine de maladies inflammatoires se développant majoritairement au niveau de l'intestin (Kuehn 2014 ; Zeissig 2015). Lors de la survenue d'effets indésirables de grades 3 et 4, l'introduction d'un traitement immunosuppresseur reposant principalement sur une corticothérapie générale à hautes doses permet un contrôle de la toxicité.

Le deuxième anticorps anti-CTLA-4, le **tremelimumab** a été testé cliniquement dans des phases I et II, chez des patients atteints de mélanomes avancés (Ribas 2013). Contrairement à l'ipilimumab, il a apporté très peu de bénéfice clinique, générant un taux de réponse objectif d'environ 10% (Camacho 2009 ; Kirkwood 2010).

III. Immunothérapie anti-PD-1

1. La découverte du co-récepteur inhibiteur PD-1

PD-1 (CD279) un est autre co-récepteur inhibiteur qui régule l'activation du LT activé dans les tissus périphériques et les sites tumoraux. Lorsqu'il est engagé par ses ligands **PD-L1** (Programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274) ou **PD-L2** (Programmed death-ligand 2, B7-DC, CD273), il bloque les fonctions lymphocytaires T en inhibant la signalisation activatrice en aval du TCR (Marin-Acevedo 2018 ; Pardoll 2012).

PD-1 a été identifié en 1992 par l'équipe du Pr. Honjo comme étant une molécule associée à l'apoptose. Leur étude menée pour identifier le ou les gènes importants pour l'apoptose d'hybridomes T au repos ou après activation via le TCR, a révélé que PD-1 était transcrit par tous les clones activés, il fut donc nommé « Programmed Death-1 » pour son supposé rôle pro-apoptotique (Ishida 1992). En 1999, ce même groupe a démontré le rôle de PD-1 comme régulateur négatif des réponses immunitaires permettant de maintenir une tolérance immunitaire périphérique. Son rôle a été démontré chez les souris déficientes pour *PDCD-1*, le gène codant pour PD-1, développent spontanément des glomérulonéphrites, des cardiopathies et des pathologies auto-immunes (Nishimura 1999, 2001).

2. Le profil et régulation de l'expression de PD-1

PD-1 est exprimé à la surface d'un grand nombre de cellules immunitaires : LT CD4⁺ et CD8⁺ activés, LT_{reg}, LB, monocytes, natural killer (NK), et certains sous-types de DC (Agata 1996). Les LT CD8⁺ au repos n'expriment pas ou peu PD-1 mais il est exprimé transitoirement à la membrane cellulaire sous forme monomérique dans les 6h après l'activation des LT via leur TCR. Son

expression diminue dès que la cible antigénique des LT est éliminée (Chikuma 2009) et dépend de l'intensité du signal d'activation perçu par les LT via leur TCR ; plus fort est le signal, plus forte sera son expression, permettant ainsi de contrebalancer l'activation T et de contrôler la réponse immunitaire (Barber 2006, Oestreich 2008). Chez la souris, cette expression transitoire est contrôlée par l'activation et la translocation transitoire du facteur de transcription NFATc1 qui est induit par le signal TCR. NFATc1 se fixe sur le promoteur de *PDCD-1* et active sa transcription corrélant ainsi la force du signal TCR et l'expression de PD-1 (Oestreich 2008).

L'induction de l'expression de PD-1 peut être aussi renforcée par différentes cytokines comme l'IFN α (Terawaki 2011), l'IL-6 et IL-12 (Austin 2014). Par ailleurs le pré-traitement des LT CD8⁺ avec l'IL-2, IL-7, IL-15 et IL-21 peut favoriser son expression, sans que les mécanismes d'action soient décrits (Kinter 2008).

Bien que PD-1 inhibe l'activation des LT, son expression est le signe d'une activation lymphocytaire. En effet, les travaux menés par Gros et *al.* chez des patients atteints de mélanome ont montré que l'expression de PD-1 permettait d'identifier parmi les TIL spécifiques d'antigènes tumoraux ayant un TCR de forte affinité (Gros 2014 ; Inozume 2010).

Toutefois, si les LT sont activés de façon chronique par la présence constante de leur complexe CMH-peptide spécifique, comme lors d'une infection virale ou d'un cancer, ils peuvent exprimer constitutivement de forts niveaux de PD-1. Cette forte expression associée à celle d'autres co-récepteurs inhibiteurs tels que TIM-3, BTLA ou TGIT, signe alors une perte des fonctions et l'épuisement des LT (Youngblood 2011 ; Chapon 2011 ; Ahmadzadeh 2009, Fourcade 2010 ; Chauvin 2015). L'expression constitutive de PD-1 pourrait donc être un processus d'adaptation des LT à une stimulation chronique, permettant d'enclencher un mécanisme de rétrocontrôle pour éviter les réactions auto-immunes (Simon & Labarriere 2018).

3. La voie de signalisation inhibitrice induite par l'interaction de PD-1 avec ses ligands

La liaison entre PD-1 et ses ligands induit la phosphorylation de PD-1 sur deux tyrosines présentes dans ses domaines ITIM (Y223) et ITSM (Y248) par les tyrosines kinases LCK et Sck, qui permettent ensuite le recrutement des phosphatases SHP-2 puis SHP-1 (Src Homology region 2 domain-containing Phosphatases) (Sheppard 2004). Une étude a démontré que le domaine ITSM semble être déterminant dans la signalisation intracellulaire de PD-1 puisqu'une mutation de la tyrosine de ce motif induit la perte totale de la fonction biologique de PD-1 (Chemnitz 2004 ; Sharpe 2017).

Les mécanismes d'inhibition des fonctions lymphocytaires T induites par la signalisation PD-1 reposent essentiellement sur le blocage des signaux proximaux d'activation par le TCR. Le résultat fonctionnel de ces effets est une diminution d'un grand nombre de fonctions lymphocytaires T notamment la production de cytokines (IFN γ , IL-2 ou TNF α) par les LT CD8⁺ mais également la prolifération, la survie et la différenciation en CTL (Sheppard 2004 ; Sharpe 2017) (**figure 19**).

➤ La reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR provoque l'activation par phosphorylation de la tyrosine kinase ZAP70 qui initie les cascades de signalisation PI3K-AKT, RAS/MAPK. L'engagement de PD-1 par son ligand provoque le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui déphosphorylent ZAP70 et donc inhibent la prolifération et la survie cellulaire. (Sheppard 2004 ; Chemnitz 2004 ; Sharpe 2017)

➤ Le signal de co-stimulation de CD28 active la voie impliquant la protéine kinase PKC θ et NF- κ B, conduisant à la production d'IL-2 et donc à la prolifération des LT. La signalisation PD-1 atténue la phosphorylation activatrice de PKC θ par les phosphatases SHP1 et SHP2 (Coudronniere 2000 ; Sheppard 2004).

➤ La voie PI3K/AKT/mTOR en dehors de ses effets sur la prolifération et la survie, est également impliquée dans la régulation du métabolisme glycolytique des LT (Frauwirth 2002). La glycolyse aérobie et l'oxydation/dégradation des acides gras qui sont nécessaires à l'acquisition et au maintien des fonctions effectrices des LT sont inhibées par PD-1 via l'inhibition de mTOR (Tkachev 2015 ; Patsoukis 2015).

➤ La signalisation via PD-1 inhibe directement la voie des MAPK, voie majeure dans le contrôle du cycle cellulaire, par déphosphorylation de la PLC γ par SHP-2 qui inhibe l'activation de la protéine CDK2 bloquant ainsi le cycle cellulaire (Bardhan 2016).

➤ L'interaction PD-1/PD-L1 peut également induire la surexpression de différents gènes impliqués dans l'épuisement des LT. En effet l'étude du profil d'expression génique de LT CD8⁺ spécifiques du HIV a permis de définir un groupe de gènes associés à la signalisation PD-1 comprenant le facteur de transcription BATF (Basic leucine zipper transcription factor ATF-like). L'expression de BATF est multipliée par 2 après l'engagement de PD-1 par son ligand, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion d'IL-2 et donc de la prolifération des LT. Néanmoins, cette étude n'a pas identifié le mécanisme direct ou indirect par lequel PD-1 entraîne une surexpression de BATF (Quigley 2010).

➤ Enfin, tout comme le co-récepteur CTLA-4, l'activation de PD-1 par son ligand augmente la mobilité des LT CD8⁺ diminuant ainsi le temps d'interaction nécessaire pour former une synapse

immunologique stable et donc pour une activation optimale des LT. Ce mécanisme permet un maintien de la tolérance périphérique (Fife 2009).

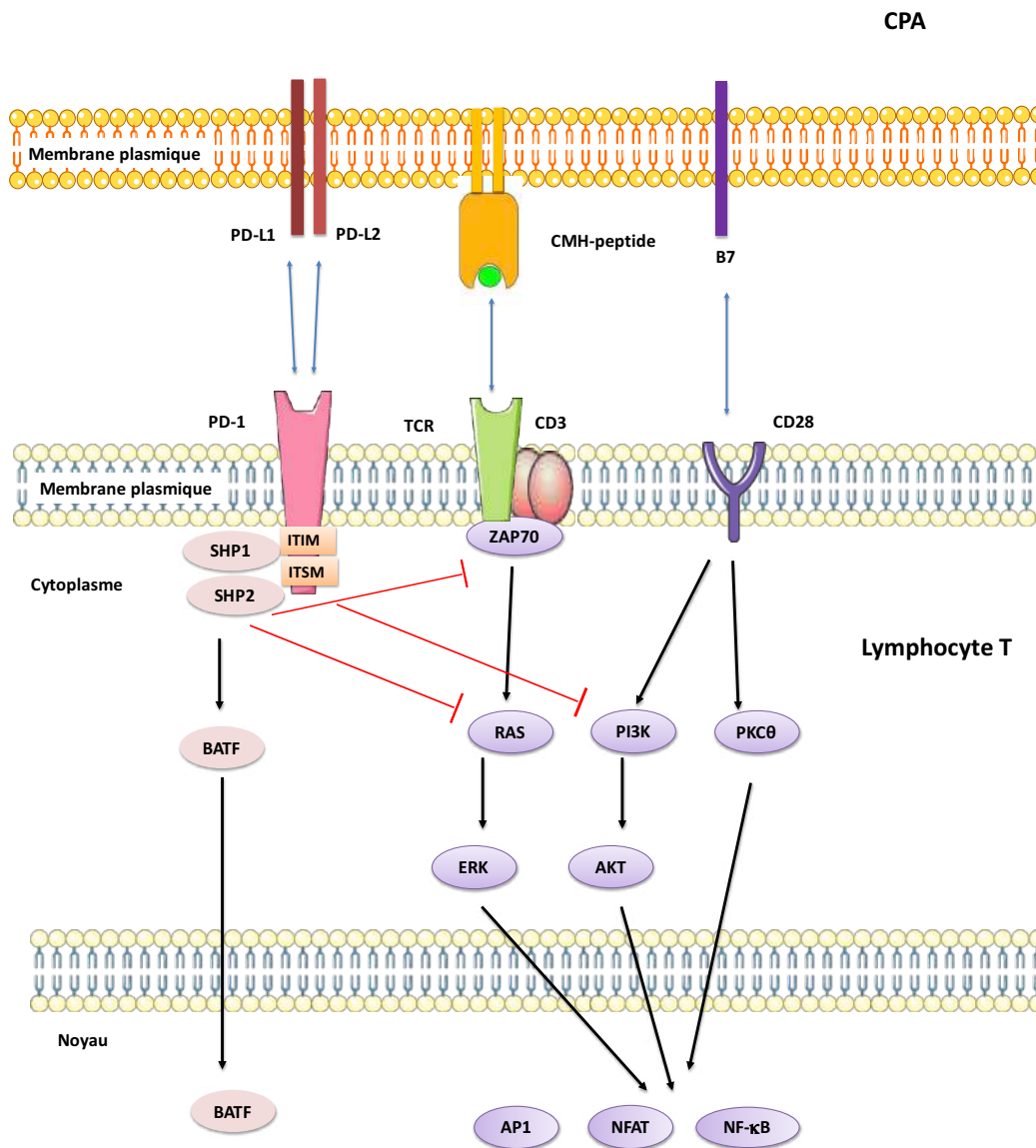


Figure 19 : Voie de signalisation induite par l'interaction PD-1 et ses ligands. (adapté de Sharpe 2018)

4. Les ligands du co-récepteur inhibiteur PD-1 : PD-L1 et PD-L2

À l'heure actuelle, deux ligands du récepteur inhibiteur PD-1 ont été découverts, PD-L1 (Programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274) (Freeman 2000) et PD-L2 (Programmed death-ligand 2, B7-DC, CD273) (Latchman 2001). Ces deux glycoprotéines de surface appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. PD-L1 et PD-L2 sont codés respectivement par les gènes

CD274 et *CD275*. Leur structure est très proche bien qu'elles ne partagent que 34% d'homologie de séquence (Lázár-Molnár 2008). Néanmoins, leur profil d'expression est très différent. En effet PD-L2 est exprimé de façon restreinte par les CPA comme les DC et les macrophages (Saunders 2005). PD-L1 au contraire est exprimé par de nombreuses cellules du système immunitaire telles que les LT CD4⁺ et CD8⁺, les DC, les LB, les LT_{reg}, les macrophages et les MDSC (Sun 2018). Il est également exprimé au niveau de sites privilégiés immunitairement comme la barrière foëto-maternelle et dans des cancers dont le mélanome, le cancer du poumon non à petites cellules et le cancer du sein (Meggyes 2019 ; Sunshine 2017 ; Pawelczyk 2019 ; Mittendorf 2014).

Il est important de souligner que seules les souris déficientes pour PD-L1 et non pour PD-L2 développent des phénotypes auto-immuns équivalents à ceux développés par les souris déficientes pour PD-1 (Lucas 2008 ; Carter 2007). Au vu de ces résultats et de la distribution de l'expression de ces deux protéines, la liaison PD-1/PD-L1 permettrait donc de maintenir la tolérance périphérique et de réguler les réponses inflammatoires dans les différents organes, tandis que PD-L2 aurait un rôle plus restreint lors de la primo-activation des LT CD8⁺ naïfs par les CPA (Keir 2006).

Le rôle de PD-L1 ne se limite pas à l'inhibition des LT effecteurs mais permet également, via les CPA exprimant cette protéine, une induction de LT_{reg} périphériques (pTreg) et un maintien de leurs fonctions suppressives. En effet, il a été montré qu'en absence de TGF- β exogène, essentiel pour la conversion en LT_{reg}, PD-L1 peut réduire la signalisation de la voie AKT-mTOR dans les LT naïfs et les convertir en LT_{reg} (Francisco 2009)

5. Régulation de l'expression de PD-L1

En fonction du type cellulaire, l'expression de PD-L1 peut être constitutive, c'est le cas pour les LT, les LB, les DC, les macrophages et les monocytes (Keir 2008 ; Yamazaki 2002). L'expression de PD-L1 peut être aussi induite en réponse à des stimuli pro-inflammatoires et régulée de manière complexe (Barach 2011 ; Wu 2019) (**figure 20**).

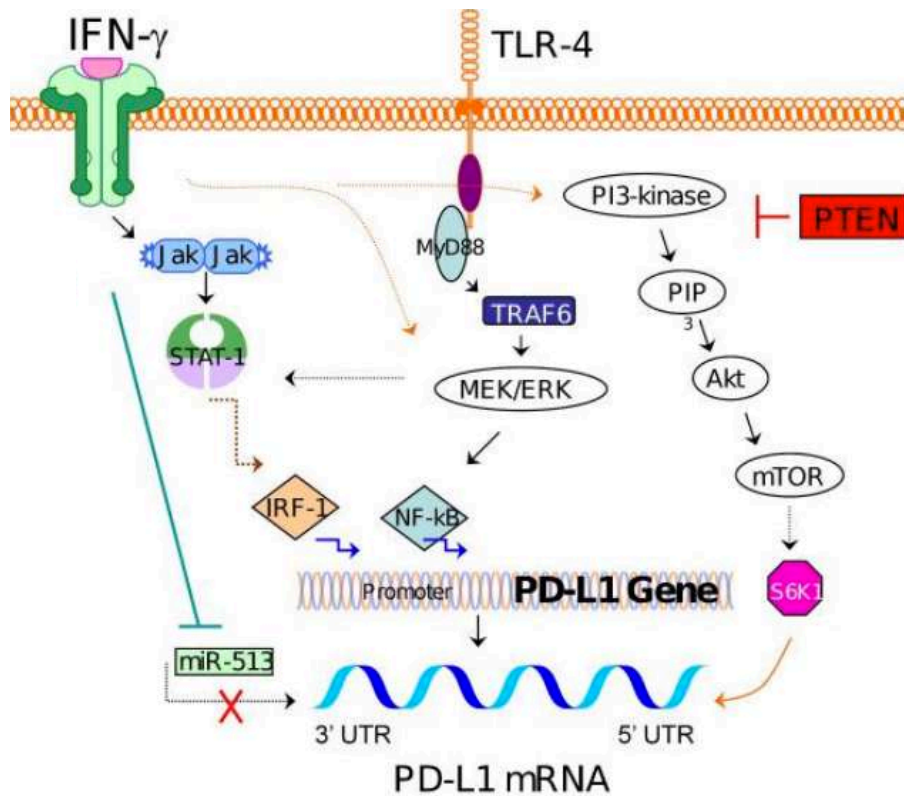


Figure 20 : Mécanismes de régulation de l'expression de PD-L1. (d'après Barach 2011)

5.1. Régulation par les IFN

La fixation de l'IFN- γ à son récepteur IFNAR1/R2, entraîne l'activation mutuelle des janus kinases JAK1 et JAK2 qui sont associées aux domaines cytoplasmiques du récepteur. Elles phosphorylent le facteur de transcription STAT1, permettant sa dimérisation. Le dimère phospho-STAT1 migre alors vers le noyau et promeut la transcription d'une série de gènes de facteurs de transcription, appelés facteurs de réponse à l'interféron (IRF) (Platanias 2005). Parmi ces facteurs, IRF1 (Interferon Regulatory Factor) se fixe sur le promoteur de *CD274*. Il a été démontré que l'IRF1 après fixation au promoteur joue un rôle central dans l'induction de PD-L1 induite par l'IFN- γ (Lee 2006).

Dans le mélanome, plusieurs équipes ont démontré que l'IFN γ produit par les TIL était le principal inducteur de l'expression de PD-L1 sur les cellules de mélanome via la voie JAK1/JAK2-STAT1-IRF1 (**figure 21**), tandis qu'en absence de microenvironnement pro-inflammatoire, les cellules de mélanome n'expriment pas PD-L1 (Spranger 2013 ; Garcia-Diaz 2017).

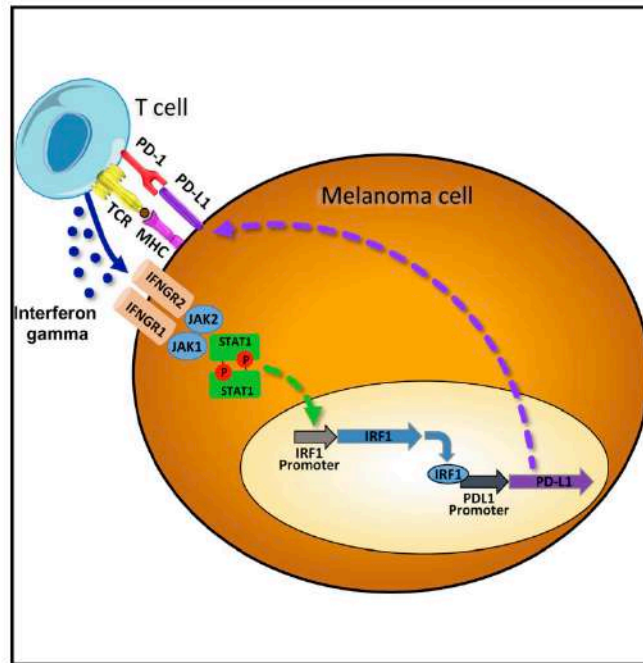


Figure 21 : Expression de PD-L1 par les cellules de mélanome induite par l'IFN γ .
(d'après Garcia-Diaz 2017)

Taube et collaborateurs ont montré que chez des patients atteints de mélanome il existait une co-localisation entre les cellules tumorales exprimant PD-L1, les TIL CD8⁺ et la présence d'IFN γ (Taube 2012). Ce mécanisme de résistance a été nommé « résistance immunitaire adaptative ». Lors de cette étude ils ont remarqué également une hétérogénéité de l'expression de PD-L1 au sein de la même tumeur associée à la présence d'un infiltrat TIL CD8⁺. Une classification des tumeurs en 4 groupes a donc été proposée en fonction de la présence ou de l'absence de TIL et l'expression de PD-L1 (Taube 2012) (**tableau 5**).

Tableau 5 : Classification des tumeurs. (adapté de Taube 2012)

Groupe	Infiltrat LT CD8 ⁺	Expression PD-L1 par cellule tumorale	% de cas de mélanomes
I	Fort infiltrat	Forte expression et induite	38%
II	Absence d'infiltrat	Pas d'expression	41%
III	Pas d'infiltrat	Expression constitutive PD-L1 par altération génétique	1%
IV	Infiltrat	Pas d'expression (perte de réponse à l'IFN γ ,...)	20%

Outre l'IFN γ , les interférons de type I, IFN α et IFN β , peuvent également se lier au récepteur IFNAR1/R2 pour induire l'expression de PD-L1 dans des cellules de mélanome (**figure 22**), des

cellules endothéliales, des monocytes et des DC en culture (Eppihimer 2002 ; Garcia-Diaz 2017 ; Schreiner 2004).

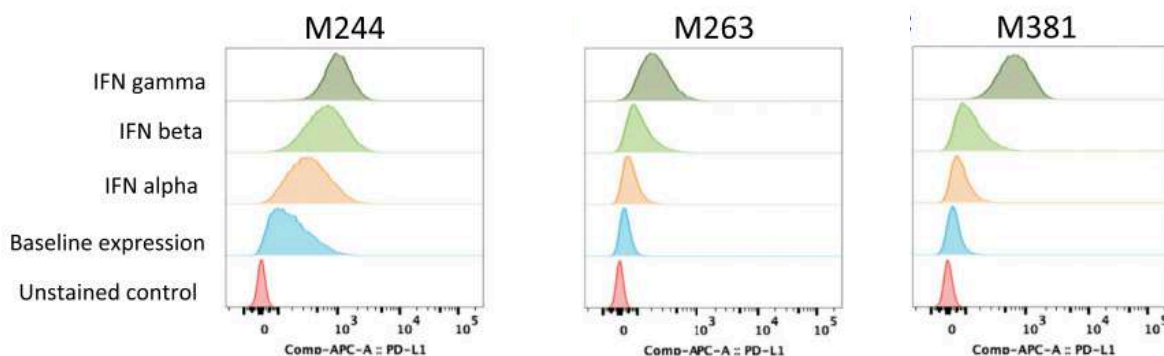


Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de PD-L1 dans des lignées cellulaires de mélanome humain après traitement à l'IFN. (d'après de Garcia-Diaz 2017)

5.2. Régulation par TLR4

TLR4 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé par les macrophages et les DC. C'est un récepteur au LPS qui peut également se lier à des DAMP (Damaged Associated Molecular Pattern) tels que HSP60/70 et HMGB1 (High-mobility Group Protein B1) libérés lors de la mort immunogène des cellules tumorales (Gelderblom 2015).

La signalisation de TLR4 peut induire l'activation du complexe protéique MYD88/TRAF6 puis MEK et ERK qui conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B et à l'activation de la transcription de PD-L1 (**figure 20**) (Liu 2007). Dans les cellules de mélanome ou de myélome multiple, l'inhibition des protéines adaptatrices MyD88 et TRAF6 bloque non seulement l'expression de PD-L1 induite par les ligands du TLR mais également celle induite par l'IFN γ ce qui suggère des interactions entre les voies IFN et TLR4 (Liu 2007 ; Gowrishankar 2015).

5.3. Régulation par la voie PI3K/AKT

D'autre part, la signalisation par la voie PI3K/AKT peut induire l'expression de PD-L1 en activant la protéine kinase S6K1 (S6 kinase 1). Cette protéine ribosomale S6K1 permet le recrutement du transcrit *CD274* au sein des polyribosomes et donc l'augmentation de sa traduction (Barach 2011 ; Atefi 2014).

La protéine PTEN peut quant à elle réprimer l'expression de PD-L1 en inhibant l'action enzymatique de la PI3K (**figure 20**). Des mutations inhibitrices du gène codant pour PTEN ont été

décrites, favorisant ainsi la traduction du transcrit *CD274* et donc l'expression constitutive de PD-L1 sur les cellules tumorales. Ce mécanisme de régulation intrinsèque permet aux cellules tumorales d'échapper aux réponses immunitaires (Song 2013).

5.4. Régulation par des microARN

À l'inverse, l'expression de PD-L1 peut être inhibée post-transcription par certains **microARN** (miARN). Les miARN-17-5p, -34a, -200 et -513 se lient à la partie 3'UTR du transcrit *CD274* et inhibe sa traduction (Gong 2009 ; Wang 2017). Il a aussi été démontré qu'une baisse du niveau du miARN-513 suite à un traitement par IFN γ induisait la traduction de PD-L1 (Gong 2009). Il est à noter que la liste des miARN intervenant dans l'expression de PD-L1 ne cesse de s'allonger (Wang 2017).

5.5. Régulation par l'hypoxie

L'**hypoxie** est une caractéristique importante de la majorité des tumeurs solides dont le mélanome. Les cellules s'adaptent à la baisse de l'apport en oxygène en activant les facteurs HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) et HIF-2 α . En cas d'hypoxie, les facteurs HIF α activent une série de protéines qui engendrent l'expression de nombreux gènes permettant aux cellules de survivre, de maintenir certaines fonctions et de résister à leur destruction par des cellules du système immunitaire, c'est le cas du gène *CD274* (Barsoum 2014 ; Noman 2014). Une étude a démontré dans des mélanomes humains et murins, que l'expression de PD-L1 était induite par HIF-1 α en condition d'hypoxie (Noman 2014)

6. Essais cliniques

6.1. Les anticorps anti-PD-1

Un des mécanismes majeur d'échappement dans le mélanome est l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Il a été démontré que son expression est corrélée à un mauvais pronostic pour les patients, en particulier dans le mélanome (Iwai 2002 ; Dong 2002 ; Hino 2010). L'infiltrat immunitaire anti-tumoral joue aussi un rôle important dans la balance entre élimination et progression tumorale. L'étude de cet infiltrat dans les mélanomes qui expriment PD-L1 a révélé la présence de LT CD8⁺ exprimant le récepteur co-inhibiteur PD-1 (Taube 2012, 2014 ; Tumei 2014).

Les études précliniques ont ouvert la voie au développement de deux AcM humanisés anti-PD-1, d'isotype IgG4 et de haute affinité pour PD-1 pour le traitement du mélanome : le nivolumab

et le pembrolizumab. A l'heure actuelle, ces deux AcM sont utilisés en première ligne de traitement du mélanome métastatique III et IV non résecable aux USA et en Europe.

Le nivolumab a été le premier AcM anti-PD-1 à être approuvé par la FDA en 2014 et à recevoir une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) Européenne en 2015 pour le traitement du mélanome avancé (non résecable ou métastatique). Il est aussi prescrit en seconde ligne de traitement pour les patients réfractaires à l'ipilimumab (Raedler 2015 ; Gomes 2018). Différents essais cliniques de phase I et II, ont démontré des taux de réponse objective allant de 34% à 44% avec des taux de survie à long terme sans équivalents jusqu'alors (62% à 1 an, 43% à 2 ans et 41 % à 3 ans) (Topalian 2012, 2014).

Un essai clinique de phase III chez des patients atteints de mélanome métastatique sans mutation B-RAF^{V600E} a été réalisé afin de comparer l'efficacité thérapeutique du nivolumab et de la dacarbazine. Dans cet essai, la médiane de survie sans rechute était de 5,1 mois pour le groupe nivolumab contre 2,2 mois pour le groupe dacarbazine. Des effets secondaires de grade 3 ou 4 ont été observés chez 11,7% des patients traités avec le nivolumab contre 17,6% pour ceux traités avec la dacarbazine (Robert 2015).

Comme évoqué précédemment, PD-1 et CTLA-4 régulent les réponses immunitaires T mais dans des fenêtres temporelles distinctes. Il était donc concevable que les deux molécules utilisées en association thérapeutique puissent agir en synergie et améliorer l'efficacité anti-tumorale. Curran et *al.* ont démontré lors d'une étude préclinique dans un modèle murin syngénique de mélanome, que la combinaison anti-PD-1 et anti-CTLA-4 induisait une augmentation de l'efficacité anti-tumorale par rapport à chacune des monothérapies anti-PD-1 et anti-CTLA-4. Ils ont d'autre part montré que cet effet anti-tumoral était associé à une augmentation du nombre de LT effecteurs et d'une diminution des LT_{reg} (Curran 2010).

Deux études cliniques de phase I ont été menées pour investiguer le bénéfice de l'association thérapeutique de l'ipilimumab (anti-CTLA-4) et le nivolumab (anti-PD-1). La première étude réalisée par Larkin et *al.* a démontré une augmentation de la médiane de survie sans rechute pour l'association thérapeutique (11,5 mois) par rapport aux monothérapies (2,9 mois pour l'ipilimumab et 6,9 mois pour le nivolumab). L'apparition d'effets secondaires de grade 3 et 4 ont été observés chez 16,3% des patients traités par le nivolumab seul (fatigue et diarrhée) et chez 27,3% des patients traités avec l'ipilimumab seul (inflammation du colon, éruption cutanée et diarrhée). La combinaison thérapeutique quant à elle a induit chez 55% des patients une toxicité hépatique avec augmentation de l'ALAT et ASAT, des diarrhées, de la fatigue, des éruptions cutanées et une inflammation du colon (Larkin 2015). Wolcho et collaborateurs en 2017 ont ainsi démontré que le nivolumab seul ou en combinaison avec l'ipilimumab permettait une augmentation significative du taux de survie globale des patients par rapport à l'ipilimumab seul,

qui était respectivement à 3 ans de 52 %, 58% et 34 %. Les réponses cliniques induites par le nivolumab seul ou en combinaison avec l'ipilimumab étaient similaires (Wolcho 2017) (**figure 23**).

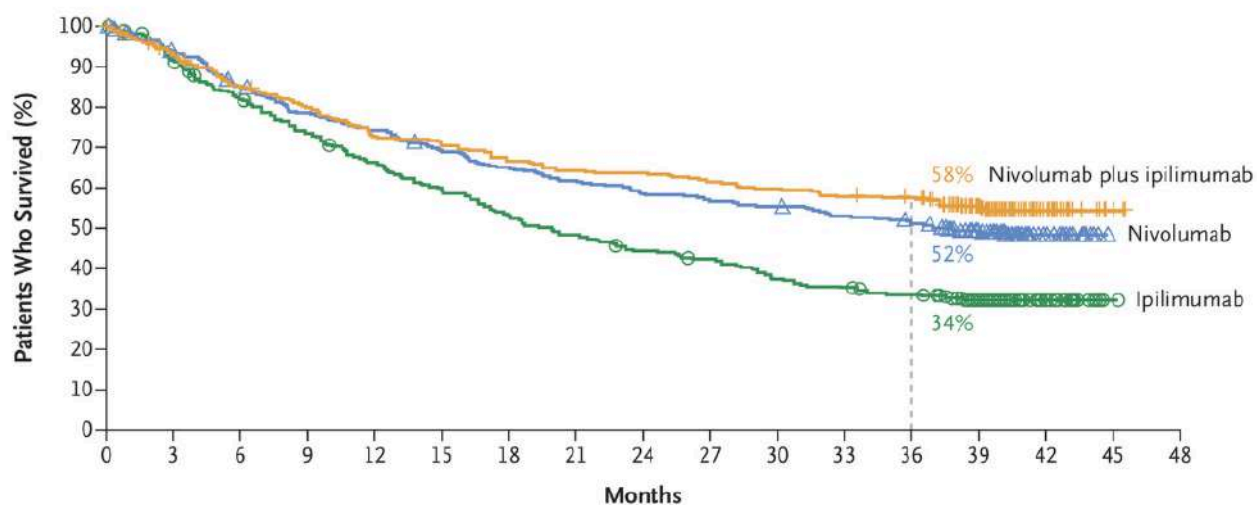


Figure 23 : Taux de survie des patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par le Nivolumab, l'ipilimumab ou la combinaison des deux AcM. (d'après Wolcho 2017)

Ces résultats démontrent la supériorité de l'efficacité thérapeutique du nivolumab par rapport à l'ipilimumab dans le traitement du mélanome. De plus les effets secondaires de grade 3 et 4 sont plus rares avec cet anticorps anti-PD-1 qu'avec l'ipilimumab.

Le deuxième anticorps anti-PD-1, le **pembrolizumab** (anciennement Lambrolizumab) a été initialement testé dans une étude clinique de phase I menées chez 173 patients atteints de mélanomes réfractaires à l'ipilimumab. Elle a démontré un taux de réponse objective de 26% (Robert 2015). Un essai de phase III randomisé incluant des patients atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique (non traité au préalable par l'ipilimumab) a révélé une supériorité du pembrolizumab face à l'ipilimumab en terme d'efficacité thérapeutique et de sécurité. En effet, le taux de survie pour les patients traités avec le pembrolizumab toutes les 3 semaines pendant 12 semaines était respectivement de 68 % à 1 an et de 55% à 2 ans contre 59% et 43% pour l'ipilimumab (Schachter 2017 ; Robert 2019) (**figure 24**). Par ailleurs, le traitement par le pembrolizumab a aussi généré un taux de réponse objective plus important (43% contre 17% pour l'ipilimumab).

Cet AcM semble aussi être associé à moins de toxicité puisqu'avec le pembrolizumab, 79 % des patients ont développé des effets secondaires sans grade, 13 % des effets indésirables de grade 3-4 contre 60% avec l'ipilimumab (Hamid 2013).

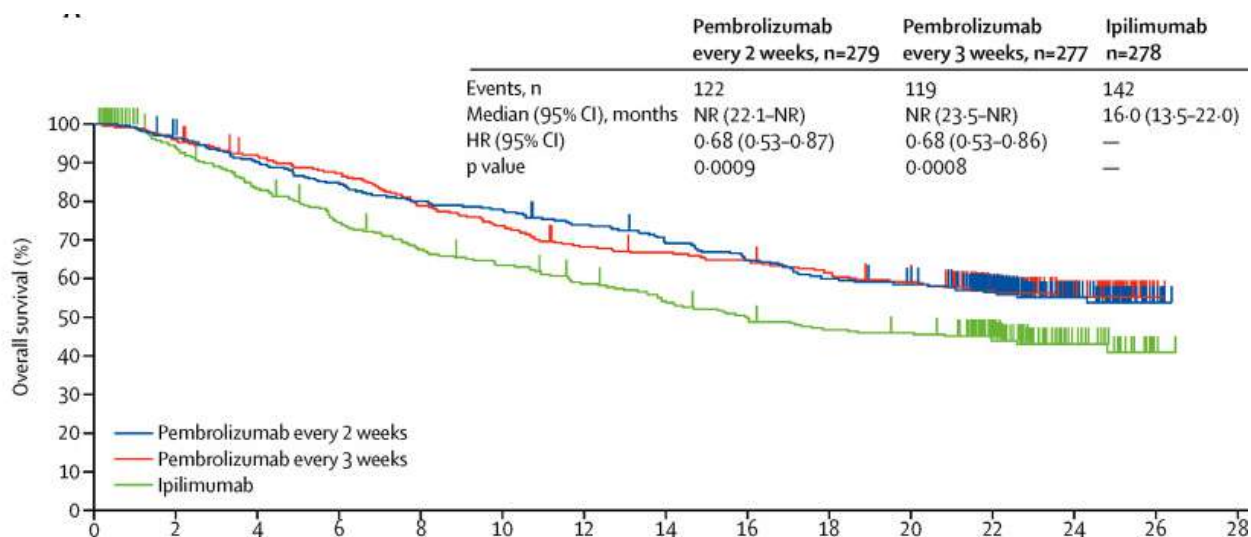


Figure 24 : Survie globale des patients traités avec le pembrolizumab ou l'ipilimumab en première intention pour un mélanome non résecable et/ou métastatique. (d'après Schachter 2017)

6.2. Les anticorps anti-PD-L1

Au cours de ces dernières années, plusieurs AcM anti-PD-L1 ont aussi été développés et évalués dans le traitement du mélanome dont l'atezolizumab. Le traitement par l'atezolizumab induit 26% de réponses objectives ce qui se rapproche des résultats obtenus avec l'IL-2 par exemple. De plus, ce traitement a provoqué une toxicité aiguë importante chez 33% des patients (Hamid 2013). Actuellement pour le traitement du mélanome, les immunothérapies basées sur les anticorps anti-PD-L1 semblent être moins efficaces et plus toxiques que celles basées sur les anticorps anti-PD-1. Les AcM anti-PD-L1 ont néanmoins trouvé un développement dans l'imagerie des tumeurs, partie développée ultérieurement.

Si l'on considère l'ensemble des thérapies utilisées pour le traitement du mélanome, nous pouvons constater que malgré les incroyables avancées obtenues récemment, leur efficacité clinique reste limitée, avec des réponses objectives allant de 6% pour la chimiothérapie à 40 % pour les anticorps anti-PD-1 à 3 ans. Ce qui signifie que 60% des patients ne répondent pas au traitement le plus efficace contre le mélanome (Topalian 2014). De nouvelles voies de traitements restent donc à explorer. Parmi ces nouvelles voies, l'idée d'associer les effets cytotoxiques des rayonnements ionisants à la spécificité de molécules immunologiques sous la forme d'une radiothérapie interne vectorisée (RIV) a émergé. La partie suivante, présente les concepts et les aspects généraux de la RIV et met l'accent sur la RIV dans le traitement du mélanome.

Partie 3 : La radiothérapie interne vectorisée pour le traitement du mélanome

Chapitre I : La radiothérapie interne vectorisée

I. Généralités

La radiothérapie est une technique médicale qui utilise les rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les radiations émises sont capables d'ioniser la matière qu'ils traversent et d'endommager les composants cellulaires (en particulier l'ADN), entraînant l'arrêt de la division cellulaire et la mort cellulaire. L'idée d'utiliser des rayonnements ionisants pour traiter des cancers est apparue à la fin du 19^{ème} siècle avec l'utilisation des rayons X par Victor Despeignes à Lyon pour le traitement d'une tumeur de l'estomac (elsevier.com –Nonnotte 2016). Les radiations utilisées sont de haute énergie, elles peuvent être électromagnétiques (rayons X ou rayons γ) ou particulaires (électrons, protons, noyaux d'Hélium). L'objectif de la radiothérapie est de délivrer une dose de rayonnement la plus précise possible, en épargnant au mieux les tissus sains avoisinants.

Selon l'Institut national du cancer (INCa), près de 50% des personnes atteintes de cancer sont traitées par **radiothérapie externe**. La radiothérapie peut être également administrée par voie interne dite **radiothérapie interne**. La radiothérapie interne repose sur l'introduction dans l'organisme d'un agent thérapeutique radioactif. Il faut néanmoins distinguer :

- la **curiethérapie** (ou brachythérapie) qui consiste à introduire une source radioactive directement au niveau des masses tumorales à traiter. Les radiations émises ont une pénétration faible dans les tissus et donc n'irradient pas les tissus sains. Cependant il faut que la tumeur primaire ou les métastases soient accessibles. Cette méthode est habituellement utilisée pour traiter les cancers cervicaux (Stewart et Viswanatham 2006), de la prostate (Langley 2012), du sein (Helep & Wazer 2012), de la peau (hors mélanome) (Alam 2011).
- la **radiothérapie interne non vectorisée ou vectorisée (RIV)** qui repose sur l'administration d'un radiopharmaceutique (molécule marquée avec un radioélément) qui va se fixer de manière spécifique sur les cellules cancéreuses à détruire. L'enjeu de ce type d'approche est de déposer rapidement une dose importante de radiopharmaceutique au niveau de la tumeur afin de la détruire tout en limitant l'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants. Cette thérapie est généralement administrée par voie sanguine permettant une diffusion dans tout l'organisme. Cette approche permet le traitement des tumeurs primaires localisées, des métastases disséminées (détectées ou non en imagerie), ainsi que l'éradication des cellules tumorales qui peuvent demeurer à la suite de la chirurgie qui sont responsables des récives. Certains radioisotopes ont la capacité de s'intégrer naturellement et spécifiquement dans le métabolisme de certaines cellules sans vecteur.

Cette propriété peut être utilisée pour traiter des cancers, c'est le cas par exemple de l'iode-131 qui est capturé par la thyroïde. Dans les années 1940, son utilisation dans le traitement des carcinomes thyroïdiens a induit chez les patients des résultats spectaculaires accompagnés de rémissions complètes (Robbins 2005). C'est aussi le cas d'autres radioisotopes, tels que le strontium-89 et du samarium-153 qui ont une affinité pour les tissus osseux et qui peuvent être utilisés comme traitement palliatif pour diminuer les douleurs liées au développement de métastases osseuses (Bauman 2005). L'analogue du calcium, le radium-223 qui a obtenu un AMM, a également un tropisme osseux, il est utilisé dans le traitement notamment de métastases osseuses du cancer de la prostate (Gupta 2017). La majorité des approches thérapeutiques développées ou en cours de développement sont néanmoins vectorisées et ont recourt à des vecteurs divers : anticorps, fragments d'anticorps, peptides, hormones, acides aminés.

II. Les différentes RIV

En RIV, les différentes sources radioactives utilisées se différencient par les particules qu'elles émettent, leur parcours dans la matière et leur transfert linéique d'énergie (TEL). Le TEL correspond à la quantité d'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière, par unité de distance (Kassis & Adelstein 2008).

1. La RIV- β

La RIV- β repose sur l'utilisation de radioéléments émetteurs de particules β^- ou électron. La désintégration β^- se produit lorsque le noyau est en excès de neutrons par rapport au nombre de protons. Un neutron se transforme en proton et le noyau expulse un électron ou particule β^- . Les principales particules β^- utilisées en clinique ont des énergies qui varient de 0,2 à 2,3 MeV, un parcours dans les tissus allant de 1 à 10 mm, et un TEL faible d'environ 0,2 keV/ μ m (Kassis 2008) (**tableau 6**).

Tableau 6 : Caractéristiques des émetteurs β^- utilisés en RIV β . (d'après Sharkey 2011)

Radio-isotope émetteur β^-	E_{\max} (en MeV)	Pénétration dans les tissus (en mm)	Demi-vie (en jour)
Yttrium-90	2,28	11,3	2,7
Iode-131	0,61	2,3	8,0
Lutetium-177	0,50	1,8	6,7
Rhenium-188	2,12	10,4	0,7

En pratique l'utilisation de radioisotopes à fort TEL est favorisé en RIV, de manière à provoquer un maximum de lésions létales pour les cellules cancéreuses. Les émetteurs β^- ont un TEL faible mais émettent des rayonnements ionisants sur des parcours relativement longs dans la matière, de l'ordre de 1 à 10 mm en fonction de leur énergie incidente.

La RIV- β a particulièrement montré une efficacité thérapeutique en hématologie dans le traitement du lymphome non hodgkinien (LNH) où elle est devenue un traitement de référence pour les rechutes ou les tumeurs réfractaires (Kaminski 2005 ; Press 1993 ; Tomblyn, 2012). Deux traitements de RIV- β ont été approuvés par la FDA, basés tous les deux sur un AcM anti-CD20 couplé, soit à l'yttrium-90 (^{90}Y -ibritumomab tiuxetan, Zevalin©), soit à l'iode-131 (^{131}I -tositumomab, Bexxar©) (Davies 2007). Le Zevalin est aussi utilisé en traitement de première intention après chimiothérapie inductrice dans le traitement du LNH.

Les peptides ont aussi permis d'obtenir des résultats prometteurs dans les hémopathies. C'est le cas par exemple du pentixather, un peptide de haute affinité pour le récepteur CXCR4 qui est surexprimé dans diverses hémopathies malignes (Burger 2007 ; Peled 2013). Le premier essai clinique avec le pentixather en RIV a été mené par Herrmann et *al.* Trois patients atteints d'un myélome multiple présentant des métastases extra-médullaires lourdement prétraités avec des chimiothérapies ont été traités avec le pentixather couplé au lutetium-177 (^{177}Lu -pentixather) ou à l'yttrium-90, plus efficace que le lutetium-177 pour le traitement de lésions plus importantes. Suite à la RIV, les patients ont subi une chimiothérapie supplémentaire et une greffe autologue de cellules souches pour restaurer la moelle osseuse. Un effet thérapeutique remarquable a été visualisé chez 2 patients, qui ont montré une réduction significative des masses tumorales (Herrmann 2016) (**figure 25**).

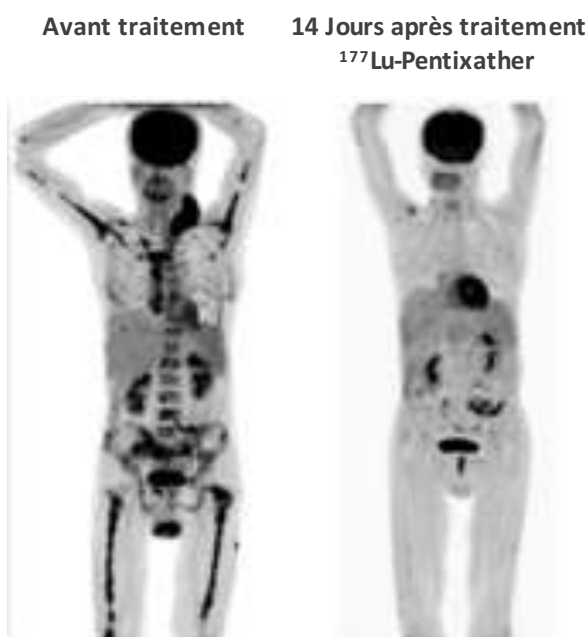


Figure 25 : Réponse d'un patient atteint de myélome multiple métastatique traité au ^{177}Lu -pentixather.

Avant et après le traitement des images de TEP/CT ont été obtenues avec le fluor-18-FDG. À 14 jours après traitement au ^{177}Lu -pentixather, une réponse clinique importante est obtenue avec une éradication des masses tumorales médullaires et extramédullaires (d'après Herrmann 2016).

Moins développée dans le traitement des tumeurs solides généralement moins radiosensibles, l'utilisation de la RIV- β a cependant été aussi testée dans divers cancers avec des résultats très encourageants. Notre groupe a ainsi obtenu lors de plusieurs essais cliniques des résultats significatifs dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde en réalisant une RIV- β avec l'iode-131 et une approche de pré-ciblage (pRAIT) de la tumeur avec un anticorps bispécifique ciblant l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) (Chatal 2006). Une augmentation de la survie globale des patients a été observée (**figure 26**).

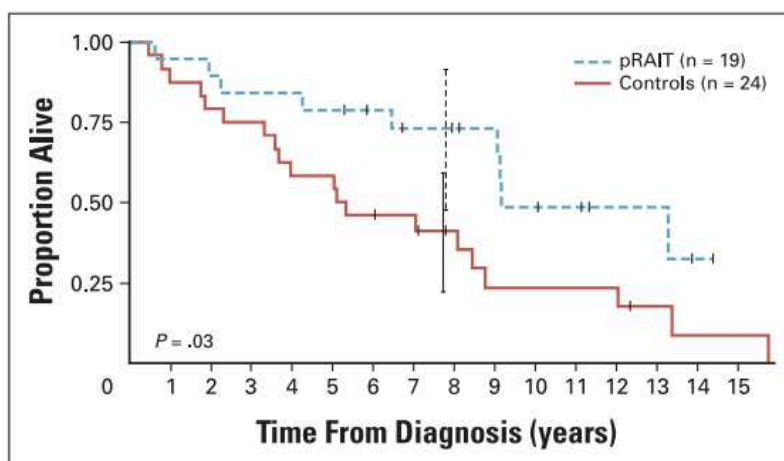


Figure 26 : Survie globale des patients atteints d'un cancer médullaire de la thyroïde traités par RIV β à l'iode-131. (d'après Chatal 2006)

Des essais cliniques de RIV- β ont aussi été menés avec des hormones radiomarquées chez des patients atteints de tumeurs neuroendocrines métastatiques. L'utilisation d'un analogue de la somatostatine couplé au lutetium-177 (le ^{177}Lu -DOTATATE) a permis d'améliorer significativement la survie sans progression de 65,2% comparé au groupe contrôle qui est de 10,8% à 20 mois (Strosberg 2017).

2. La RIV- α

La RIV- α repose sur l'utilisation de radioéléments émetteurs de particules α . Les particules α sont chargées positivement, elles possèdent une masse et une charge égale à un noyau d'hélium. L'émission par le noyau père d'une particule α conduit à un noyau fils comprenant 2 protons et 2 neutrons de moins que le noyau père. L'énergie des particules α émises lors de la désintégration radioactive est comprise entre 5 et 9 MeV, pour un trajet en ligne droite dans les tissus de l'ordre

de 50 à 80 μm , ce qui correspond au diamètre de plusieurs cellules (Sgouros 2010). Le TEL des particules α est très élevé entre 80 et 100 keV/ μm . Les radioisotopes émetteurs de particules α qui sont utilisés en clinique sont indiqués dans le *tableau 6*.

Tableau 7 : Principaux émetteurs de particules α utilisés en clinique. (d'après Sharkey 2011)

Radio-isotope émetteur α	E_{max} (en MeV)	Pénétration dans les tissus (en μm)	Demi-vie	Production
Astate-211	5,9	48	7,2h	Cyclotron
Bismuth-212	6,05	51	60,6 min	Générateur par décroissance du Plomb-212/Bismuth-212
Bismuth-213	5,9	48	45,6 min	Générateur par décroissance du Actinium-225
Actinium-225	5,8	48	10J	Décroissance du Thorium-229
Radium-223	5,64	50-80	11,4 J	Générateur par décroissance du Actinium-227

Au vu de ces caractéristiques, ce rayonnement semble adapté pour le traitement de tumeurs disséminées ou de micrométastases (Kassis 2008).

Au niveau clinique, la RIV- α est encore peu développée et seulement quelques études de phase I ont été rapportées soit pour le traitement des tumeurs hématologiques soit de cancers solides métastatiques. Ainsi l'utilisation d'un AcM humanisé anti-CD33 radiomarké au bismuth-213 a fait l'objet d'un essai clinique chez 17 patients atteints de diverses leucémies myéloïdes. Cette étude a démontré la faisabilité et la sûreté de l'utilisation de la RIV- α en systémique dans ces pathologies, une majorité des patients évalués ayant de plus présenté une réduction du pourcentage de blastes circulants et de blastes au niveau de la moelle (Jurcic 2002).

L'intérêt de la RIV- α a aussi été investiguée dans la carcinose péritonéale par injection intrapéritonéale, d'une part avec un F(ab')₂ radiomarké à l'astate-211 chez 12 patients en réponse complète ou presque complète après rechute d'un cancer ovarien épithélial (Anderson 2009, Hallqvist 2019), d'autre part avec le trastuzumab (anti-HER-2) radiomarké au plomb/bismuth-212 chez 18 patients en rechute après un cancer ovarien ou un cancer du colon (Meredith 2014, Meredith 2018). Ces différentes études ont montré une bonne tolérance du traitement et les études dosimétriques supportent la possibilité de délivrer des activités capables d'éradiquer de petits amas tumoraux sans toxicité significative (Meredith 2018 ; Hallqvist 2019).

Récemment des peptides inhibiteurs de l'enzyme PSMA (prostate specific membrane antigen) ont été développés et évalués dans le cancer de la prostate métastatique hormono-résistant. Les premiers résultats ont été obtenus avec le peptide radiomarké à l'iode-131 (Zechmann 2014) mais c'est avec des radiomarquages au lutetium-177 (¹⁷⁷Lu-PSMA) et surtout à l'actinium-225 (²²⁵Ac-PSMA) que les taux de réponses les plus remarquables ont été obtenus, sur

la base d'une baisse du taux de PSA (Prostate-specific antigen) et de l'imagerie TEP/CT (Kratochwill 2016 ; Heck 2016) (**figure 27**). Les effets secondaires associés à la RIV- α ont été une faible toxicité hématologique et une xérostomie (Kratochwil 2016)

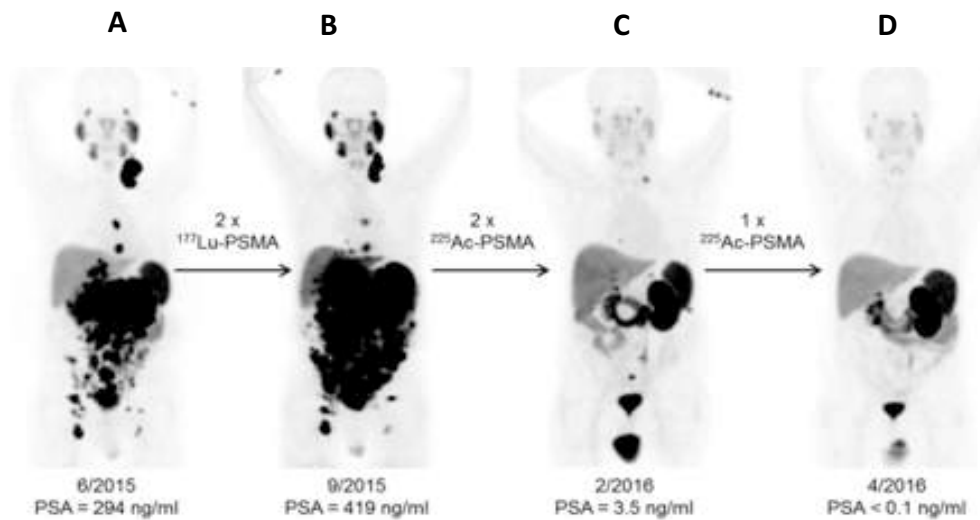


Figure 27 : Réponse d'un patient atteint d'un cancer de la prostate et traité ^{177}Lu -PSMA-617 puis à l' ^{225}Ac -PSMA-617.

Images de TEP/CT avec le peptide PSMA radiomarqué au gallium-68 d'un patient avant traitement **A**. après 2 cycles de ^{177}Lu -PSMA-617, présentant une progression de la maladie avec une augmentation de la concentration en PSA **B**.. En revanche, le traitement après 2 **C**. et 3 cycles **D**. d' ^{225}Ac -PSMA, induit une réponse complète avec éradication des masses tumorales et une diminution de la concentration de PSA (d'après Kratochwil 2016).

Chapitre II : La RIV pour le traitement du mélanome

Dès 1981, DeNardo et *al.* ont généré des AcM contre des antigènes de surface surexprimés de la lignée de mélanome murin P51 dans le but de faire de la RIV- β dans ce modèle préclinique. L'administration d'un de ces radioimmunoconjugués (AcM radiomarqués) à l'iode-131 a entraîné une régression des tumeurs de 0,4 cm à non palpable en 5 jours et les souris ont survécu six mois sans rechute (ouvrage : "Targeted Radionuclide Therapy" Tod W. Speer 2010). Malgré ces premiers résultats précliniques encourageants, les études précliniques et cliniques de RIV du mélanome sont restées relativement peu nombreuses jusqu'à présent.

I. Études précliniques

1. Ciblage la mélanine

Après les travaux de DeNardo et collaborateurs, les études précliniques de RIV se sont principalement intéressées au **ciblage de la mélanine**. Théoriquement, la mélanine n'est pas considérée comme une cible appropriée pour une RIV puisqu'il s'agit d'un pigment intracellulaire contenu dans les mélanosomes et donc hors de la portée d'un anticorps. Les travaux de Dadachova et collaborateurs se sont basés sur le fait que les cellules cancéreuses se trouvant dans les zones hypoxiques nécrosent, leur membrane plasmique devient perméable donnant accès à leurs composants cellulaires ou en les libérant dans le milieu extracellulaire, dont la mélanine. Le ciblage de la mélanine accessible par un radiopharmaceutique devait de plus permettre une irradiation des cellules tumorales voisines par le phénomène de « feu croisé » (Dadachova 2004, Klein 2013) (**figure 28**).

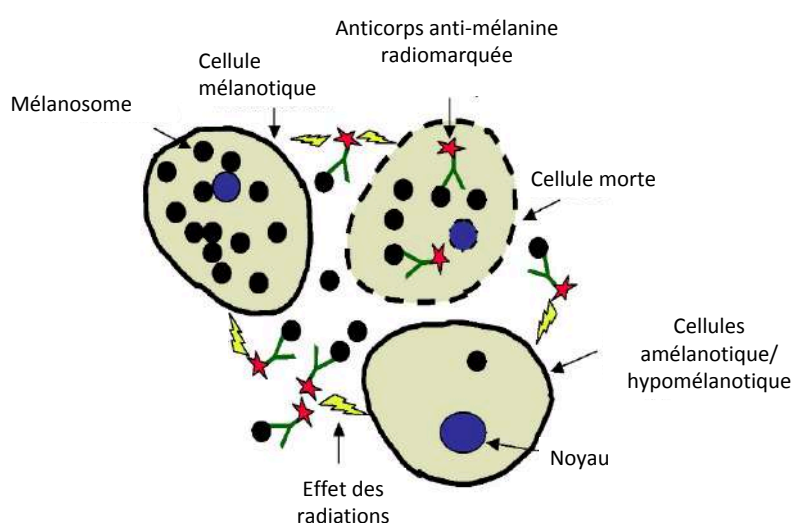


Figure 28 : Schéma détaillant les mécanismes d'action potentiels d'un AcM anti-mélanine radiomarqué.(d'après de Jandl 2013)

Ils ont donc évalué l'efficacité thérapeutique d'une IgM anti-mélanine, le 6D2, radiomarquée au rhenium-188 (6D2-¹⁸⁸Re), dans un modèle de xénogreffe de mélanome humain MNT1 dans la souris nude (Dadochova 2004). L'injection de 55,5 MBq de 6D2-¹⁸⁸Re a dans ce modèle totalement éradiqué la croissance tumorale sans signe de toxicité rénale. Dans les animaux traités par l'injection d'une activité identique d'une IgM irrelevante radiomarquée au rhenium-188 ou de 100 µg de 6D2 non radiomarqué, la croissance tumorale a au contraire continué de façon comparable à celle du groupe contrôle non traité (**figure 29**). L'analyse histologique a montré d'autre part qu'il y avait beaucoup plus de tissus nécrosés et fibrosés dans les tumeurs traitées par le 6D2-¹⁸⁸Re que dans les tumeurs contrôles (Dadachova 2004).

Ces travaux ont été poursuivis par l'étude de l'association de la dacarbazine avec cette RIVβ dans le modèle de xénogreffe de mélanome humain A2058. L'hypothèse sous-jacente était que l'administration d'une chimiothérapie détruirait des cellules tumorales libérant la mélanine et ainsi faciliterait l'action du 6D2-¹⁸⁸Re. Si à cours terme après le traitement, l'association thérapeutique semblait effectivement mieux contrôler le développement tumoral, à moyen terme la RIVβ seule a démontré une meilleure efficacité, relativisant l'intérêt de cette combinaison (Revskaaya 2009) (**figure 30**). Plus récemment dans une étude évaluant le 6D2 dans le modèle MNT1 après radiomarquage à l'yttrium-90, il a été observé que ce radiopharmaceutique était toxique et ne présentait aucune efficacité thérapeutique (Thompson 2014), ce qui souligne l'importance du choix du radioélément dans les stratégies de RIV.

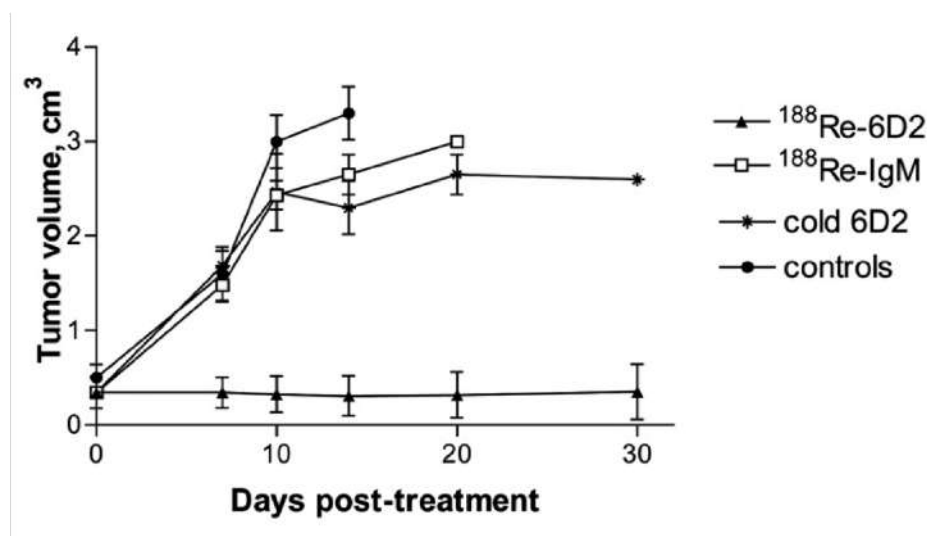


Figure 29 : Analyse de l'efficacité thérapeutique du 6D2-¹⁸⁸Re sur la croissance tumorale de mélanome humain MNT1.(d'après Dadochova 2004)

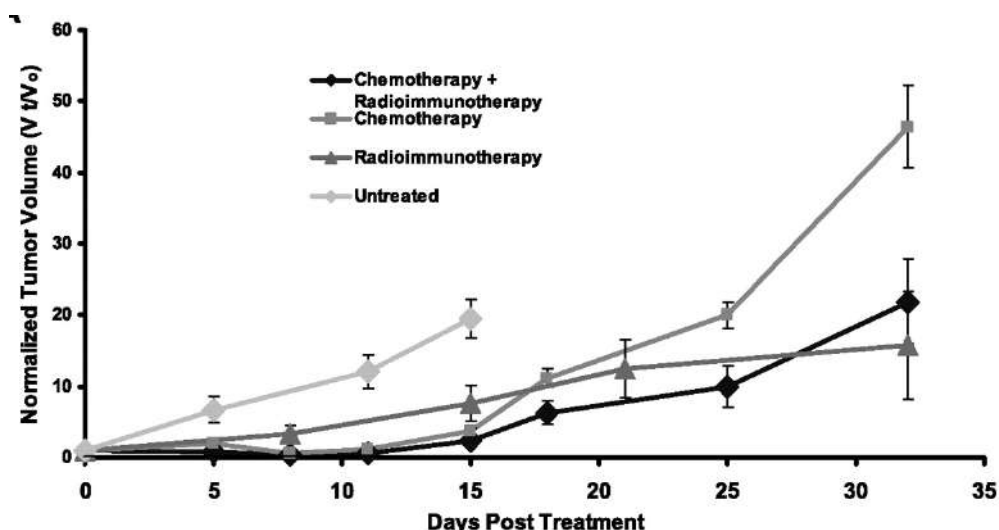


Figure 30 : Analyse de l'efficacité thérapeutique de l'association chimiothérapie et RIV sur le développement tumoral de mélanome humain A2058. (d'après Revskaya 2009)

Dans ce cadre, Allen et collaborateurs ont comparé les effets thérapeutiques d'une RIV- β et d'une RIV- α dans un modèle syngénique de mélanome B16-F10, en utilisant un AcM anti-mélanine radiomarqué (8C3, une IgG) respectivement au lutetium-177 (^{177}Lu -8C3) et au bismuth-213 (^{213}Bi -8C3). Ils ont observé qu'une forte activité de 14,8 MBq d'AcM ^{213}Bi -8C3 était plus efficace que que la même activité d'AcM ^{177}Lu -8C3. En effet, le ^{213}Bi -8C3 réduit la croissance tumorale par rapport au ^{177}Lu -8C3, puisqu'à 21 jours après la RIV le volume tumoral était respectivement d'environ 1000 mm³ contre 3500 mm³ (figure 31). De façon surprenante, aucune toxicité majeure n'a été observée chez les souris traitée avec 14,8 MBq de ^{213}Bi -8C3 : aucune toxicité rénale, hépatique ni de perte de poids. Les auteurs ont uniquement noté une baisse transitoire du nombre des plaquettes pendant 3 semaines (Allen 2019).

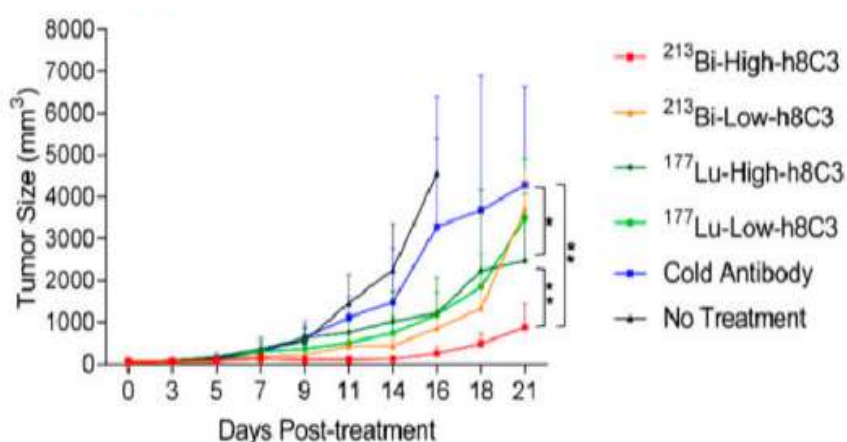


Figure 31 : Efficacité thérapeutique de l'AcM ^{213}Bi -8C3 sur le développement tumoral de mélanome syngénique murin. (d'après Allen 2019)

Les **benzamides** sont des composés aromatiques qui à pH physiologique présentent une forte affinité pour la mélanine. En parallèle des AcM, cette classe de molécule a donc été investiguée pour le développement d'approches d'imagerie et de RIV dans le mélanome.

L'**ICF01012**, un dérivé d'iodo-benzamide, a ainsi été développé pour l'imagerie et la thérapie sur la base de sa capacité à se fixer et à s'accumuler dans les tumeurs de souris greffées avec du mélanome B16F0 (Chezal 2008). Après radiomarquage à l'iode-131 (ICF01012-¹³¹I), une étude préclinique de RIV-β dans des modèles syngéniques et xénogéniques de mélanome, B16 (B16F0 et B16BL6) et M4Beu respectivement, a démontré que l'ICF01012-¹³¹I induisait un retard significatif de la croissance tumorale (Bonnet-Duquennoy 2009).

De plus il a été montré dans divers modèles de mélanomes humains que l'efficacité anti-tumorale de ce composé était de fait uniquement significative dans les modèles pigmentés. L'efficacité ne semblait cependant pas être affectée par une pigmentation faible ou une hétérogénéité de distribution de la mélanine dans la tumeur (Bonnet 2010). Des études de toxicité ont révélé au niveau hématologique une diminution significative mais transitoire du nombre de leucocytes et aucun impact sur le nombre de plaquettes. Au niveau des tissus pigmentés, aucune altération histologique n'a été observée au niveau de la peau ou de la rétine. La majorité des animaux traités présentaient néanmoins des altérations dans la zone du nerf optique (Degoul 2013).

MIP-1145 est une autre petite molécule dérivée de benzamide dont l'efficacité thérapeutique a été testée après radiomarquage à l'iode-131 (MIP-1145-¹³¹I) chez des souris immunodéficientes greffées avec le mélanome humain SK-MEL-3. Le traitement par MIP-1145-¹³¹I a consisté en une à trois injections de 25 MBq de radiopharmaceutique et a permis d'observer un ralentissement très prononcé de l'évolution du volume tumoral dans tous les groupes traités par rapport au groupe contrôle (**figure 32**). La survie des animaux a été de même allongée significativement et en particulier dans le groupe traité avec 3 injections de MIP-1145-¹³¹I puisque tous les animaux de ce groupe étaient encore vivants après 125 jours de suivi. Aucune étude de toxicité n'a été menée dans cette étude mais les animaux n'ont montré ni signes de souffrance ni perte de poids significative.

Enfin une étude de dosimétrie réalisée sur la base d'une étude de pharmacocinétique et d'imagerie SPECT chez le singe, supportait la possibilité d'utiliser MIP-1145 pour la RIV chez l'homme (Joyal 2010).

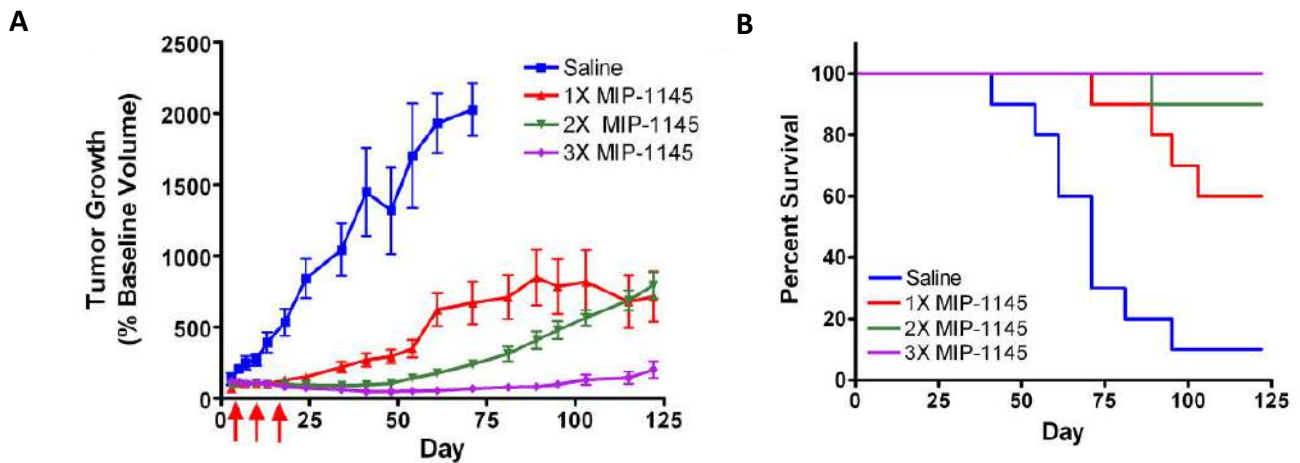


Figure 32 : Effets thérapeutiques de la RIV avec MIP-1145-¹³¹I sur la croissance des tumeurs SK-MEL-3 et la survie des souris.

A. Croissance tumorale de xénogreffes de mélanome humain SK-MEL-3 dans des souris nude traitées par 1 à 3 injections de 25 MBq de MIP-1145-¹³¹I ou non traitées, exprimée en % de croissance du volume tumoral par rapport au volume initial. **B.** Taux de survie des animaux. (d'après Joyal 2010)

2. Ciblage de MC1R

Comme évoqué précédemment, la mélanogenèse et la différenciation des mélanocytes implique la fixation de l'hormone α -MSH sur le récepteur MC1R exprimé à la surface des cellules de mélanome mais également des mélanocytes, il représente donc une cible thérapeutique intéressante en RIV. Des analogues de son ligand, le α -MSH, ont été développés et radiomarqués avec des émetteurs α (plomb-212) ou β (rhenium-188). Un des analogues de α -MSH radiomarqué au Rhénium-188 évalué dans un modèle de xénogreffe de mélanome humain TXM-13 a permis une diminution du volume tumoral sur au moins 26 jours de suivi, associée à une augmentation de la durée de vie (Miao & Quinn, 2008) cependant les résultats concernant la croissance tumorale après 26 jours ne sont pas présentés (**figure 33**).

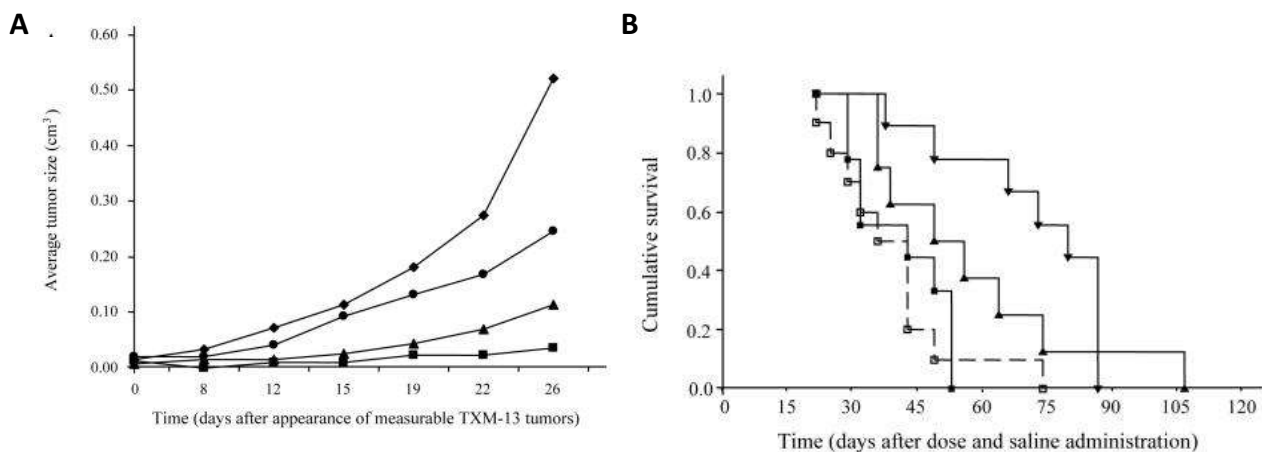


Figure 33 : Analyse de l'efficacité thérapeutique d'un analogue de l' α -MSH radiomarqué au Rénium-188.

A. Croissance tumorale du mélanome humain TXM-13 à différentes doses (de haut en bas : solution saline (◆), 2x14,8 MBq (●), 22,2 MBq (▲) et 37 MBq (■)). **B.** la survie des animaux traités par une solution saline (□), 2x14,8 MBq (■), 22,2 MBq (▲) et 37 MBq (▼). (d'après Miao & Quinn 2008)

3. Ciblage de MCSP

La MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan) stimule et contrôle plusieurs voies de signalisation impliquées dans tumorigénèse (Yang 2004). Elle est fortement exprimée à la surface cellulaire des naevi dysplasiques et sur plus de 85% des mélanomes (Bruyn 2010). C'est donc un antigène surexprimé qui est corrélée à un pronostic défavorable (Vergilis 2005).

Lors d'une étude *in vitro* l'AcM 9.2.27 radiomarqué au bismuth-213 a été testé pour sa spécificité, son efficacité et sa cytotoxicité sur des cellules de mélanome (Bumol 1982). Cette étude a démontré que cet AcM se fixe spécifiquement sur les lignées de mélanomes exprimant MCSP et induit une cytotoxicité spécifique des cellules MCSP positives. Une étude *in vivo* dans un modèle de xélogreffe de mélanome humain MM138 a montré qu'à différents temps après la greffe tumorale l'efficacité de la RIV avec cet AcM dépend du volume tumoral (Hwang 1985). Les effets secondaires ont été limités du fait de l'absence de fixation sur d'autres organes que la tumeur.

4. Ciblage de VLA-4

L'antigène Very late antigen-4 (VLA-4 ou intégrine $\alpha 4\beta 1$) est exprimé à des niveaux élevés dans le mélanome agressif et métastatique. Une étude a analysé dans le modèle syngénique B16-F10, l'effet thérapeutique d'un ligand de VLA-4 et radiomarqué au lutetium-177 (LLP2A- ^{177}Lu) et son association avec une combinaison d'ICI (anti-PD-L1 + anti-CTLA-4) (Choi 2018). Le LLP2A- ^{177}Lu seul a montré une efficacité comparable aux ICI seuls ou aux différentes combinaisons d'ICI. Alors que la combinaison LLP2A- ^{177}Lu + combinaison d'immunothérapies ralentissent la progression tumorale en augmentant la survie des animaux (**figure 34**). Par ailleurs, Les traitements LLP2A- ^{177}Lu + ICI montrent par un marquage TUNEL un niveau élevé d'apoptose par rapport au contrôle non traité ou aux monothérapies.

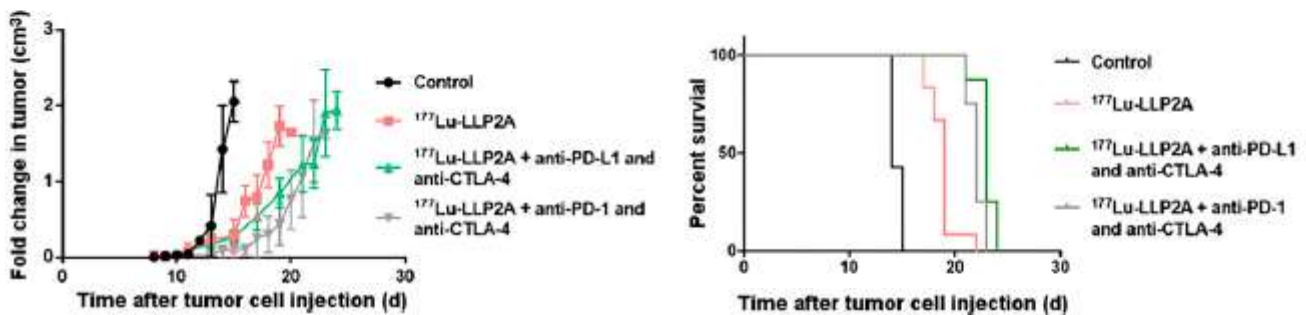


Figure 34 : Effets thérapeutiques de LLP2A- ^{177}Lu et son association avec une combinaison d'anticorps bloquants. (d'après Choi 2018)

II. Études cliniques

Suite aux résultats précliniques obtenus avec l'AcM 9.2.27 spécifique de la MCSP, un essai clinique de RIV- α a été mené avec cet AcM radiomarqué au bismuth-213 (9.2.27- ^{213}Bi). Le traitement a été réalisé par injection du radiopharmaceutique dans les lésions tumorales de mélanome chez 16 patients. Cette RIV- α a été localement efficace et non toxique jusqu'à 52 MBq entraînant une mort cellulaire massive tout en épargnant les tissus sains au alentours (Allen 2005).

Cette étude a été suivie par un autre essai clinique d'escalade de doses chez des patients atteints de mélanome métastatique avec l'AcM 9.2.27- ^{213}Bi délivré cette fois-ci par voie systémique. Une publication rapportant les résultats des 22 premiers patients inclus a été réalisée en 2007. Les auteurs ont alors rapporté l'absence de signes de toxicité en réponse au traitement, à l'exception d'un patient qui eu des nausées. Des réponses cliniques ont été obtenues puisque 50% des patients ont présenté une stabilisation de la pathologie après le traitement et 14% ont montré une réponse partielle. Une réponse presque complète a été observée chez 1 patient qui a été

retraité (**figure 35**) (Raja 2007). Cette étude s'est prolongée avec l'inclusion au total de 38 patients. La dose maximale tolérée n'a pas été atteinte dans cette étude puisqu'aucune toxicité notable n'a été observée. Malgré cela, 10% des patients ont montré une réponse partielle objective et 6 patients (15%) ont montré une survie supérieure à 3 ans (Allen 2011). Ces résultats encourageants ont été obtenus bien que le bismuth-213 ait une demi-vie extrêmement courte et un trajet très court dans la matière, caractéristiques qui à priori ne faisaient pas de lui un candidat idéal pour une utilisation en clinique dans le traitement de tumeurs solides.

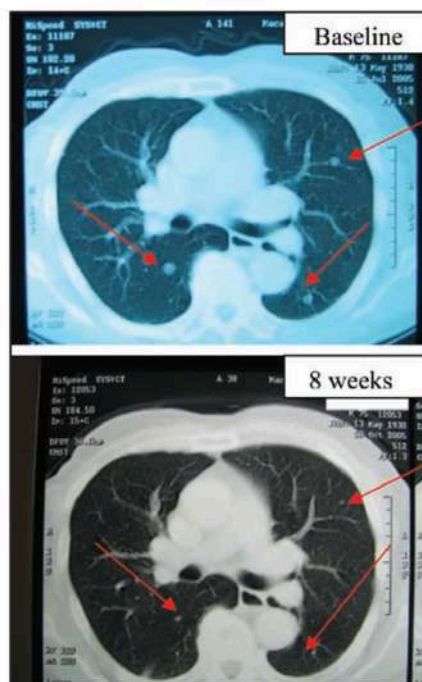


Figure 35 : Régression complète de deux métastases pulmonaire chez un patient traité par RIV α avec l'AcM 9.2.27-²¹³Bi anti- MCSP. (d'après Raja 2007)

L'AcM 6D2 spécifique de la mélanine a aussi fait l'objet de plusieurs études précliniques, résumées dans la partie précédente. Sur la base de ces études, un essai clinique de RIV a été mené dans le but d'évaluer l'innocuité, la pharmacocinétique, la dosimétrie et l'activité anti-tumorale du 6D2-¹⁸⁸Re. Les 20 patients inclus dans l'étude présentaient un mélanome métastatique de stade III (non résécable) ou de stade IV. Le 6D2-¹⁸⁸Re a été bien toléré par tous les patients. Aucune fixation dans les tissus sains mélanisés et aucun effet toxique majeur n'ont été observés. Chez 9 patients, une immunisation transitoire contre le radiopharmaceutique (IgM de souris) a pu être détectée. Le 6D2-¹⁸⁸Re a démontré une activité anti-tumorale (**figure 36**) avec une médiane de survie des patients de 13 mois contre 8,5 mois chez les patients recevant un traitement standard à l'époque de cette étude (Klein 2013).

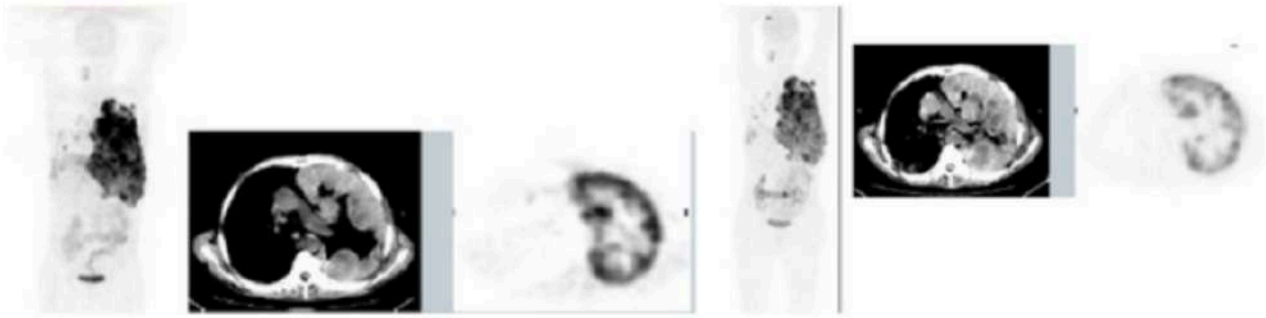


Figure 36 : Réponse clinique à l'AcM 6D2-¹⁸⁸Re chez les patients atteints de mélanome métastatique.

Image de TEP au ¹⁸F-DG d'un patient, à gauche 10 jours avant l'étude et à droite 7 jours après l'injection de l'AcM 6D2-¹⁸⁸Re (d'après de Klein 2013).

Enfin, l'efficacité thérapeutique des benzamides a aussi été évaluée chez l'homme. Lors d'un essai clinique de phase I, 26 patients ont été inclus pour investiguer les effets thérapeutiques du benzamide BA-52 radiomarqué à l'iode-131 (BA-52-¹³¹I). La thérapie étant conditionnée à une SPECT positive avec le BA-52 radiomarqué à l'iode-123, 9 patients seulement ont été traités avec des activités allant de 0,5 à 6,6 GBq. Aucune toxicité aiguë ni toxicité à moyen terme n'a été observée sur la période de suivi. L'imagerie a démontré une fixation spécifique et une rétention à long terme du radiopharmaceutique dans les tumeurs. Une accumulation faible et transitoire a été observée dans les organes excréteurs. Le BA-52-¹³¹I a montré une activité anti-tumorale, puisque sur les 5 patients ayant reçu plus de 4 GBq, 3 patients ont présenté une survie de plus de 2 ans après la thérapie. En comparaison, la survie moyenne des autres patients de l'étude (non traités ou traités avec des activités inférieures à 4 GBq) a été de 3 mois (Mier 2014).

Partie 4 : L'imagerie TEP dans le mélanome

Chapitre I : Généralités

En oncologie, le concept de médecine personnalisée a vu le jour grâce à la caractérisation des signatures moléculaires tumorales (voie de signalisation mutée, biomarqueurs...). Ces découvertes ont permis le développement de traitements plus spécifiques dont les thérapies ciblées et la RIV. Cependant des patients atteints du même type de cancer peuvent répondre différemment au même traitement. C'est pourquoi l'identification de la cible au niveau de la tumeur du patient est un paramètre essentiel pour orienter le choix du traitement, définir la bonne dose, et le bon moment pour le délivrer. Ce paramètre peut aussi permettre de prédire ou évaluer l'efficacité des thérapies (Willmann 2008 ; Danielsen 2016).

En pratique lorsqu'un mélanome ou tout autre type de cancer est détecté, l'étude des marqueurs tumoraux se fait par une analyse immuno-histochimique sur les exérèses. Cependant, cette analyse est faite sur une ou quelques lésions du patient et ne reflète pas obligatoirement les marqueurs présents sur la globalité des lésions tumorales. De plus, certains marqueurs tumoraux, comme PD-L1, peuvent avoir une expression hétérogène au sein d'une même masse tumorale ou des métastases. Ainsi les exérèses récupérées peuvent ne pas être représentatives du phénotype de l'ensemble des lésions intertumorales ou intratumorales (Grzywa & Paskal 2017) (**figure 37**).

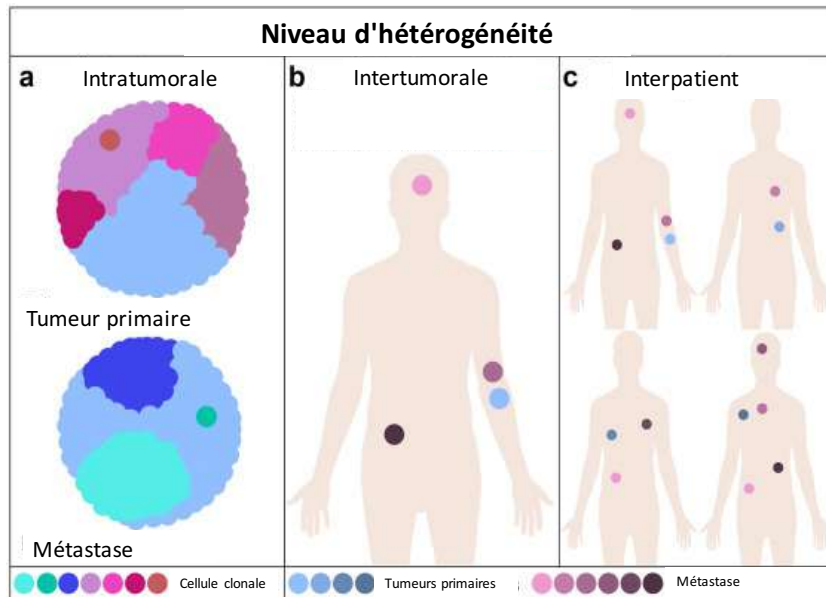


Figure 37 : Hétérogénéité des lésions tumorales primaires et métastatiques de mélanome.
(d'après Grzywa 2017)

Pour toutes ces raisons, les techniques d'imagerie du corps entier non invasives, et en particulier la **tomographie par émission de positrons (TEP)**, ont connu un très fort développement en clinique ces dernières années.

La TEP utilise la capacité d'une molécule radiopharmaceutique à être capturée par des cellules du corps d'où ils émettront des rayonnements qui pourront être détectés. Elle fournit une **imagerie fonctionnelle** (ou métabolique) en produisant des images qui informent sur la physiologie, le fonctionnement (métabolisme) d'un organe plutôt qu'une information anatomique que l'on peut obtenir à partir d'une radiographie ou un scanner par exemple.

Pour aller plus loin il est possible d'analyser *in vivo* de façon non invasive des biomarqueurs au sein d'un tissu ou d'un groupe de cellule par **imagerie moléculaire (ou phénotypique)**. Cette technique d'imagerie est basée sur l'utilisation de radiopharmaceutiques spécifiques composés d'un vecteur radiomarqué qui cible une protéine membranaire.

Chapitre II : Principe de la TEP

La tomographie par émission de positrons est basée sur la détection de photons de coïncidence. Ces photons sont générés par l'annihilation d'une particule β^+ chargée positivement (le positron) avec un électron situé dans le milieu environnant. Les deux particules s'annihilent et deux photons γ , d'une énergie de 511 KeV chacun, sont émis en direction opposées à 180°. Ces 2 photons peuvent être détectés en coïncidence et après reconstitution par ordinateur permettent de localiser très précisément le vecteur radiomarqué (traceur) dans l'organisme (**figure 38**).

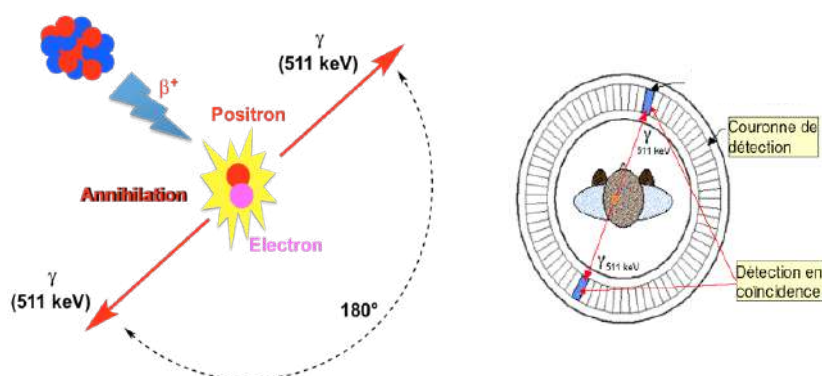


Figure 38 : Schéma illustrant le principe physique de la TEP.

(adapté de : medecinucleaire-tep-sarcelles.fr)

Le terme de traceur caractérise la capacité du vecteur radiomarqué à suivre un phénomène biologique et les faibles quantités administrées (« traces »). Il existe plusieurs émetteurs de particules β^+ utilisés en clinique (**tableau 8**). Leur utilisation dépend de leur demi-vie, du vecteur utilisé mais également de leur tropisme si le radiomarquage n'est pas stable *in vivo* en fonction de la localisation des lésions tumorales (Olafsen 2010).

Tableau 8 : Caractéristiques physiques des principaux radioisotopes émetteurs de particules β^+ .

(d'après Conti & Eriksson 2016)

Radio-isotope Émetteur β^+	β^+ (%)	E_{max} (en MeV)	Demi-vie (min)	Parcours dans l'eau (en mm)	
				Moyen	Maximal
Fluor-18	97	0,64	110	0,6	2,4
Cuivre-64	18	0,65	762	0,7	2,5
Gallium-68	89	1,90	68	3,1	8,9
Zirconium-89	22	0,90	4704	1,3	4,2

La TEP est généralement associée à un scanner, la TEP/CT permettant ainsi de corréler l'image métabolique et l'image anatomique, et l'interprétation des lésions pathologiques avec une plus grande certitude.

Chapitre III : La TEP dans le diagnostic et le suivi du mélanome

Le traceur actuellement le plus utilisé en oncologie est le déoxyglucose marqué au fluor-18 (^{18}F -FDG). C'est un analogue synthétique du glucose associé au ^{18}F qui s'accumule dans les cellules présentant une activité glycolytique élevée dont les cellules inflammatoires et cancéreuses. Ces cellules surexpriment les transporteurs du glucose et les enzymes glycolytiques. Ce traceur reste bloqué dans la cellule car, contrairement au glucose, cette molécule ne peut être scindée par la voie glycolytique (Stettler 2012).

Dans cette sous-partie, les applications de la TEP/CT au ^{18}F -FDG dans la prise en charge clinique du mélanome seront discutées.

Cette technique d'imagerie nucléaire peut fournir une **cartographie des lésions tumorales** marquées permettant leur résection si cela est possible (Bastiaannet 2006). Il a été décrit que la résection complète des métastases peut être réalisée dans 70 à 80% des patients atteints d'un mélanome de stade M1a (métastases cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires distantes) (Ollila 2006).

Elle permet également de **déterminer le stade d'avancement** de la maladie contribuant à la décision du traitement. Il a été démontré lors d'une méta-analyse, basée sur 74 études, que la TEP/CT au ^{18}F -FDG a une sensibilité de 86%, meilleure que la TEP (82%) et le CT (63%) seuls (Xing 2011). Le diagnostic des métastases osseuses par TEP/CT surpasse la scintigraphie osseuse (Balch 2009).

L'intérêt de la TEP/CT repose également sur **l'évaluation de la réponse thérapeutique**. L'absorption du ^{18}F -FDG peut indiquer l'apparition des lésions mais également les rechutes ou les lésions réfractaires au traitement. Les cas de quelques patients rapportés dans une revue par Wong *et al.* en sont des exemples très concrets (Wong 2017).

Après résection d'un mélanome au niveau du scalp, la TEP/CT au ^{18}F -FDG d'un premier patient, révélait la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques cervicaux gauches, (**figure 39 A**). Après chirurgie, une 2^{ème} TEP/CT a montré une progression et extension des métastases ganglionnaires (**figure 39 B**). Le patient présentant la mutation BRAF^{V600E} a alors bénéficié d'un traitement par des inhibiteurs de BRAF et de MEK. Deux semaines après l'initiation du traitement, une 3^{ème} TEP/CT (**figure 39 C**) au ^{18}F -FDG a permis d'observer une réponse complète. Une surveillance à 12 mois a attesté que le patient était toujours en réponse complète (**figure 39 D**)

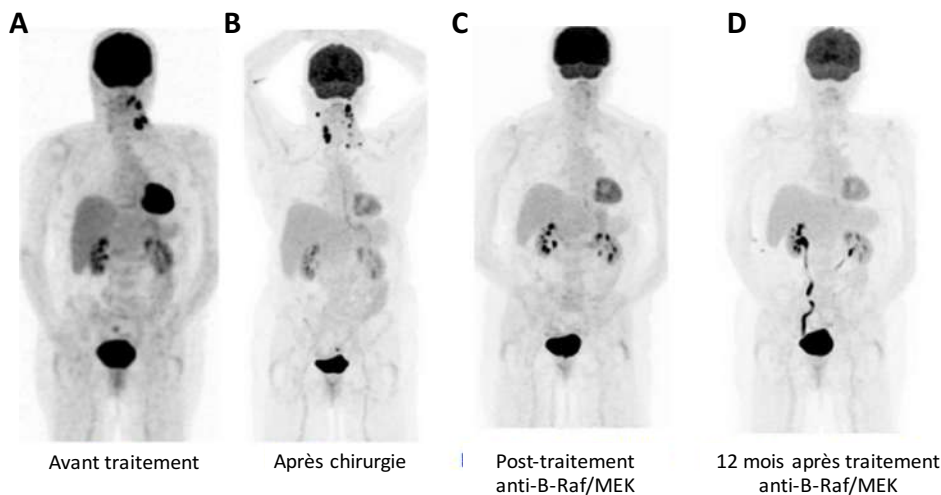


Figure 39 : TEP/CT au ^{18}F -FDG d'un patient atteint de mélanome métastatique et présentant une réponse complète après traitement avec des inhibiteurs de B-RAF et de MEK.

(d'après Wong 2017)

Des résistances intrinsèques peuvent empêcher toute réponse clinique aux thérapies initiées. C'est le cas d'un 2^{ème} patient, présentant un mélanome avec une mutation BRAF chez lequel la TEP/CT a montré une fixation similaire du ^{18}F -FDG sur les métastases avant et après traitement au vémurafenib, démontrant leur statut réfractaire à cette thérapie ciblée (Wong 2017) (**figure 40**).

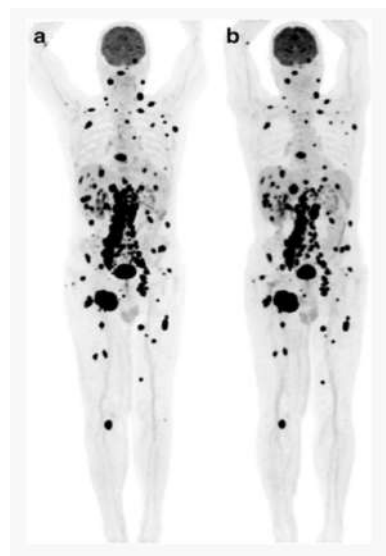


Figure 40 : TEP/CT au ^{18}F -FDG d'un patient développant un mélanome métastatique résistant au vémurafenib, inhibiteur de B-RAF.

A. TEP/CT avant traitement B. TEP/CT après traitement (d'après Wong 2017).

Enfin, la TEP/CT ^{18}F -FDG pourrait aussi apporter de nouvelles informations dans l'évaluation de la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires chez les patients traités pour un mélanome par la mise en évidence de sites inflammatoires associés à des effets secondaires toxiques, comme des colites (Aide 2019).

Chapitre IV : Les nouvelles approches d'imagerie phénotypique pour le mélanome

La principale limite de la TEP au ^{18}F -FDG est l'absence de spécificité tumorale du traceur. Dans la présence d'un infiltrat immunitaire peut entraîner une augmentation de l'accumulation du traceur dans les lésions après immunothérapie (Wong 2017, Aide 2019). Une autre limite est sa fixation importante au niveau du cerveau qui limite la détection des métastases cérébrales. De plus, une hyperglycémie, notamment dans le cadre d'un diabète peut altérer la capture du ^{18}F -FDG par les cellules ayant une glycolyse élevée (Stettler 2012).

Pour résoudre ce problème de non spécificité mais aussi augmenter la sensibilité et la précision de l'imagerie phénotypique, de nouvelles approches sont en développement utilisant des petites molécules/peptides pour de la TEP vectorisée ou des anticorps pour l'immuno-TEP.

I. La TEP vectorisée

Les peptides et autres petites molécules développées en préclinique pour la RIV du mélanome et décrites dans la partie 3 de ce manuscrit, ont pour la plupart aussi fait l'objet d'un développement en imagerie afin de pouvoir disposer d'outils théranostiques : un même vecteur pouvant servir à la fois au diagnostic et à la thérapie et permettant ainsi d'une part la sélection des patients pouvant bénéficier du traitement, et d'autre part de déterminer les doses à injecter pour le traitement. Leurs caractéristiques pour l'imagerie sont donc développées dans cette section.

1. Les benzamides ciblant la mélanine

Nous avons évoqué précédemment l'ICF01012, dérivé de benzamide, évalué en préclinique comme radiopharmaceutique pour la RIV, compte tenu de sa haute affinité pour la mélanine. Cette équipe de recherche a développé d'autres composés benzamide, en particulier l'ICF15002 dont le potentiel théranostique a été étudié dans différents modèles précliniques syngéniques (B16BL6, tumeur pigmentée) et xénogéniques (A375 non pigmenté et SK-MEL-3 pigmenté) de mélanome. L'imagerie TEP après radiomarquage au fluor-18 a mis en évidence une accumulation rapide et spécifique du traceur uniquement au niveau des tumeurs pigmentées avec $14,33 \pm 2,11\%$ ID/g (pour % de la dose injectée par gramme) pour B16BL6 et $4,87 \pm 0,93\%$ ID/g pour SK-MEL. Aucune accumulation n'a été observée dans les tumeurs A375 ($1,65 \pm 0,29\%$ ID/g). Une fixation spécifique a été observée, en particulier au niveau des yeux mélanisés et de l'estomac chez le modèle syngénique B16BL6 (aucune fixation dans les yeux achromique, modèle

xénogénique). Un marquage important est aussi observé au niveau de la vessie en lien avec l'excrétion urinaire (**figure 41**) (Rbah-Vidal 2017).

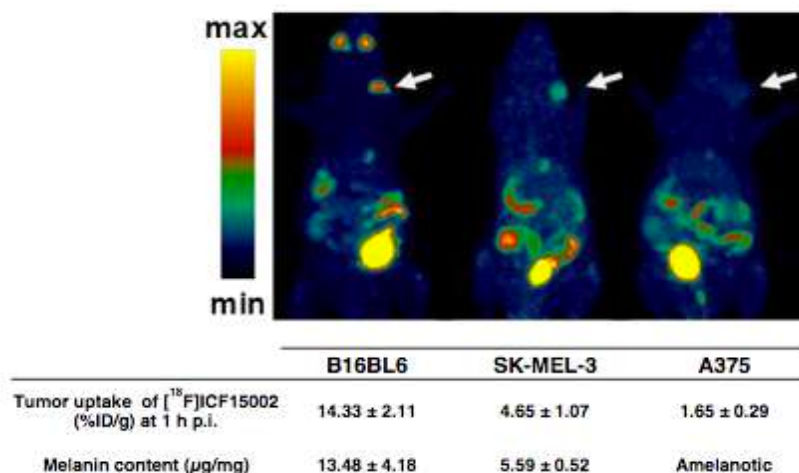


Figure 41 : Image TEP avec l'ICF15002 radiomarqué au fluor-18 dans différents modèles syngéniques ou xénogéniques de mélanome, pigmentés (B16F10 et SK-MEL) ou non pigmentés (A375M). (d'après Rbah-Vidal 2017).

Des caractéristiques comparables d'accumulation rapide dans la tumeur, de fixation au niveau des yeux et de l'estomac, ainsi que d'élimination ont été rapportées dans une autre étude préclinique, analysant le dérivé benzamide FEBZA, radiomarqué au fluor-18 dans différents modèles tumoraux dont le modèle de mélanome syngénique B16F1 (Garg 2017). Dans cette étude, une analyse de biodistribution a de plus montré que le FEBZA radiomarqué pouvait franchir la barrière hémato-encéphalique et pourrait donc permettre la détection des métastases cérébrales (Garg 2017).

2. Peptides ciblant MC1R

Dans une étude récente publiée par Zhang et *al.*, une imagerie de tumeurs de mélanome B16F10 a été obtenue en ciblant le récepteur MC1R exprimé par les mélanocytes et les cellules de mélanome, à l'aide d'analogues de l' α -MSH radiomarqués au gallium-68. Les images obtenues en TEP avec plusieurs analogues ont démontré une fixation à la tumeur mais également à la thyroïde, aux reins et à la vessie. Le meilleur rapport tumeur sur reins a été observé 48h après l'injection du traceur. La spécificité du marquage tumoral a pu être documentée par une expérience de compétition avec l'analogue froid. En effet, après co-injection du traceur et de 100 µg d'analogue non radiomarqué, le signal à la tumeur n'était plus détectable alors que celui aux reins avait augmenté (Zhang 2017).

3. Peptide ciblant VLA-4

L'étude préclinique de la RIV- β décrite en partie 3, explorait le potentiel thérapeutique du peptide LLP2A, ligand de haute affinité pour VLA-4, dans le modèle de mélanome syngénique B16F10 (Choi 2018). Cette même équipe avait précédemment utilisé ce même ligand radiomarqué avec du gallium-68 pour réaliser une étude de biodistribution ainsi qu'une imagerie TEP/CT des tumeurs de mélanome B16F10 (Beaino 2015). L'étude de la biodistribution faite 1h après l'injection du traceur, a révélé une accumulation dans la tumeur, la rate, le thymus, les os, les reins et les poumons. VLA-4 est exprimé sur tous les lymphocytes ce qui explique la fixation importante au niveau des organes lymphoïdes (Rose 2001). Le peptide radiomarqué est d'autre part éliminé rapidement au niveau des reins. Parallèlement, les images de TEP ont montré, une fixation avec un fort contraste au niveau de la tumeur, par rapport aux organes lymphoïdes. La vessie et les reins étaient intensément marqués, correspondant à l'excrétion du traceur ce qui corrélait les données de biodistribution au niveau rénal. Enfin les images TEP de certains animaux ont aussi permis de mettre en évidence des métastases au niveau des poumons, des os et des reins (Beaino 2015).

II. Immuno-TEP

L'immuno-TEP apparaît comme un outil majeur dans le diagnostic moléculaire à l'échelle du corps entier et donc dans la démarche de la médecine personnalisée (McCabe 2010 ; Boerman 2011 ; Marik 2011 ; Knowles 2012). Cette technique d'imagerie peut être utilisée en association avec la RIV, puisqu'elle permet de fournir des informations sur le ciblage de la tumeur, l'accumulation du radioimmunoconjugué dans les organes et des données dosimétriques qui peuvent permettre de calculer la dose thérapeutique à administrer. L'immuno-TEP peut également permettre d'étudier l'efficacité thérapeutique avant et après traitement.

Les paramètres influençant la qualité des images d'immuno-TEP sont globalement les mêmes que ceux qui influencent l'efficacité de la RIV puisque l'immuno-TEP utilise un AcM ou un fragment d'anticorps radiomarqué à un émetteur de positrons. Les principaux facteurs à prendre en considération pour obtenir une image en immuno-TEP sont (McCabe 2010) :

- l'efficacité du ciblage par l'AcM ou le fragment d'anticorps qui dépend de l'affinité pour l'antigène et du niveau d'expression de cet antigène sur les cellules tumorales
- La demi-vie de l'émetteur β^+ qui doit être adaptée au radiomarquage et à la cinétique du vecteur (période courte pour les vecteurs à cinétique rapide et inversement)
- la stabilité du radiomarquage, puisque la libération du radioisotope peut engendrer bruit fond et toxicité. Le bruit de fond peut notamment induire des faux positifs, dans le cas où le radioisotope libre a un tropisme qui coïncide avec une localisation préférentielle de métastases. (cuivre-64 tropisme pour le foie, zirconium-89 tropisme pour les os)

- l'énergie et le parcours du positron déterminent sa résolution

Les études pré-cliniques dans le mélanome commencent à se multiplier ces dernières années, avec en particulier le ciblage de PD-L1, PD-1 ou des lymphocytes T CD8⁺ avec l'objectif de pouvoir affiner la sélection des patients et prédire la réponse aux traitements dans le cadre des immunothérapies avec les ICI.

Deux études précliniques utilisant des AcM anti-PD-L1 radiomarqués avec le zirconium-89 dans le modèle syngénique de mélanome B16F10 ont démontré qu'au delà de pouvoir documenter l'expression de PD-L1 avec une bonne résolution et de façon non invasive au niveau de toute la tumeur et de son microenvironnement, l'immuno-TEP permettait de plus d'évaluer les variations d'expression de PD-L1 après traitement (Kikuchi 2017 ; Tuillet 2018). Ces résultats ont été validés *ex vivo* par biodistribution et cytométrie de flux. Ainsi dans l'étude de Kikuchi et *al.*, les animaux ont été greffés avec deux tumeurs, une au niveau du cou, l'autre au niveau du flanc droit et seule la tumeur au cou a été traitée par radiothérapie externe fractionnée. Chez ces souris, l'immuno-TEP a montré une augmentation significative du traceur au niveau de la tumeur traitée par rapport à la tumeur non irradiée (**figure 42**), en lien avec une augmentation de l'expression de PD-L1. Aucune augmentation de PD-L1 n'a été observée chez d'autres souris traitées par une immunothérapie anti-PD-1.

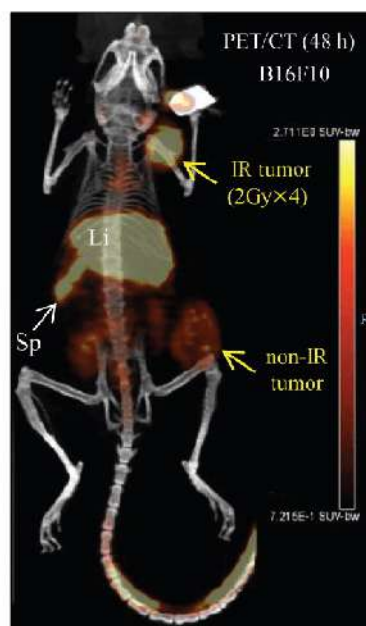


Figure 42 : Immuno-TEP/CT avec un AcM anti-PD-L1 radiomarqué au zirconium-89 d'une souris greffée avec 2 tumeurs de mélanome B16F10.

L'acquisition de l'image a été faite 48h après injection d'un AcM anti-PD-L1 murin. La tumeur au niveau du cou a été irradiée (IR tumor) et la tumeur au niveau du flanc n'a pas été traitée (non-IR tumor) (d'après Kikuchi 2017).

De même, certaines chimiothérapies peuvent moduler l'expression de PD-L1. En effet, Tuillet et *al.* ont obtenu des résultats comparables chez des souris traitées au paclitaxel, alors

qu'ils n'ont pas observé de changement avec la doxorubicine (Tuillet 2018).

Comme dans tous les travaux utilisant des AcM, des accumulations au niveau du foie et de la rate ont été observées dans ces deux études ainsi que dans les deux études décrites dans le paragraphe suivant. Cependant ces accumulations sont à moduler compte tenu de la faible quantité de radioimmunoconjugué injectée pour une immuno-PET et l'ensemble de ces résultats supporte fortement le transfert vers la clinique de cette modalité d'imagerie.

Le groupe du Pr. Gambhir a été le premier à analyser l'expression de PD-1 par immuno-PET afin de documenter l'infiltrat lymphocytaire tumoral (Natarajan 2015). Cette étude a été réalisée dans le modèle préclinique de mélanome syngénique B16F10 à l'aide d'un AcM anti-PD-1 radiomarqué au cuivre-64 et s'est principalement focalisée sur l'imagerie des lymphocytes Treg présents au sein des tumeurs. Plus récemment, ces auteurs ont publié une autre étude d'immuno-TEP, à l'aide du pembrolizumab radiomarqué au cuivre-64 ou au zirconium-89, dans un modèle préclinique de souris NSG humanisées développant une xéno greffe de mélanome humain A375 (Natarajan 2017). Après injection de PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) humains dans les animaux, la TEP a permis d'imager les lymphocytes T exprimant PD-1 ayant infiltrés les tumeurs de même que ceux ayant migrés au niveau de la rate. Cette étude montre qu'il est possible d'envisager d'utiliser une immuno-TEP anti-PD-1 pour identifier la présence de lymphocytes T cytotoxiques PD-1 chez les patients et sélectionner ceux pouvant tirer le meilleur bénéfice d'une immunothérapie anti-PD-1.

Les fragments d'anticorps à domaine unique ou nanobody sont aussi des vecteurs d'intérêt pour l'immuno-TEP. Dans ce cadre, une étude récente a démontré le potentiel d'un nanobody spécifique du CD8 pour l'immuno-TEP après traitement par immunothérapie (Rashidian 2017). Dans plusieurs modèles précliniques dont le mélanome B16, le nanobody anti-CD8, après radiomarquage avec le zirconium-89, a permis, d'une part de détecter les tumeurs via leur infiltrat lymphocytaire T CD8, et d'autre part de préciser la localisation de ces LT au sein des tumeurs (**figure 43**). En dehors de la tumeur, une accumulation du traceur a pu être observée dans les organes lymphoïdes : ganglions lymphatiques, rate et thymus, de même qu'au niveau des reins du fait de son élimination. Dans des conditions particulières d'immunothérapie anti-CTLA-4 entraînant intentionnellement des réponses anti-tumorales hétérogènes, ils ont pu de plus démontrer que cette approche d'immuno-PET permettait de distinguer les animaux répondeurs des non-répondeurs au traitement (Rashidian 2017). La possibilité d'obtenir de telles informations en clinique permettrait d'évaluer beaucoup plus rapidement la réponse au traitement, et d'orienter la prise en charge des patients.

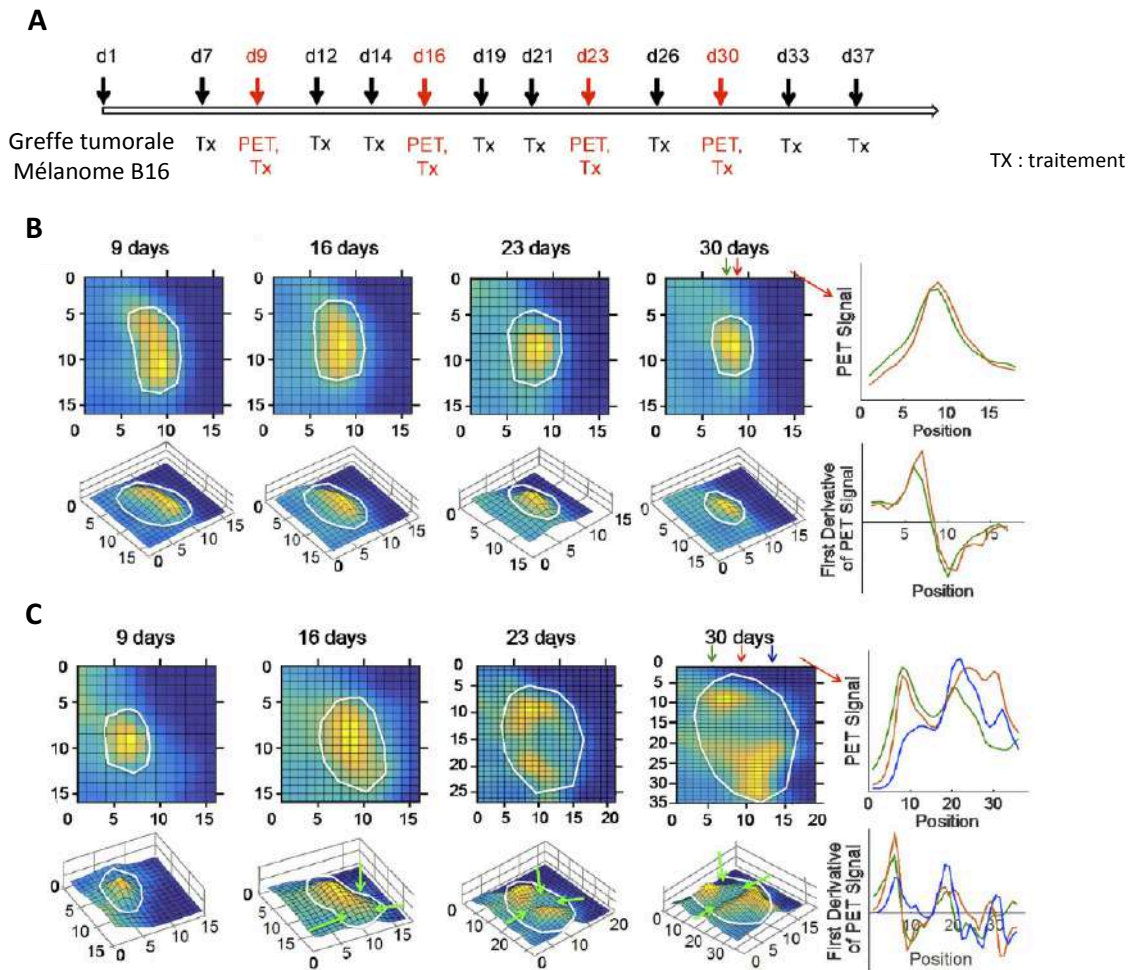


Figure 43 : Localisation des LT CD8⁺ au sein d'une tumeur de mélanome B16 après traitement avec un AcM anti-CTLA-4 par immuno-TEP/CT avec un nanobody anti-CD8 radiomarqué au zirconium-89.

A. Schéma de traitement et de suivi par TEP des animaux : le traitement par anti-CTLA-4 a été initié 7 jours après la greffe de la tumeur B16, le suivi par immuno-TEP/CT a eu lieu à 9, 16, 23 et 30 jours de croissance tumorale. Croissance tumorale chez une souris **B.** répondant fortement au traitement, **C.** répondant partiellement au traitement. Les tumeurs identifiées par le CT sont délimitées par une ligne blanche. Le signal TEP est représenté sous forme d'une carte thermique avec en dessous le graphe correspondant en 3D. A partir de 2 ou 3 colonnes définies par les flèches verticales, les intensités les plus faibles et les plus fortes sont intégrées et représentées sur la droite pour analyser la distribution des LT CD8⁺. La distribution des LT dans la tumeur répondeuse est apparue plus homogène. au contraire de la tumeur non répondeuse dans laquelle les LT CD8⁺ sont distribués de façon plus hétérogène avec une ou plusieurs zones présentant un signal très faible (d'après Rashidian 2017).

Objectifs de la thèse

Le haut potentiel métastatique du mélanome complexifie la prise en charge médicale du patient. Malgré l'évolution des traitements au cours de la dernière décennie, l'ensemble des résultats cliniques obtenus sont très limités, avec des réponses objectives allant jusqu'à 43 % pour les anticorps anti-PD-1. Ce qui signifie que 60% des patients ne répondent pas au traitement le plus efficace contre le mélanome. Ce qui amène à la recherche et au développement constant de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi des nouvelles voies de traitements ont été explorées. Parmi ces nouvelles voies, l'idée d'associer les effets cytotoxiques des rayonnements ionisants (radiothérapie) à la spécificité de molécule immunologique (l'immunothérapie) comme vecteur appelée **radiothérapie interne vectorisée (RIV)** a émergé. Dans le traitement du mélanome, les premiers essais thérapeutiques de RIV ciblaient la mélanine, un pigment intracellulaire, puis des RIV visant des antigènes de surface ont été développées. Récemment, Choi et *al.* démontrèrent l'efficacité thérapeutique de l'association d'une RIV ciblant un antigène de surface (ligand de VLA-4 radiomarqué au lutetium-177) et des ICI (anti-PD-L1 + anti-CTLA-4) (Choi 2018). A notre connaissance, à ce jour aucune donnée concernant le ciblage direct par la RIV d'immune check point n'est publiée. C'est dans cette optique que le premier objectif de mon projet de thèse a été de développer une RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 pour le traitement du mélanome, dans un modèle préclinique de xénogreffe de mélanome humain. Les résultats obtenus dans cette première partie feront l'objet d'un article en cours d'écriture et qui sera soumis début 2020 (annexe n°1)(objectif 1)

En complément de cette étude préclinique de la RIV- α , nous avons analysés *in vitro* les mécanismes associés aux effets thérapeutiques de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213, principalement l'immunogénicité des cellules de mélanomes utilisées dans le modèle *in vivo* (objectif 2).

Par ailleurs, notre équipe a démontré que l'association thérapeutique d'une RIV- α anti-CD138 radiomarqué au bismuth-213 et le transfert adoptif de LT CD8⁺ cytotoxiques dans le traitement d'un myélome multiple syngénique potentialisait les effets thérapeutiques anti-tumoraux des monothérapies (Ménager 2015). Ainsi dans le prolongement de l'objectif 1, nous avons évalué dans le même modèle préclinique de mélanome humain, en collaboration avec l'équipe 3 du CRCINA, le potentiel d'une association thérapeutique. La RIV- α anti-PD-L1 radiomarqué au bismuth-213 a donc été combinée à une immunothérapie basée sur le transfert adoptif de LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de l'antigène de mélanome Melan-A /MART-1 KO pour le récepteur PD-1 après modification génétique (objectif 3).

Pour finir, la visualisation *in vivo* le développement tumoral, la réponse aux traitements

ainsi que l'évolution de l'expression de PD-L1 au niveau de la tumeur, nous avons dans le quatrième objectif initié le développement d'une immuno-TEP/CT anti-PD-L1 radiomarqué au zirconium-89, dans le même modèle préclinique de mélanome humain (objectif 4).

J'ai réalisé mon projet de thèse au sein des équipes 13 et 1 du CRCINA dans le cadre du programme LabEx IGO. Pendant ma thèse, j'ai également contribué à d'autres projets, dont un qui s'est concrétisé par une revue (revue soumise, annexe°2).

Matériels et méthodes

I. Modèle préclinique de xénogreffe de mélanome humain

1. Lignées cellulaires de mélanome humain

La lignée parentale M113^{WT} de mélanome humain et la lignée M113^{PD-L1+}, transfectée pour exprimer stablement la protéine PD-L1 ont été obtenues auprès du Dr. Nathalie Labarrière (équipe 3 du CRCINA). Les 2 lignées sont cultivées en milieu complet : RPMI-1640 (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Biosera), 2 mM de glutamine (Gibco), 100 U/mL de pénicilline (Gibco) et 100 µg/mL de streptomycine. Afin d'assurer une stabilité de l'expression de PD-L1, la lignée M113^{PD-L1+} subit à chaque passage une pression de sélection en ajoutant 0,8 µg/mL de généticine (G418, Sigma) dans le milieu. Les cellules sont ensuite incubées dans une enceinte à 37°C, 5% de CO₂ et 85% d'humidité.

Une banque de travail de ces lignées a été constituée afin d'utiliser les mêmes cellules pour l'ensemble des expériences *in vitro* et *in vivo*. Dix jours avant toute expérience, un cryotube de cellules est décongelé et amplifié.

2. Animaux et xénogreffe

Les xénogreffes de mélanome humain sont réalisées sur des souris femelles NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) âgées de 7 à 10 semaines. Les NSG sont dépourvues de tout système immunitaire adaptatif et inné permettant ainsi la croissance de tumeurs humaines. Elles proviennent de Charles River Laboratories (L'arbresle, France) et de l'élevage de l'animalerie UTE (IRS-UN, Université de Nantes, numéro d'accord C44278). Toutes les expériences réalisées ont été validées par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et par le comité d'éthique (APAFIS n° 7693, 7823, 7915).

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} sont inoculées aux souris NSG en sous-cutané au niveau du flanc droit à raison de 1.10^6 cellules dans 100µL de PBS. Les greffes sont réalisées 7 jours avant toute expérience *in vivo*.

II. Anticorps anti-PD-L1 humain

1. Détermination de l'affinité de l'anticorps

L'affinité de l'AcM anti-PD-L1 humain (clone 29E.2A3, Biolegend) nu ou radiomarqué au

bismuth-213 a été déterminée par cytométrie en flux sur 2.10^5 cellules M113^{PD-L1+} avec une gamme de concentrations allant de 10 µg/mL à 50 µg/mL d'AcM dilué en PBS-BSA 0,5%. Les cellules sont incubées avec l'AcM (n=2 par concentration) pendant 1h à 4°C. Après 2 lavages avec du milieu complet, les cellules sont incubées avec un anticorps polyclonal secondaire anti-IgG souris-PE (Jackson ImmunoResearch) pendant 1h à 4°C. Après 3 lavages avec du milieu complet, les cellules sont reprises en PBS et analysées sur un cytomètre de flux FACSCanto II (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

2. Évaluation de l'expression de PD-L1 sur les lignées cellulaires

Avant chaque expérience, l'expression de PD-L1 est évaluée sur les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} par cytométrie en flux, comme décrit ci-dessus avec une concentration saturante de 10 µg/mL d'AcM anti-PD-L1 humain-PE (clone 29E.2A3, Biolegend) ou d'isotype contrôle IgG2b, κ souris-PE (clone MPC-11 Biolegend). Les cellules sont analysées sur un cytomètre de flux FACSCanto II (BD Biosciences). Les résultats sont analysés avec le logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

3. Radiomarquage au bismuth-213

L'AcM anti-PD-L1 humain (clone 29E.2A3, GoInVivo™ Purified anti-human CD274 Antibody, Biolegend) et l'isotype contrôle (clone MPC-11, GoInVivo™ Purified Mouse IgG2bκ, Biolegend) sont radiomarqués au bismuth-213 selon la méthode publiée par Chérel et collaborateurs en 2013 (Chérel 2013).

Les immunoglobulines sont préalablement modifiées par couplage au chélate SCN-CHX-A''-DTPA (Macrocyclics). Brièvement, les immunoglobulines sont incubées avec 20 équivalents (mol / mol) de CHX-A''-DTPA dans un tampon carbonate (0,05 M, pH 8,7) et après une nuit d'incubation à température ambiante elles sont purifiées par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) sur une colonne Sephadex G200 (Amersham Biosciences).

Pour le radiomarquage, le bismuth-213 est élué à partir d'un générateur d'actinium-225 (Institute for Transuranium Elements, Allemagne) avec 1 mL d'une solution contenant 500 µL de 0,1 M de HCl et 500 µL de 0,1 M de NaI. Il est ensuite incubé avec 100 µg d'immunoglobuline couplé au chélate dans un tampon acétate de sodium 4M et 20% d'acide ascorbique pendant 10 min à 37 °C. S'en suit une purification par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne PD-10 (GE Healthcare). La pureté radiochimique est analysée par chromatographie en couche mince instantanée-Silica-Gel (ITLC-SG). Les puretés obtenues sont supérieures à 96%.

III. Marquages immunohistochimiques

Les tumeurs M113^{PD-L1+} et M113^{WT} sont récupérées 7 jours après la greffe, fixées avec du formol tamponné à 10% et incluses dans de la paraffine. Des sections de 3 µm sont réalisées puis déparaffinées dans du xylène et hydratées avec des bain d'alcools décroissants (100°, 90°, 70°, 50° et 30°) et pour finir avec un bain d'H₂O. Les échantillons sont marqués soit par de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) pour une coloration histochemique soit marqués par immunohistochimie (IHC) avec un anticorps anti-PD-L1 ou anti-Ki67 humain. Pour l'IHC, les étapes de démasquage antigénique à pH9 ou pH6 et d'élimination des peroxydases endogènes sont réalisées selon le protocole du fournisseur (Dako, EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH).

Pour l'analyse de l'expression de PD-L1 : les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-PD-L1 humain de lapin (Cell signaling Technology, #13684) ou un isotype contrôle (R&D Systems, #AB-105C) (8,74 µg / mL).

Pour l'analyse de la prolifération (Ki67) : les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Ki67 humain de souris (Dako, #M7240) ou un isotype contrôle (BD pharmingen, #557273) (0,5 µg / mL).

Un marquage avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (péroxydase de raifort) est effectué. Pour la révélation du marquage une incubation avec le substrats chromogène DAB est effectué ainsi qu'une contre-coloration à l'hématoxyline. Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un microscope scanner de lame (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics) et les images sont traitées à l'aide du logiciel NDP.view2 Viewing (Hamamatsu Photonics).

IV. Immunothérapie anti-PD-L1 humain

Des souris xénotreffées en sous-cutanée avec 1.10^6 cellules M113^{PD-L1+} sont traitées 7 jours après la greffe tumorale avec une injection en intraveineuse (*i.v*) dans la veine caudale de 20 µg ou 100 µg d'AcM anti-PD-L1 humain nu (n=10 et 9 respectivement) (clone 29E.2A3, GoInVivo™ Purified anti-human CD274 Antibody, Biolegend). Les animaux témoins reçoivent dans les mêmes conditions du PBS.

V. Escalade de doses

Des NSG non greffées (naïves) ont reçu par injection intraveineuse dans la veine caudale, une dose unique d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 à 125, 165, 205, 335 et 395 kBq/g (n = 3/dose). Les souris sont suivies pendant 100 jours, sacrifiées lorsque les points limites de souffrance animale sont atteints (diminution du poids initial de 20%, critères morphologiques et comportementaux tels que la prostration). Cette expérience a été autorisée par le ministère et le Comité d'Ethique (licence APAFIS n ° 7915). Cette expérience a permis de déterminer la dose utilisable en thérapie la DMT (dose maximale tolérée) et la dose limitante toxique (DLT).

VI. Radiothérapie interne vectorisée

Les souris xéno greffées en sous-cutanée avec 1.10^6 cellules M113^{PD-L1+} sont traitées 7 jours après greffe tumorale avec 125 ou 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain ou d'isotype contrôle IgG2b, κ souris (n=10) radiomarqués au ²¹³Bi, les animaux témoins sont injectés avec du PBS.

L'expérience contrôle de la RIV-α a été réalisée avec des animaux xéno greffés avec la lignée M113^{WT}, qui ont reçu 7 jours après greffe tumorale une dose à 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain ou d'isotype control IgG2b, κ souris radiomarqués au ²¹³Bi et les souris contrôles du PBS. L'injection du RIC se fait en intraveineuse par la veine caudale. Ces expériences ont été autorisées par le ministère et le Comité d'Ethique (licence APAFIS n ° 7823) (**figure 44**).

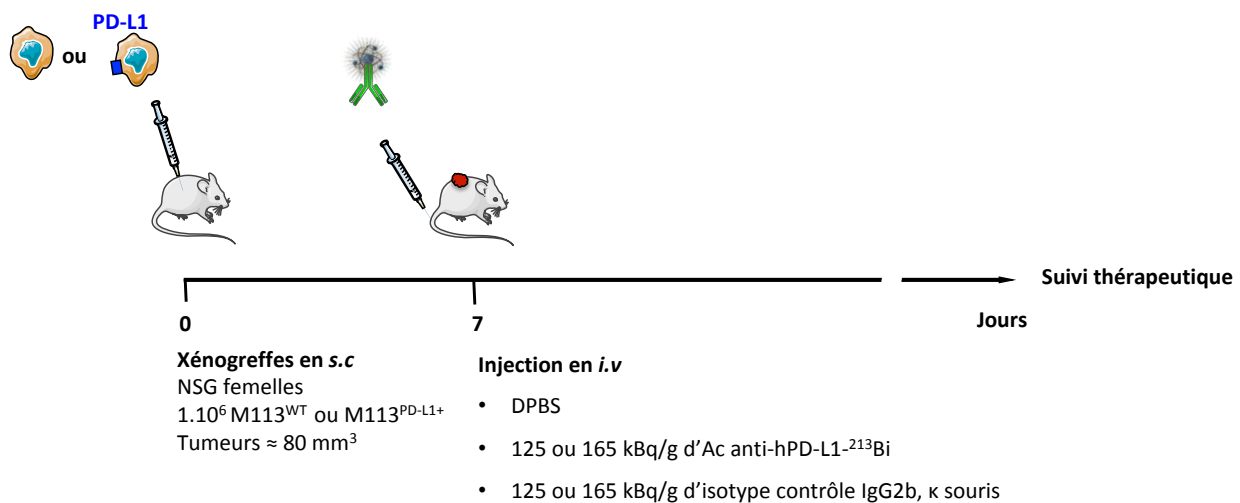


Figure 44 : Schéma expérimental de la RIVα anti-PD-L1 humain.

VII. Association thérapeutique

Les LT CD8⁺ cytotoxiques anti MelanA/MART-1 WT (exprimant le co-récepteur inhibiteur PD-1, clone Ne4) ou PD-1 KO (n'expriment pas PD-1, clone KO6), ont été générés par l'équipe 3 (Nathalie Labarrière et Lucine Marotte) du CRCINA.

Les NSG xéno greffées en sous-cutanée avec 1.10^6 cellule de mélanome M113^{PD-L1+} sont traitées 7 jours après la greffe tumorale par une injection en intraveineuse par la veine caudale d'une dose unique d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 à 125 kBq/g. Cette injection de radiopharmaceutique est suivie de 3 injections en intraveineuse dans le sinus rétro-orbitale à 8, 15 et 22 jours après la greffe tumorale de 5.10^6 de LT WT (n= 8) ou de 5.10^6 de LT PD-1 KO (n=9). Le changement de lieu d'injection des LT est lié aux dommages dans la veine caudale créée par la répétitions des injections. Les animaux témoins reçoivent dans les mêmes conditions du PBS (n=10), des LT WT (n=8), des LT PD-1 KO (n=10) ou l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au

bismuth-213 à 125 kBq/g (n=9). Un suivi thérapeutique est effectué. Cette expérience a été autorisée par le ministère et le Comité d'Ethique (licence APAFIS n ° 7823) (**figure 45**).

Xéno greffes en s.c
 NSG femelles
 1.10⁶ M113^{PD-L1+}
 Tumeurs ≈ 80 mm³

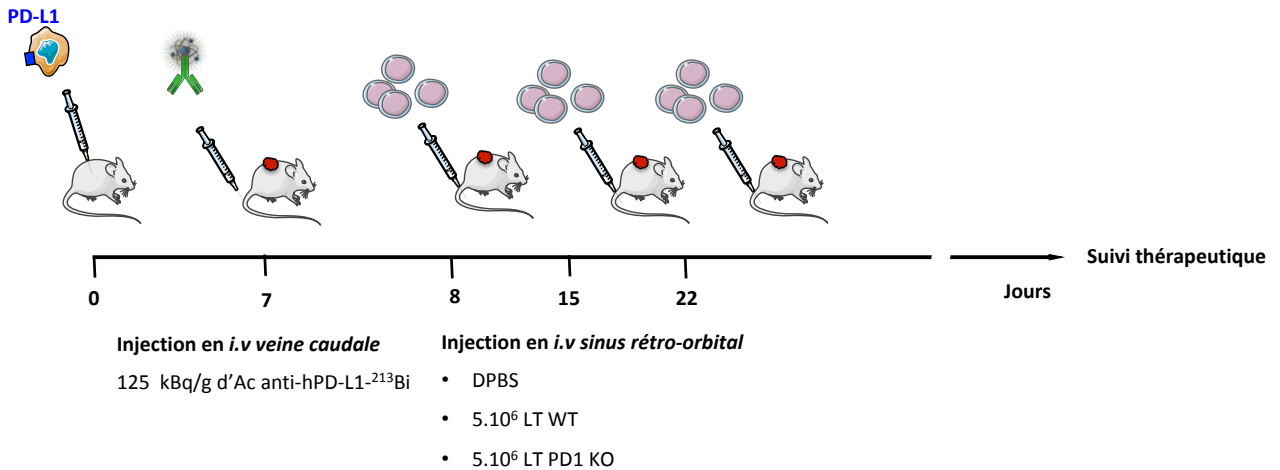


Figure 45 : Schéma expérimental de l'association thérapeutique RITα anti-PD-L1 humain-²¹³Bi + LT CD8⁺ cytotoxiques anti-MelanA/MART-1 WT ou PD-1 KO.

VIII. Suivi thérapeutique

1. Survie, poids et croissance tumorale

La survie des animaux, le poids et la croissance tumorale ont été contrôlés trois fois par semaine. Le volume tumoral a été déterminé par des mesures de la largeur et la longueur des tumeurs en utilisant un pied à coulisse. Les volumes tumoraux ont été calculés à l'aide de l'équation suivante :

$$V_{\text{tumeur}} = \frac{(L \times l^2)}{2}$$

ou L est la longueur et l la largeur de la tumeur, en millimètres.

Les souris sont sacrifiées lorsque les tumeurs ont atteint 2 000 mm³ ou si les points limites de souffrance animale sont atteints (diminution du poids initial de 20%, critères morphologiques et comportementaux tels que la prostration).

2. Toxicité hématologique

Les globules rouges et les plaquettes sont énumérés à l'aide d'un automate d'hématologie (Celltac-alpha, Nihon Kohden) 7 jours, 28 ou 34 jours après la xéno greffe et au moment du sacrifice. Le sang est prélevé au sinus rétro-orbitaire sur souris vigile ou dans la veine cave lors du sacrifice sur souris anesthésiées et récupéré dans un tube EDTA K3E (KABE Labortechnik).

3. Toxicité hépatique, médullaire et rénale

Le plasma est isolé à partir des échantillons de sang en le centrifugeant à 2500 rpm pendant 10 min. Les biomarqueurs de toxicité qui ont été analysés sont les suivants : ALAT et ASAT pour la toxicité hépatique, urée pour la toxicité rénale et le FLT3-Ligand pour la toxicité médullaire. La concentration plasmatique de FLT3-Ligand a été quantifiée par un test ELISA (Bio-Techne). Quant à l'ASAT, l'ALAT et l'urée leur concentration plasmatique a été analysée par un dosage colorimétrique (BiooS Scientific et BioAssay system). Le foie, les reins et la rate ont été prélevés lors du sacrifice, fixés avec du formol tamponné à 10% et inclus dans de la paraffine afin de réaliser des marquages H&E sur coupe.

IX. Biodistribution de l'Ac radiomarqué

La distribution de l'AcM anti-PD-L1 humain aux organes a été déterminée dix jours après la xéno greffe de 1.10^6 cellules M113^{PD-L1+} en sous-cutanée, en utilisant l'anticorps anti-PD-L1 humain couplé au CHX-A"-DTPA (le même qu'en thérapie RIV) radio-marqué à l'indium-111.

Pour le radiomarquage, 2,2 MBq de chlorure d'indium-111 (InCl_3 , Curium pharma, Mallinckrodt) est incubé avec 150 μg d'anticorps anti-PD-L1 humain couplé au chélate CHX-A"-DTPA dans un tampon d'acétate d'ammonium (0,2 M, pH 6,0) pendant 30 min à 40° C. S'en suit une purification par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne PD-10 (GE Healthcare). La pureté radiochimique est analysée par ITLC-SG en utilisant un tampon citrate de sodium pH 4,5 à 0,1M comme solvant. La pureté obtenue était de 99,8%.

Les souris ont reçu par voie intraveineuse 63 kBq (7 μg) d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué à l'indium-111. Les animaux ont été sacrifiés à 5, 15, 30, 45 min, 1h30, 2h15 après l'injection (n = 3/temps), temps compatible avec la période du bismuth-213. Les organes ont été collectés, pesés (tumeur, foie, reins, rate, poumons, cœur, os longs, os plats, intestin, peau, estomac, muscle et cerveau) et la radioactivité a été comptée à l'aide d'un compteur (Wizard 1480, PerkinElmer, France). Pour tenir compte de la décroissance, une dose standard (triplicata) a également été comptée. Les résultats ont été calculés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (ID/g).

X. Immuno-TEP anti-PD-L1

Des souris NSG sont xenogreffées 7 jours (n=3) et 15 jours (n=3) avant l'imagerie immuno-TEP/CT en sous-cutanée avec 1.10^6 cellules de mélanome M113^{PD-L1+}. Elles reçoivent ainsi que la souris contrôle en *i.v* une dose unique de 2,5 MBq d'AcM anti-PD-L1 humain couplé à la DFO (desferrioxamine) et radiomarké au zirconium-89.

Pour le marquage au ⁸⁹Zr, sous agitation constante, 6,5 MBq de ⁸⁹Zr-oxalate ont été ajustés à pH 7,2. Puis, 77 µL de Ac anti-PD-L1 humain-DFO (1,43 mg / ml) ont été ajoutés et le pH a été réajusté à 7,2 en utilisant 300 µL de tampon HEPES (0,5 M). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 60 min. La pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie sur couche mince ITLC-SG en utilisant un tampon citrate (pH 4,5; 0,1 M) et était de 76%. L'Ac radiomarké au ⁸⁹Zr a été ensuite purifié par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne PD-10 (GE Healthcare) éluée avec du DPBS. La pureté radiochimique a été évaluée par ITLC-SG et était de 99,6 %, l'activité obtenue est de 30,8 MBq et l'activité spécifique de 184 MBq/mg

Les images TEP/CT sont réalisées à 24h, 48h et 72h après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarké au ⁸⁹Zr avec une microTEP/CT Inveon (Siemens Preclinical Solutions). L'analyse des images a été effectuée avec le logiciel Inveon Research Workplace et des images de coupes coronales ont été obtenues.

XI. Analyse des effets radiobiologiques

1. Prolifération cellulaire : marquage au VPD450

Les lignées M113^{WT} et M113^{PD-L1+} sont marquées avec 1µM de VPD450 dans du PBS (BD Horizon) pendant 15 min à 37 ° C (bain-marie) à l'obscurité. Après deux étapes de lavage avec du PBS, les cellules ont été remises en culture en plaque 6 puits à raison de 4.10^5 cellules dans 1 mL de milieu complet par puits 3h avant l'irradiation, afin que les cellules adhèrent. Elles sont ensuite irradiées avec 0 ; 46,25 ; 92,5 ; 185 ; 370 ; 740 ; 1480 ou 2960 kBq/mL d'Ac anti-PD-L1 humain radiomarké au bismuth-213. Les cellules non irradiées contrôles ont été cultivées en parallèle. À 24h, 48h et 72h les cellules sont récoltées et un marquage avec 5 µL le 7AAD est effectué 15 min à température ambiante dans l'obscurité. L'arrêt du marquage s'effectue par l'ajout de 400µL de PBS. Après deux lavages en PBS-BSA 0,5%, les cellules sont resuspendues dans 500 µL de PFA 1%. Les cellules sont analysées sur un cytomètre en flux FACSCanto II (BD Biosciences) et les événements sont analysés avec le logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

2. Cassure double brin : marquage de l' γ H2AX

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} ont été irradiées avec 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. L'analyse de la formation de cassures doubles brins est réalisée à 15 min, 30min, 1h, 2h et 6h après l'irradiation (n=3/lignées/temps). Au temps donné, les cellules sont fixées avec 1% de PFA (EMS, Washington, PA, USA) à 37°C pendant 10 min, puis lavées trois fois avec du PBS-BSA 0,5% sur glace. Par la suite une perméabilisation et congélation à -20°C des cellules sont effectuées avec 500 μ L de méthanol 90% dilué dans du PBS-BSA 0,5% refroidie préalablement à -20°C. Le marquage est réalisé avec un Ac anti- γ H2AX-Alexa Fluor 488 ou l'isotype contrôle Mouse IgG1, κ -AF488 (Biolegend) dans du PBS-BSA 0,5% pendant 1 h à 4 ° C. Après deux lavages avec du PBS-BSA 0,5%, l'analyse par cytométrie en flux a été effectuée, sur un FACSCanto II (BD Biosciences) et les événements sont analysés avec le logiciel FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

3. Apoptose et nécrose : marquage de l'Annexine V/PI

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} sont irradiées avec 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. L'induction de l'apoptose et nécrose sont étudiées 24h, 48h et 72h après l'irradiation. Les cellules non irradiées et les cellules en culture avec l'AcM anti-PD-L1 humain nu sont étudiées en parallèle (n=2/lignée/condition/temps). Le marquage est réalisé avec un Ac anti-Annexine-APC et PI (iodure de propidium) selon le protocole du fournisseur (BD Annexine V-APC Apoptosis detection kit). Brièvement, les cellules sont resuspendues dans 100 μ L de tampon de liaison 1X (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) 140 mM NaCl, 2mM CaCl₂), et transférées en plaque 96 puits à fond V. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante avec l'Annexin-V-APC et l'Iodure de Propidium (PI). L'arrêt du marquage s'effectue en rajoutant 400 μ L de tampon de liaison 1X. Après deux lavage en PBS-BSA 0,5%, les cellules sont resuspendues dans 500 μ L de PFA 1% jusqu'à la lecture au cytomètre de flux.

4. Quantification de HMGB1, IFN β et CXCL10

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} ont été irradiées avec 0 ; 92,5 ; 185 et 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. L'analyse a été effectuée 24h, 48h et 72h après l'irradiation (n=3/lignées/dose/temps). Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 1000g, 20 min à 4°C afin d'éliminer les cellules et les débris cellulaires. Le dosage de ces protéines a été effectué par test ELISA selon les protocoles du fournisseur (Biotechne) en duplicata pour chaque n de chaque dose et chaque temps.

XI. Tests statistiques

Les données de survie des animaux sont représentées par des courbes de survie de Kaplan-Meier, elles sont analysées et comparées par le test log-rank. Les courbes de croissances tumorales sont analysées par un test ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. Les résultats des toxicités sont analysés avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak. Les valeurs p inférieures ou égales à 0,05 sont considérées comme significatives. L'analyse des effets radiobiologiques s'effectue par des tests Mann Whitney ou un test ANOVA à 2 facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Tukey. Ces analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel de Prism (GraphPad Software Inc.).

Résultats

Chapitre I : RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans le traitement du mélanome humain

I. Expression de PD-L1 *in vitro* et *ex vivo*

1. Analyse *in vitro* de l'expression de PD-L1 sur les lignées de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT}

Afin d'évaluer *in vitro* l'expression de PD-L1 sur les lignées M113^{WT} et M113^{PD-L1+} une analyse par cytométrie en flux a été effectuée, en présence d'une concentration saturante d'AcM anti-PD-L1 humain couplé à la phycoérythrine (PE) ou de l'isotype contrôle IgG2b, κ souris-PE.

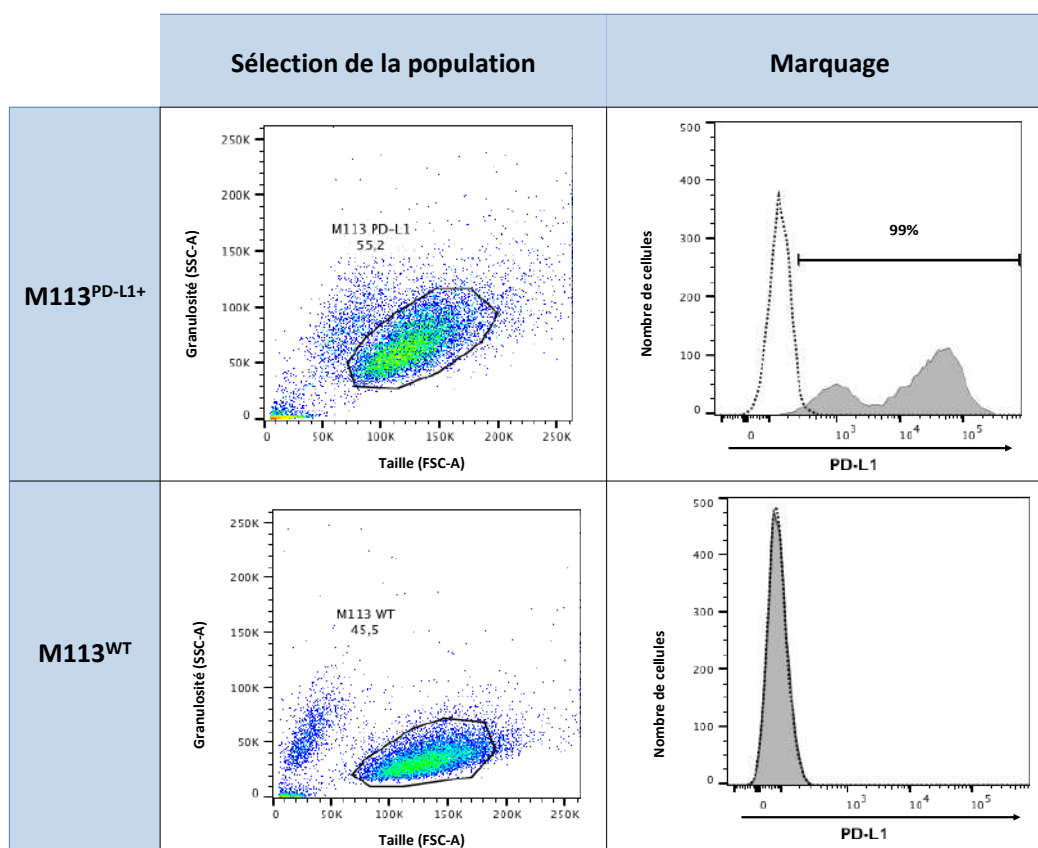


Figure 46 : Expression *in vitro* de PD-L1 sur les lignées cellulaires de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT}.

Le marquage de cytométrie en flux des cellules M113^{PD-L1+} et M113^{WT} a été effectué avec une concentration saturante de 10 μ g/mL de l'AcM anti-PD-L1 humain-PE (courbe grise) ou d'isotype contrôle IgG2b, κ souris-PE (courbe en pointillés). Pour l'analyse les cellules vivantes sont sélectionnées et le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence est représenté. L'acquisition a été faite avec le cytomètre BD FACSCantoIITM system.

Nous pouvons constater que 99% de la lignée M113^{PD-L1+} exprime stablement PD-L1 contrairement à la lignée parentale M113^{WT}. Cependant, l'expression de PD-L1 sur M113^{PD-L1+} est hétérogène, 75% des cellules l'expriment fortement contre 25% qui l'expriment faiblement (**figure 46**).

2. Analyse *ex vivo* de l'expression de PD-L1 sur les tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT}

Dans les souris NSG, les tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT} atteignent un volume de l'ordre de 80 mm³ au 7^{ème} jour après la greffe en sous-cutanée au niveau du flanc. Ce volume tumoral semblait adapté aux études de thérapie par RIV- α envisagées dans ce projet. Après avoir vérifié *in vitro* l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales, nous avons aussi contrôlé cette expression *ex vivo* sur des tumeurs M113^{PD-L1+} et M113^{WT} à 7 jours après la greffe. L'analyse par un marquage immunohistochimique a ainsi permis de confirmer que seules les tumeurs M113^{PD-L1+} expriment PD-L1, contrairement aux tumeurs M113^{WT} (**figure 47**). Aucun marquage avec l'isotype contrôle n'est observé, confirmant la spécificité du marquage anti-PD-L1 humain sur les coupes de tumeurs M113^{PD-L1+}.

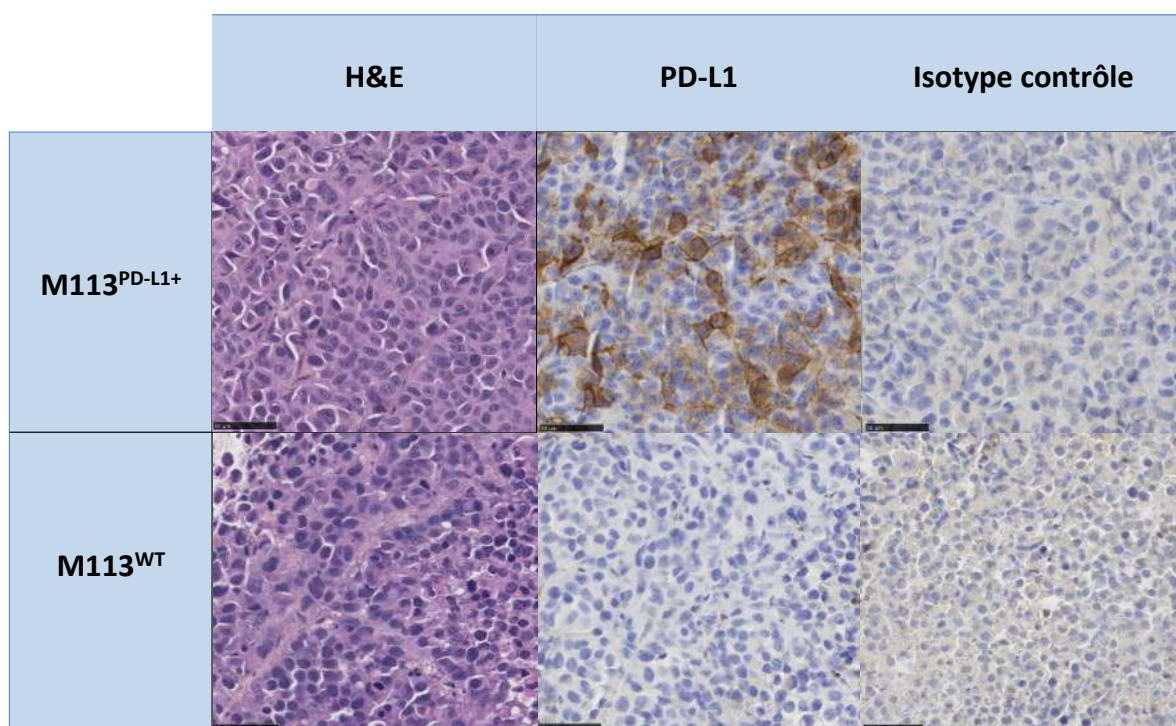


Figure 47 : Expression *ex vivo* de PD-L1 sur les tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT}.

Les marquages H&E et immunohistochimique avec un AcM anti-PD-L1 humain ou un isotype contrôle ont été réalisés sur des coupes paraffinées de tumeur de M113^{PD-L1+} et M113^{WT} 7 jours après la xéno greffe. Les images ont été obtenues avec un microscope scanner de lame (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics) avec un grossissement x40. La barre d'échelle représente 50 μ m. Pour chaque type de tumeur, les marquages sont représentatifs de 4 expériences séparées.

Ces résultats démontrent que la lignée cellulaire M113^{PD-L1+} exprime bien PD-L1 et peut être utilisée comme cible tumorale. Tandis que la lignée M113^{WT} qui n'exprime pas PD-L1 peut être utilisée comme contrôle dans le développement d'une RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.

II. Analyse *ex vivo* de la prolifération des tumeurs de mélanome

Afin de s'assurer que les cellules tumorales sont bien en prolifération au 7^{ème} jour après la xélogreffe, un marquage immunohistochimique Ki67 a été réalisé sur des coupes de tumeurs M113^{WT} et M113^{PD-L1+}. Ce marquage démontre que les cellules dans les deux types de tumeurs sont effectivement en prolifération au moment où la RIV sera réalisée (**figure 48**). L'isotype contrôle démontre que le marquage Ki67 est bien spécifique. Enfin, le marquage histologique H&E démontre la présence d'une zone nécrotique au centre de la tumeur M113^{WT}, nécroses qui apparaissent fréquemment au cours du développement des tumeurs dans ce modèle préclinique (**figure 48**).

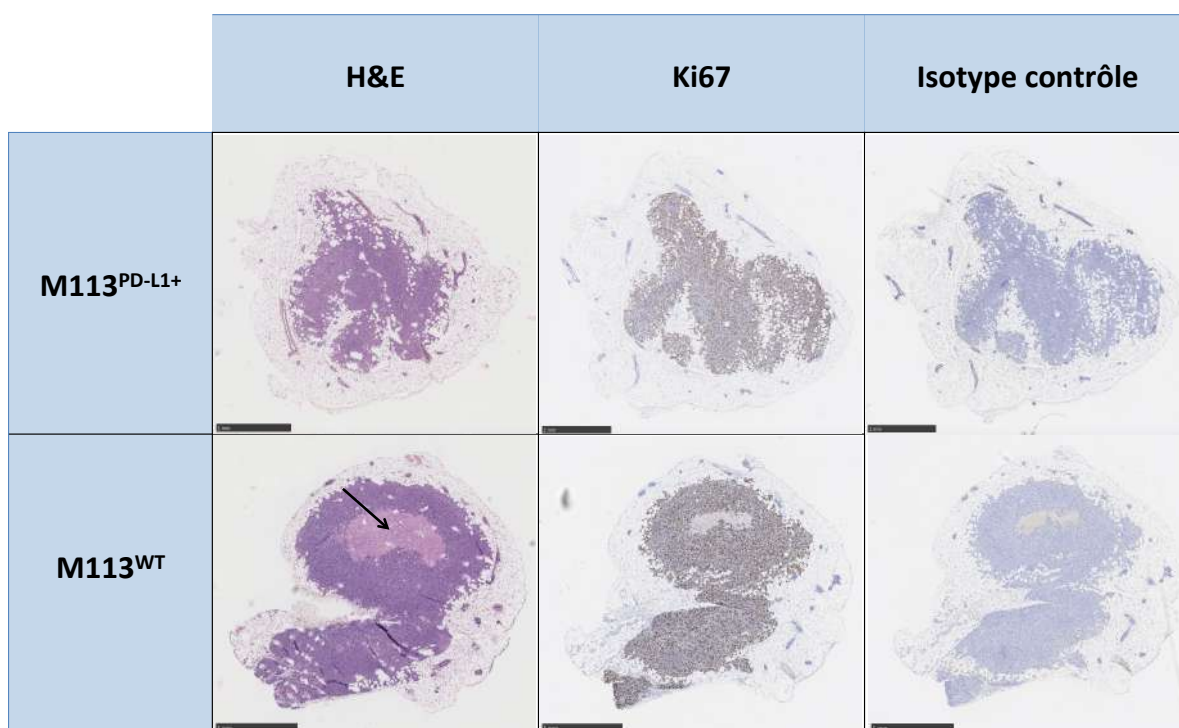


Figure 48 : Prolifération cellulaire au sein des tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT}.

Les marquages H&E et immunohistochimique avec un anticorps anti-Ki67 et un isotype contrôle ont été effectués sur des coupes paraffinées de tumeurs M113^{PD-L1+} et M113^{WT} 7 jours après la xélogreffe. La flèche indique une zone nécrotique sur la tumeur M113^{WT}. Les images ont été obtenues avec un microscope scanner de lame (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics) avec un grossissement x2,5. La barre d'échelle représente 1mm. Pour chaque type de tumeur, les marquages sont représentatifs de 4 expériences séparées.

III. Détermination de l'affinité de l'AcM anti-PD-L1 humain

Les affinités de l'AcM anti-PD-L1 humain nu et après radiomarquage au bismuth-213 ont été déterminées afin de s'assurer d'une part que cet AcM avait une affinité de base suffisante pour le projet, et d'autre part documenter dans quelle mesure le couplage et le radiomarquage pouvaient altérer l'affinité pour l'antigène PD-L1. Les constantes de dissociation (K_d) ont été évaluées par une analyse en cytométrie en flux sur la lignée M113^{PD-L1+}, la lignée M113^{WT} étant utilisée en contrôle. La représentation de la médiane de fluorescence en fonction de la concentration de l'AcM (en nM) permet la représentation des courbes de saturation. La constante de dissociation pour l'AcM anti-PD-L1 humain nu et l'AcM anti-PD-L1 humain après radiomarquage au bismuth-213 sont respectivement de $6,5 \cdot 10^{-9}$ M et $2 \cdot 10^{-9}$ M. Une légère baisse de l'affinité de l'AcM est observée après radiomarquage, par rapport à l'AcM nu (**figure 49**). Cependant le K_d de l'AcM nu ou après radiomarquage au bismuth-213 restent dans la gamme du nanomolaire, ces anticorps sont donc très affins pour PD-L1.

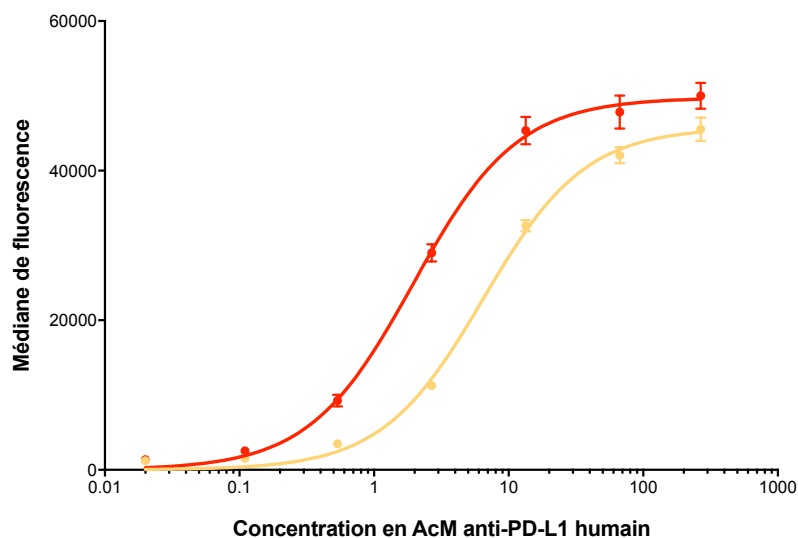


Figure 49 : Analyse de l'affinité de liaison de l'AcM anti-PD-L1 humain nu ou radiomarqué au bismuth-213 sur les cellules M113^{PD-L1+}.

Médianes de fluorescence du marquage de la lignée M113^{PD-L1+} avec des concentrations croissantes d'AcM anti-PD-L1 humain nu (courbe rouge) ou radiomarqué au bismuth-213 (courbe jaune). $n=2$ pour chaque condition et chaque concentration. Pour l'analyse les cellules vivantes sont sélectionnées. L'acquisition a été faite avec le cytomètre BD FACS CantollTM system. Les barres d'erreurs représentent l'écart type des médianes.

IV. Biodistribution de l'Ac radiomarqué

Une analyse de la distribution tissulaire de l'Ac anti-PD-L1 humain a été réalisée. Pour cela, 10 jours (afin d'obtenir une masse tumorale détectable par la balance de précision) après la xénogreffe de la lignée de mélanome humain M113^{PD-L1+}, les animaux ont reçu une injection en

intraveineuse de 63 kBq d'Ac radiomarqué à l'indium-111. Sa demi-vie de 2,8 jours nous a permis d'analyser des temps plus longs (périodes) que ceux analysés avec le bismuth-213. L'indium-111 est un radioélément plus facilement disponible que le bismuth-213 et se fixe au même chélate que ce dernier, qui est le CHX''DTPA. Les animaux ont été sacrifiés à différentes périodes correspondant à celle du bismuth-213 (radio-isotope utilisé en RIV). Les organes ont été récupérés et pesés afin de compter la radioactivité émise.

Les résultats présentés dans la **figure 50** correspondent au pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (%ID/g).

Le pourcentage de la dose injectée par gramme aux poumons, au cœur et au foie baisse au cours du temps dès 5 minutes mais reste relativement élevé et suit la cinétique du sang. Ces résultats indiquent un passage non spécifique de l'Ac radiomarqué via la circulation sanguine. Cependant une absorption très élevée est observée à la rate dès 5 min, représentant $27,6 \pm 8,2$ % de la dose injectée. Concernant, la dose aux reins (8,6 % ID/g), os plats et os long est constante et importante au cours du temps alors qu'elle est faible au niveau de l'intestin, de l'estomac, du muscle, de la peau ainsi qu'au cerveau.

Cinq minutes après l'injection, $1,12 \pm 0,25$ % ID/g est détecté à la tumeur avec une augmentation de la dose au cours du temps jusqu'à atteindre $2,6 \pm 0,5$ % ID/g à 2h15, ce qui démontre une fixation spécifique de l'Ac radiomarqué.

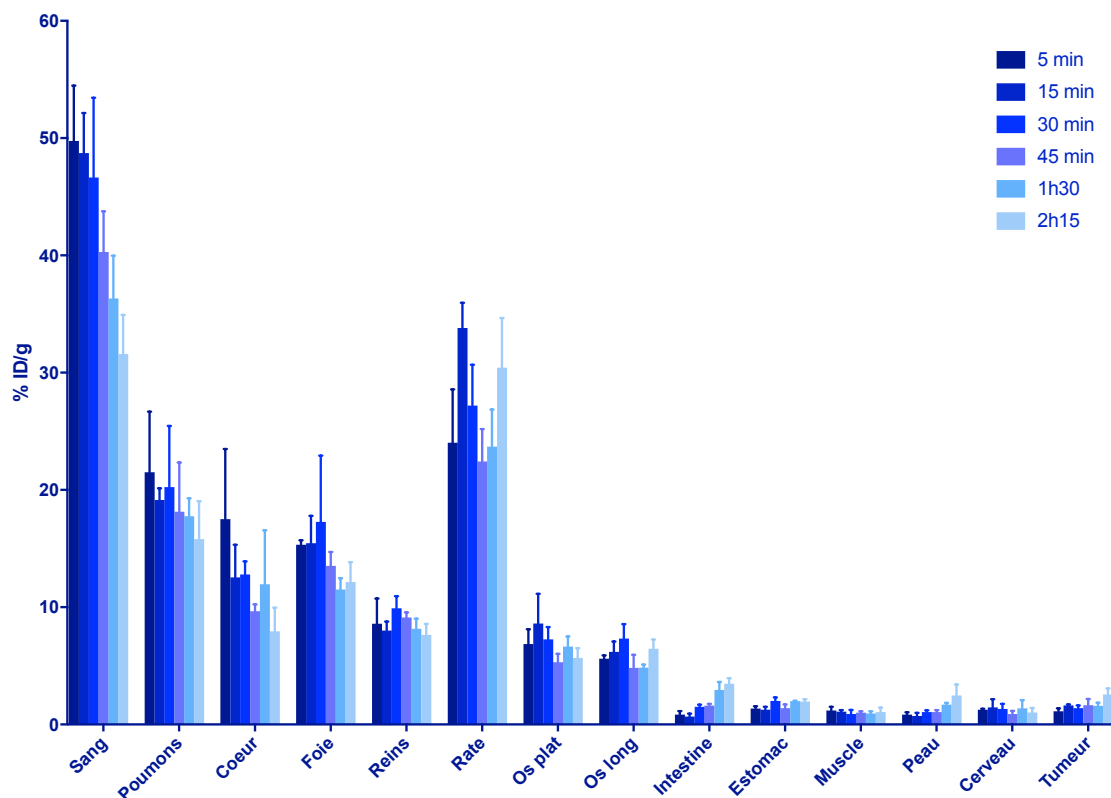


Figure 50 : Biodistribution de l'Ac anti-PD-L1 humain dans le modèle de mélanome M113^{PD-L1+}.

Dix jours après la greffe tumorale, les animaux porteurs de tumeur M113^{PD-L1+} ont reçu une injection en *i.v* de 63 kBq d'Ac anti-PD-L1 humain radiomarqué à l'indium-111. Le graphique représente la moyenne et l'écart-type du % ID/g pour chaque organe en fonction du temps.

V. Immunothérapie anti-PD-L1 humain

Une immunothérapie a été menée dans le but de déterminer si l'AcM anti-PD-L1 humain nu pouvait avoir un impact sur le développement tumoral dans le modèle préclinique de mélanome utilisé. Pour cela, 7 jours après la xénogreffe de la lignée de mélanome humain M113^{PD-L1+}, les animaux ont reçu une injection en intraveineuse de 20 µg (n = 10) ou de 100 µg (n = 9) d'AcM anti-PD-L1 humain nu et ont été comparés à un groupe contrôle ayant reçu une injection de PBS (n=7). La dose de 20 µg a été déterminée sur la base de la quantité maximale anticipée d'AcM qui pourrait être injectée au cours de la RIV, la dose de 100 µg correspondant quant à elle à une quantité fréquemment utilisée dans les immunothérapies en préclinique. Les effets de l'AcM anti-PD-L1 humain nu sur la croissance tumorale sont représentés en **figure 51 A**. Avant le traitement le volume tumoral est homogène pour l'ensemble des groupes. Après traitement, aucune différence significative n'a été observée entre les trois groupes d'animaux, les tumeurs se développant de façon comparable quelque soit le groupe.

Les courbes de survie de Kaplan-Meier montrent que la médiane de survie est de 43 jours pour les groupes traités avec 20 et 100 µg d'AcM anti-PD-L1 humain nu et de 41 jours pour le groupe contrôle (**figure 51 B**).

Ces données ont démontré que l'AcM anti-PD-L1 humain nu injecté seul n'a aucun impact sur le développement tumoral ou la survie des animaux.

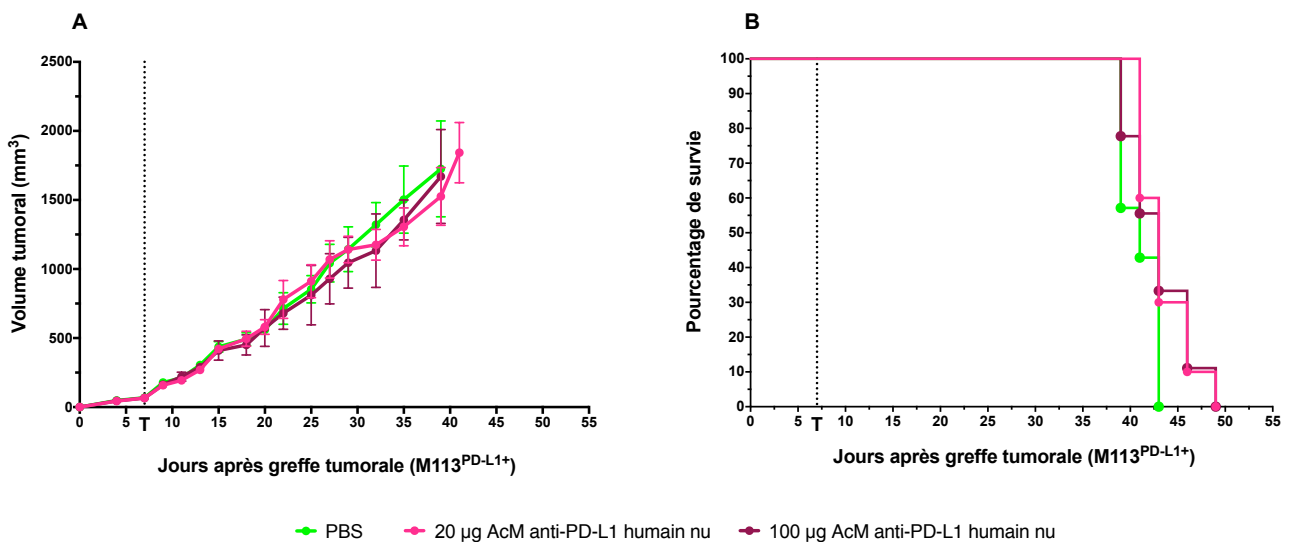


Figure 51 : Croissance tumorale et la survie après immunothérapie anti-PD-L1 humain dans le modèle de mélanome M113^{PD-L1+}

A. Sept jours après la greffe tumorale, les animaux porteurs de tumeur M113^{PD-L1+} ont reçu une injection en *i.v* de PBS (n = 7, courbe verte), 20 µg (n = 10, courbe rose) ou 100 µg d'AcM anti-PD-L1 humain nu (n = 9, courbe marron). Le graphique représente la moyenne et l'écart-type du volume tumoral pour chaque condition en fonction du temps. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. **B.** La survie des animaux est représentée par des courbes de Kaplan-Meier. Les animaux sont sacrifiés lorsque le volume de la tumeur atteint approximativement 2000 mm³. L'analyse statistique est effectuée avec un test de log-rank.

VI. Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213

Les activités d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 à injecter pour la RIV dans le modèle préclinique de mélanome ont été déterminées par une étude d'escalade de doses. Des groupes constitués de 3 souris non greffées ont ainsi reçu une injection d'Ac radiomarqué allant de 125 à 395 kBq/g. Les courbes de survie montrent que la médiane de survie est de 9 jours pour les groupes ayant reçu 335 et 395 kBq/g (**figure 52**). De même dans le groupe ayant reçu 205 kBq/g, deux souris ont dû être sacrifiées rapidement et la médiane de survie est de 10 jours. Dans ces 2 groupes les animaux ont été sacrifiés en raison d'une perte de poids très rapide et > 20% du poids initial, en lien avec une toxicité aiguë engendrée par les activités injectées (**figure 53**). Par contre dans les groupes ayant reçu 125 et 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213, l'ensemble des animaux ont survécu sur la durée du suivi de 100 jours, ce qui indique que les activités n'étaient pas toxiques. Ainsi les activités de 125 et 165 kBq/g ont été choisies pour l'étude de thérapie et la dose limite toxique a été déterminée à 205 kBq/g.

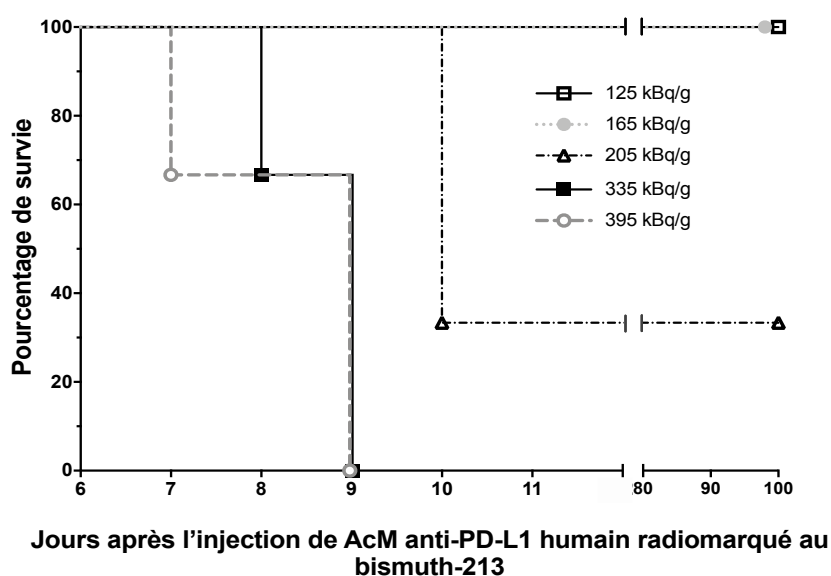
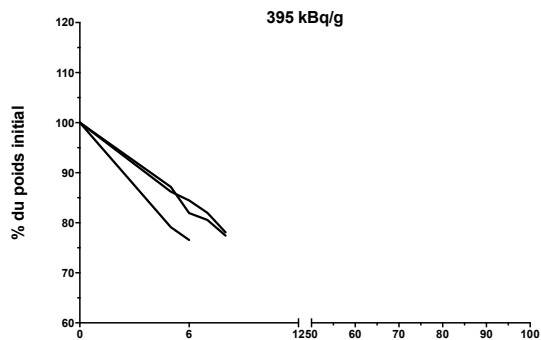


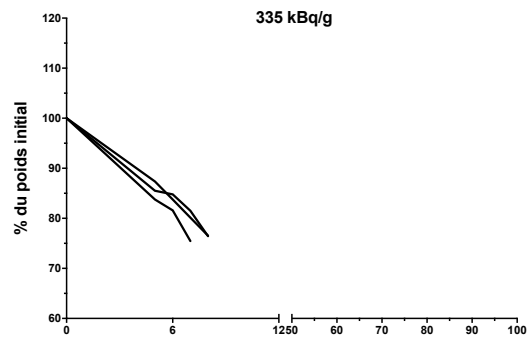
Figure 52 : Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 - Survie des animaux

Des NSG naïves ont reçu en *i.v* une activité de 125 (—■—), 165 (---●---), 205 (---▲---), 335 (—■—) ou 395 (---○---) kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 (n=3 par groupe). Les souris présentant une perte de poids $\geq 20\%$ du poids initial au cours du suivi de 100 jours, en raison de la toxicité induite par le radiopharmaceutique, sont sacrifiées. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de log-rank.

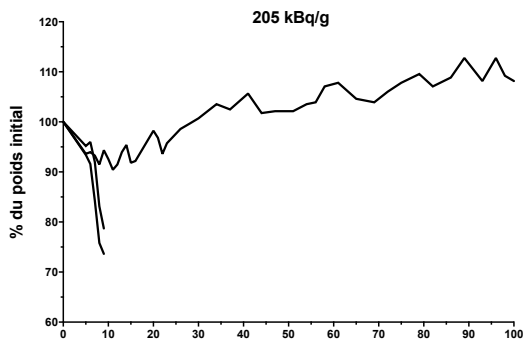
Parallèlement à l'étude de survie, la toxicité a été évaluée par le suivi du poids (**figure 53**), de paramètres hématologiques, hépatiques, rénaux et médullaires (**figure 54**).



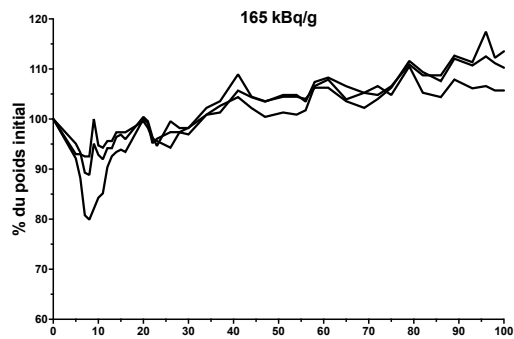
Jours après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213



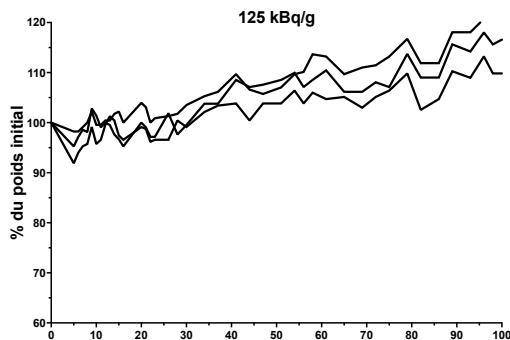
Jours après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213



Jours après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213



Jours après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213



Jours après l'injection de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213

Figure 53 : Escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 - Suivi du poids

Des NSG naïves ont reçu en *i.v* une activité de 125, 165, 205, 335 ou 395 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 (n=3 par groupe). Les souris présentant une perte de poids $\geq 20\%$ du poids initial au cours du suivi de 100 jours, en raison de la toxicité induite par le radiopharmaceutique, sont sacrifiées.

Pour l'analyse de la toxicité hématologique, les érythrocytes et les plaquettes ont été comptés avant l'injection du radiopharmaceutique (T0, temps de référence) puis en point final au moment du sacrifice des animaux. Aucune variation majeure du nombre d'érythrocytes n'a été observée quelque soit le groupe au moment du sacrifice par rapport à la numération initiale (**figure 54 A**). En revanche, les souris ayant reçu de 165 à 395 kBq/g d'AcM radiomarqué présentent une réduction significative et dose dépendante du nombre de plaquettes, par rapport au temps de référence. Pour le groupe à 125 kBq/g une légère baisse du nombre de plaquettes au sacrifice est à noter mais elle n'est pas significative par rapport au T0 (**figure 54 B**). Ces résultats indiquent que dès 165 kBq/g nous observons une leucopénie significative chez les animaux alors qu'aucune toxicité n'est induite sur les érythrocytes.

En complément de cette analyse hématologique, la toxicité médullaire a été évaluée par la mesure de la concentration plasmatique de FLT3-Ligand (**figure 54 C**). Avant l'injection à T0, la concentration en FLT3-Ligand est en moyenne de 203 pg/mL. Une augmentation très importante et significative de sa concentration est observée au sacrifice chez les souris ayant reçu 335 et 395 kBq/g d'AcM radiomarqué ainsi que chez la souris sacrifiée à court terme dans le groupe à 205 kBq/g, les valeurs atteintes sont de 2051, 2203 et 863 pg/mL respectivement. Chez ces animaux, l'injection du radiopharmaceutique a donc engendré une toxicité médullaire importante. Dans les groupes injectés avec 125 et 165 kBq/g, une augmentation non significative du FLT3-Ligand a été observée, ces activités semblent donc générer une faible de toxicité médullaire.

Les toxicités rénales et hépatiques ont été analysées par le dosage de l'urée, des ASAT et des ALAT, respectivement.

Concernant l'urée, biomarqueur de toxicité rénale, sa concentration plasmatique augmente faiblement mais significativement à partir de 205 kBq/g (**figure 54 D**). Aucune toxicité rénale n'a été documentée pour les groupes 125 et 165 kBq/g.

La détermination des concentrations d'ALAT et d'ASAT n'a montré aucune augmentation très significative par rapport au temps de référence avant l'injection quels que soit les groupes, bien que quelques animaux ayant reçu 205, 335 ou 395 montrent individuellement quelques fortes augmentations au moment du sacrifice (**figure 54 E et F**).

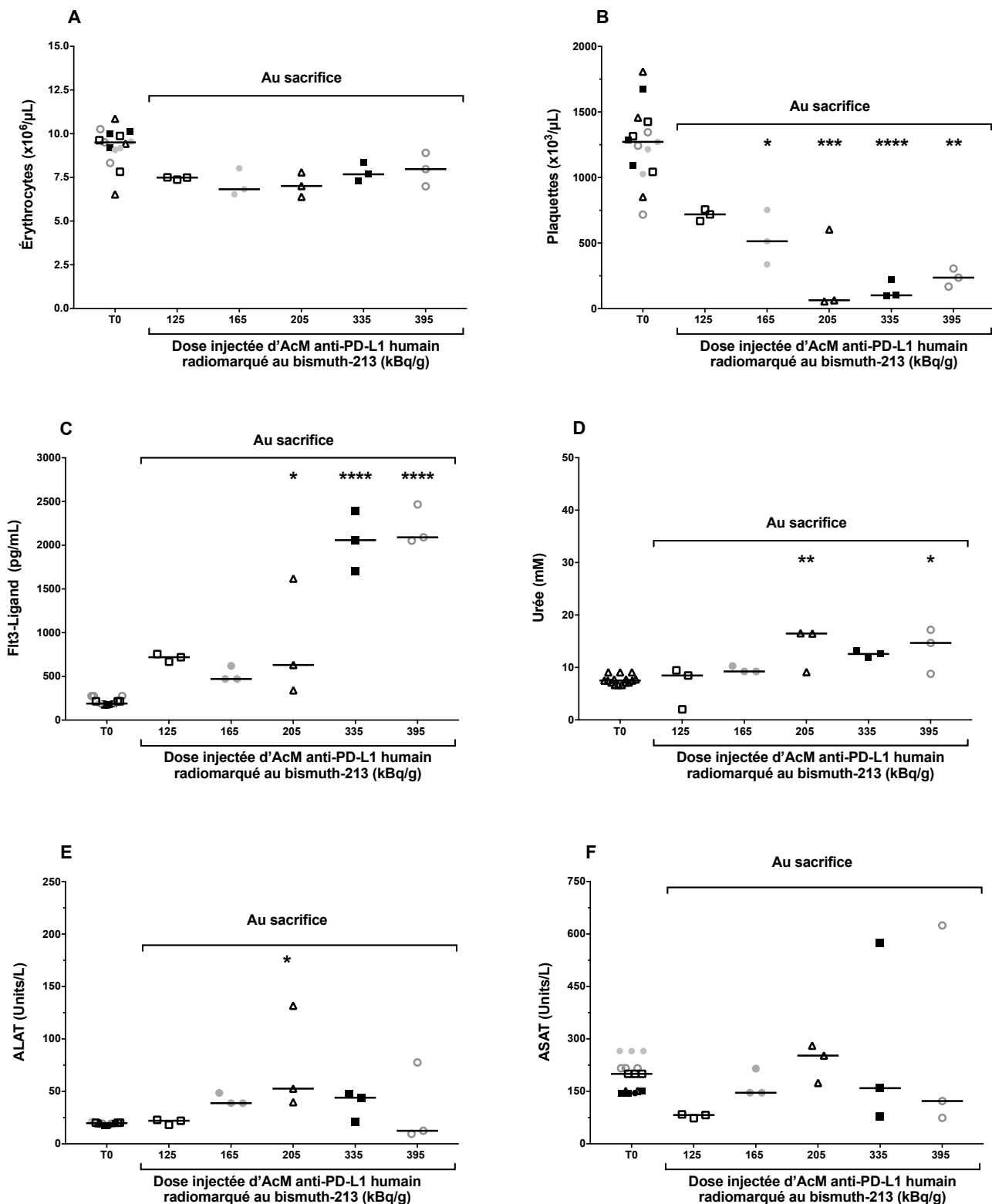


Figure 54 : Étude de toxicité après escalade de doses avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.

Des animaux naïfs ont reçu en *i.v* une dose unique de 125 (□), 165 (•), 205 (▲), 335 (■) ou 395 (○) kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 (n=3 par groupe). Le nombre **A.** de globules rouges, **B.** de plaquettes, les concentrations plasmatiques **C.** de FLT3-Ligand **D.** d'urée **E.** d'ALAT et **F.** d'ASAT ont été déterminés avant l'injection (T0) puis au moment du sacrifice. La barre représente la médiane. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak.

En résumé, l'analyse des différentes toxicités démontrent que les activités de 335 et 395 kBq/g induisent une toxicité plaquettaire et médullaire importante mais également une toxicité rénale pouvant ainsi expliquer la mort prématurée des animaux. Les résultats suggèrent que les activités de 125 et 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 peuvent être utilisées pour la RIV- α .

VII. Radiothérapie interne vectorisée anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213

1. Analyse de l'efficacité thérapeutique de la RIV- α

Après avoir confirmé que l'anticorps anti-PD-L1 humain nu n'avait pas d'impact sur la croissance des tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+}, et déterminé les activités d'AcM radiomarqué au bismuth-213 adaptées pour la thérapie, nous avons déterminé si l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 avait un effet thérapeutique. Au 7^{ème} jour après la greffe de la lignée de mélanome humain M113^{PD-L1+} en *s.c.*, une injection en *i.v* d'une activité de 125 ou 165 kBq/g de radiopharmaceutique a été réalisée. Les animaux des groupes contrôles ont été traités respectivement avec 125 ou 165 kBq/g d'isotype contrôle IgG2b κ radiomarqué au bismuth-213 ou une injection de PBS.

L'activité anti-tumorale a été évaluée par le suivi de la croissance tumorale et la survie. Comme le montre la **figure 55**, les souris traitées avec 125 et 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 présentent un retard significatif de la croissance tumorale par rapport aux souris contrôles ayant reçu soit du PBS, soit l'isotype contrôle radiomarqué à 125 ou à 165 kBq/g (****, $p < 0,001$). Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la croissance tumorale entre les groupes traités avec 125 et 165 kBq/g d'Ac anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. De même aucune différence significative n'a été observée entre les 3 groupes contrôles en ce qui concerne le développement tumoral.

Le ciblage spécifique de la tumeur avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 à des activités de 125 et 165 kBq/g ralentit significativement la progression des tumeurs de la lignée M113^{PD-L1+}.

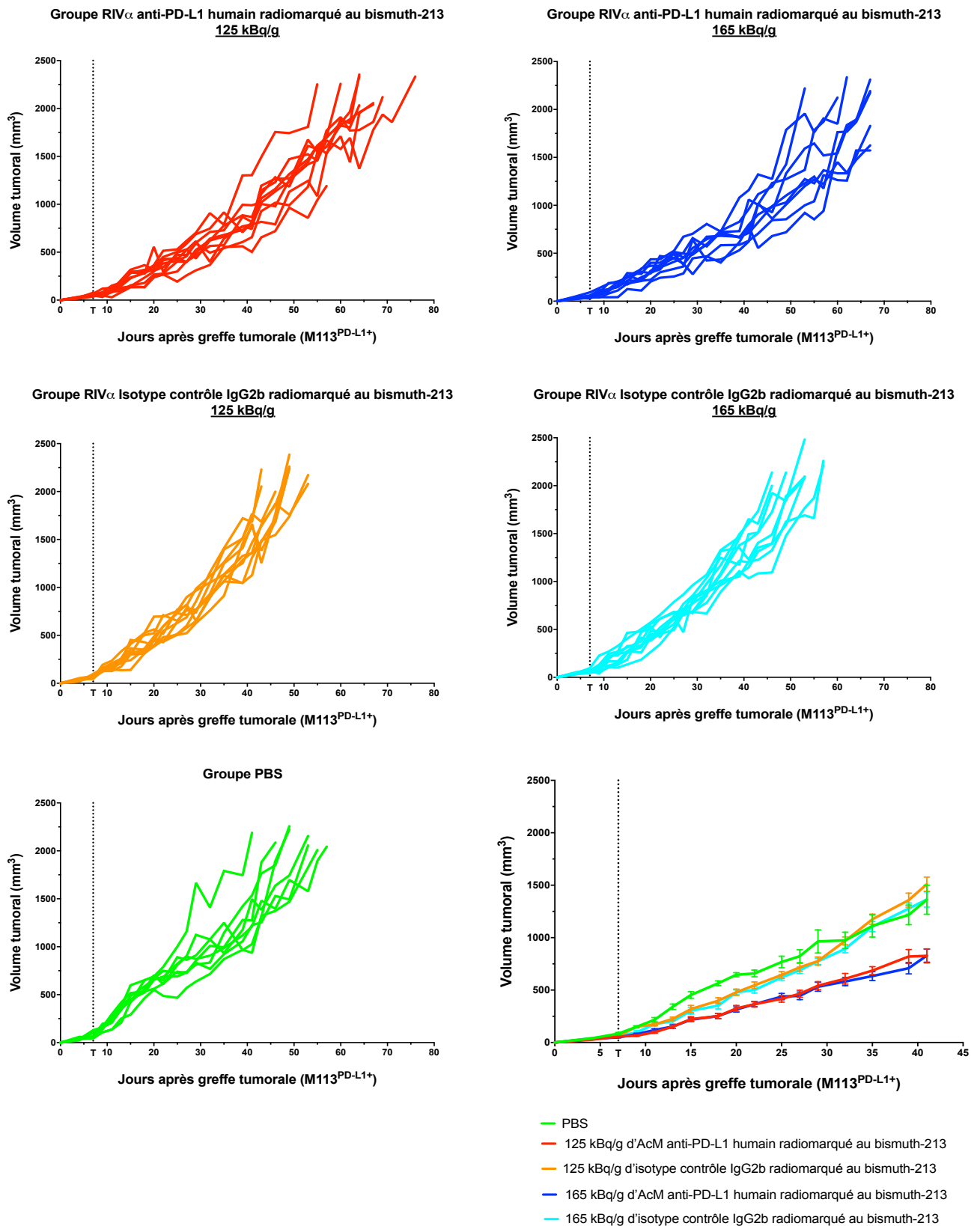


Figure 55 : Courbe de croissance des tumeurs M113^{PD-L1+} après RIV α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.

7 jours après la xéngreffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en s.c, les animaux ont été traités avec une injection unique en i.v de 125 ou 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 (n =10). Les animaux témoins ont été traités avec du PBS (n=8) ou 125 et 165 kBq/g d'isotype contrôle IgG2b radiomarqué au

bismuth-213 (n=9 et n= 10 respectivement). Les résultats présentent le volume tumoral de chaque animal en fonction du temps après greffe ou la moyenne et l'écart-type du volume tumoral pour chaque condition en fonction du temps. Les animaux ont été sacrifiés lorsque le volume tumoral a atteint approximativement 2000 mm³. L'analyse statistique a été réalisée avec une ANOVA à deux voies suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey.

Nous avons déterminé si le retard de croissance tumorale s'accompagnait d'une augmentation de la survie des animaux. Ainsi comme le montre la **figure 56**, la médiane des groupes traités par RIV- α avec 125 et 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 est de 64 et 67 jours respectivement. Elle est respectivement de 49, 53 et 51 jours pour les groupes ayant reçu 125, 165 kBq/g d'isotype contrôle radiomarqué ou du PBS. Les animaux traités par RIV- α anti-PD-L1 survivent donc significativement plus longtemps par rapport aux groupes contrôles. Une différence significative est en effet observée entre le groupe traité avec 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué par rapport au groupe contrôle PBS (***, p=0,0003) et par rapport au groupe traité avec 125 kBq/g d'isotype contrôle radiomarqué (****, p<0,0001). La RIV- α anti-PD-L1 avec une activité de 165 kBq/g induit aussi une différence significative de survie par rapport au groupe contrôle PBS (**, p=0,0010) et par rapport au groupe traité avec 165 kBq/g d'isotype contrôle radiomarqué (***, p=0,0009). Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes traités par RIV- α anti-PD-L1, cependant l'injection de 165 kBq/g d'AcM radiomarqué au bismuth-213 a entraîné la mort d'un animal 6 jours après le traitement, ce qui démontre que cette activité peut aussi être associée avec une toxicité aiguë. L'activité optimale pour la RIV- α anti-PD-L1 semble donc être 125 kBq/g.

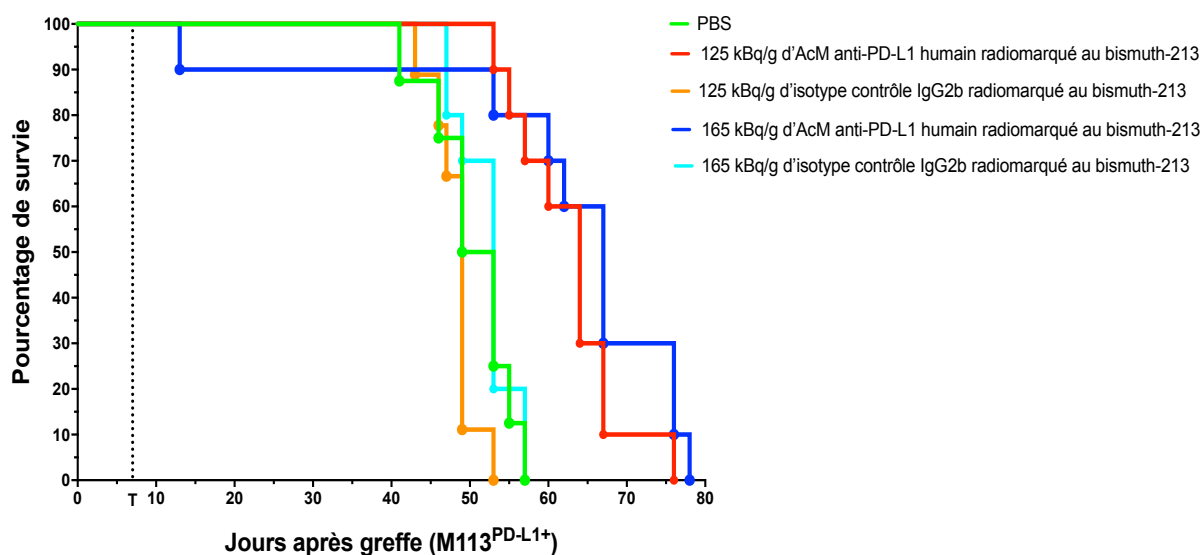


Figure 56 : Courbe de survie des animaux porteurs de tumeur M113^{PD-L1+} après RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213.

7 jours après la xéno greffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en s.c, les animaux ont été traités avec une injection unique en i.v de 125 ou 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 (n =10). Les animaux témoins ont été traités avec du PBS (n=8) ou 125 et 165 kBq/g d'isotype contrôle IgG2b radiomarqué au bismuth-213 (n =9 et n= 10 respectivement). La survie a été suivie jusqu'à ce que le volume de la tumeur atteigne 2000 mm³. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de log-rank.

Afin de démontrer que l'efficacité anti-tumorale de la RIV- α anti-PD-L1 observée est bien associée à la spécificité du ciblage, en plus du contrôle isotypique déjà réalisé, nous avons répété l'approche de thérapie sur des animaux développant une tumeur de mélanome parental M113^{WT} qui n'exprime pas PD-L1. Ces animaux ont été traités avec une dose unique en *i.v* de 125 kBq/g d'Ac anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 ($n = 10$). Les groupes contrôles ont reçu 125 kBq/g d'isotype contrôle radiomarqué ($n = 10$) ou du PBS ($n=14$). Dans cette expérience, aucune différence significative n'a pu être observée entre les groupes contrôles et le groupe traité par RIV- α anti-PD-L1 tant au niveau de la croissance tumorale qu'au niveau de la survie (**figure 57 A et B**).

L'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 ne présente donc aucune efficacité thérapeutique sur les tumeurs M113^{WT}.

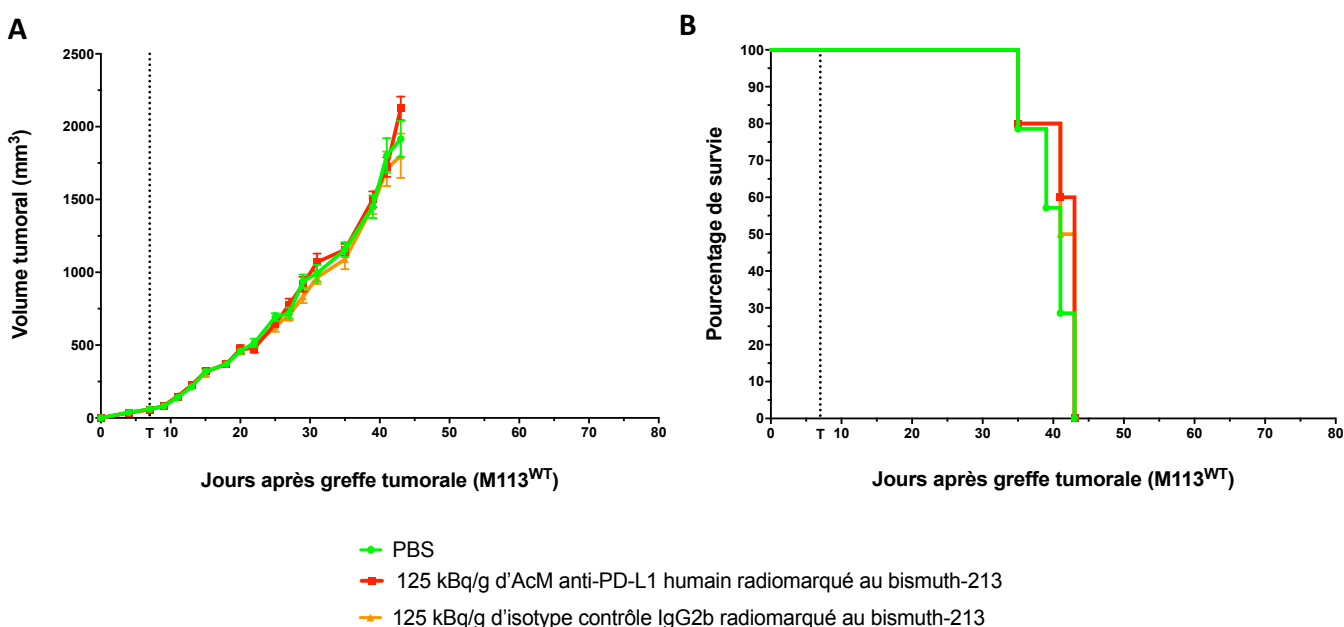


Figure 57 : Effets de la RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 sur la croissance des tumeurs M113^{WT} et la survie des animaux.

A. Sept jours après la greffe des tumeurs M113^{WT}, les animaux ont été traités par une injection en *i.v* de PBS ($n = 14$, courbe verte), 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 radiomarqué au bismuth-213 ($n = 10$, courbe rouge) ou 125 kBq/g d'isotype contrôle IgG2b radiomarqué au bismuth-213 ($n = 9$, courbe orange). Le graphique représente la moyenne des volumes tumoraux pour chaque condition en fonction du temps. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Les barres représentent l'écart type. **B.** La survie des animaux est représentée par des courbes de Kaplan-Meier. Les souris ont été sacrifiées lorsque le volume de la tumeur a atteint approximativement 2000 mm³. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de log-rank.

L'ensemble de ces résultats démontre que dans ce modèle préclinique de mélanome humain, la RIV- α avec un AcM anti-PD-L1 humain-radiomarqué au bismuth-213 présente une efficacité thérapeutique. La RIV induit en effet un retard significatif de la croissance tumorale et une augmentation significative du taux de survie des animaux. De plus l'efficacité de cette approche thérapeutique est directement associée au ciblage spécifique de la tumeur.

2. Analyse de la toxicité associée à la RIV- α

La toxicité hématologique a été analysée après RIV- α sur les tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+}. Les érythrocytes et les plaquettes ont été comptés 7 jours avant la greffe tumorale afin d'obtenir une valeur de référence (temps 0), puis 20 jours après le traitement, soit 27 jours après la greffe, en analyse intermédiaire (temps 27) puis au moment du sacrifice (**figure 58**). Aucune variation significative du nombre d'érythrocytes n'a été observée (**figure 58 A**). En revanche, comme lors de l'escalade de dose, toutes les souris traitées par RIV- α à 125 ou 165 kBq/g ou ayant reçu l'isotype contrôle radiomarqué au bismuth-213 (125 ou 165 kBq/g) présentent une baisse significative du nombre de plaquettes, au moment de l'analyse intermédiaire, 20 jours après le traitement (****, $p < 0,0001$). De plus les taux de plaquettes ne sont pas restaurés au moment du sacrifice, où la numération est encore significativement inférieure au groupe contrôle PBS, pour les groupes ayant reçu l'isotype contrôle à 125 kBq/g ou 165 kBq/g (****, $p < 0,0001$), mais aussi pour les groupes traités par RIV- α anti-PD-L1 à 125 kBq/g (**, $p = 0,0022$) ou 165 kBq/g (**, $p = 0,0027$) (**figure 58 B**).

Les toxicités médullaires, rénales et hépatiques ont été étudiées avant le traitement (T0) puis au moment du sacrifice.

L'étude de la toxicité médullaire révèle que la concentration plasmatique en FLT3-Ligand augmente de façon significative pour les groupes traités avec 165 kBq d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué ou d'isotype contrôle par rapport au T0 (**, $p = 0,0013$ et ***, $p = 0,0008$ respectivement). La concentration en FLT3-Ligand pour les groupes à 125 kBq/g reste inchangée (**figure 58 C**).

La concentration plasmatique d'urée mesurée pour attester du fonctionnement rénal, n'est augmentée dans aucun des groupes traités. De même aucune augmentation n'est observée pour les deux biomarqueurs de toxicité hépatique, l'ALAT et l'ASAT (**figure 58 D et E**).

L'analyse de la toxicité montre que le traitement par la RIV- α à 125 et 165 kBq/g induit une légère toxicité au niveau des plaquettes en lien avec l'injection du radioélément et indépendamment de la spécificité du vecteur. De même une toxicité médullaire est observée à 165 kBq/g, que le vecteur de la RIV soit spécifique ou non de la tumeur. Cette toxicité n'avait pas été observée lors de l'étude d'escalade de doses. L'absence de toxicité majeure observée avec 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain valide son utilisation comme activité de traitement dans la poursuite du projet.

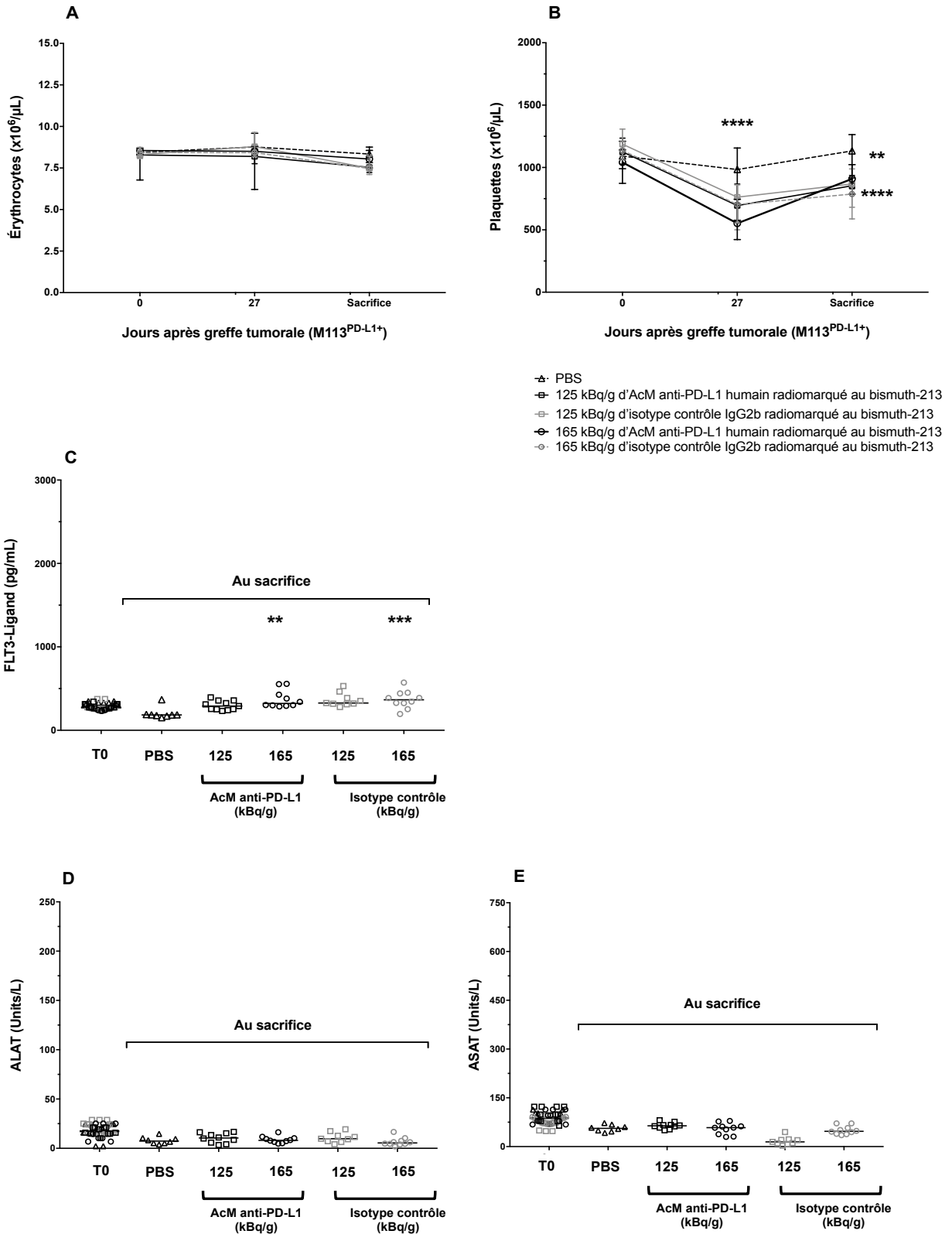


Figure 58 : Étude de toxicité après RIV- α anti-PD-L1 humain au bismuth-213.

7 jours après la xéngreffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en *s.c.*, les animaux ont été traités avec une injection unique en *i.v.* de 125 ou 165 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 ($n = 10$). Les animaux témoins ont été traités avec du PBS ($n = 8$) ou 125 et 165 kBq/g d'isotype contrôle IgG2b radiomarqué au bismuth-213 ($n = 9$ et $n = 10$ respectivement). Le nombre d'hématies **A.**, de plaquettes **B.**, a été déterminé à T0, 27 jours après la greffe (20 jours après la RIV- α) et au moment du sacrifice. Les concentrations plasmatiques de FLT3-Ligand **C.**, d'ALAT **D.**, et d'ASAT **E.**, ont été déterminées 7 jours avant les traitements (T0) et au moment du sacrifice. La barre représente la médiane. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak.

Chapitre II : Analyse des effets radiobiologiques du bismuth-213 sur les cellules de mélanome

Afin de documenter *in vitro* l'impact des radiations de la RIV- α avec l'AcM anti-PD-L1 radiomarqué au bismuth-213, diverses expérimentations *in vitro* ont été menées sur les cellules de mélanome M113^{WT} et M113^{PD-L1+}. Ainsi la prolifération cellulaire, la production de cassures doubles brins, l'induction de la mort cellulaire ainsi que la production de quelques cytokines ont été analysées.

I. Analyse de la prolifération cellulaire

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} marquées par une molécule fluorescente, le VPD450, ont été incubées avec des doses croissantes d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 et leur capacité à proliférer a été évaluée à 24h, 48 h et 72h après l'irradiation, par cytométrie en flux. Quand une cellule se divise, les cellules filles récupèrent chacune la moitié des molécules VPD450, donc la prolifération cellulaire est mise en évidence par une diminution de l'intensité du signal de fluorescence en VPD450.

Les résultats sont présentés en **figure 59**. L'inhibition de la prolifération des deux lignées de mélanome apparaît dose dépendante aux différents temps. Elle est plus importante à 48h et s'accroît encore un peu à 72h après irradiation.

Plus précisément, quand les cellules sont incubées avec des activités de 46,25 à 370 kBq/mL d'AcM radiomarqué au bismuth-213, les deux lignées cellulaires ne présentent pas le même niveau d'inhibition de prolifération. Sur les faibles activités, le ciblage avec l'AcM anti-PD-L1 radiomarqué induit une plus forte inhibition de la prolifération de la lignée M113^{PD-L1+} alors que l'inhibition est moindre sur la lignée M113^{WT}. Cet effet est particulièrement notable à 48h où les différences entre les deux lignées sont d'environ 20% pour les activités de 46,25 à 185 KBq.

Au contraire, quand les cellules sont incubées avec des activités de 740 kBq à 2,96 MBq/mL d'AcM radiomarqué, le niveau d'inhibition de la prolifération est identique pour les deux lignées cellulaires. A ces fortes activités, l'irradiation apparaît donc principalement non spécifique. L'inhibition est d'environ 45% à 24h, augmente à 70% à 48h jusqu'à environ 80% à 72h après irradiation.

Sur la base de ces résultats, nous avons choisi de nous placer à 2,96 MBq/mL pour les deux lignées et pour toutes les analyses radiobiologiques suivantes.

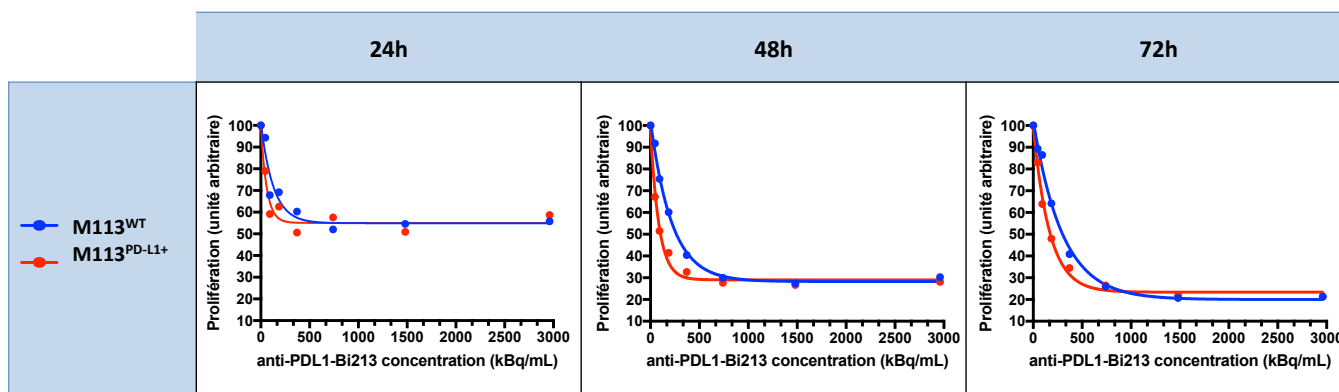


Figure 59 : Effet de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 sur la prolifération des lignées de mélanome humain M113^{WT} et M113^{PD-L1+}.

Les lignées de mélanome humain M113^{WT} et M113^{PD-L1+} marquées au VPD450 ont été irradiées avec 0 ; 46,25 ; 92,5 ; 185 ; 370 ; 740 ; 1480 ou 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Leur capacité à proliférer a été analysée à différents temps 24h, 48h et 72h après l'irradiation par cytométrie en flux. Les résultats sont représentés en unités arbitraires en fonction de la dose. Ces résultats ont été calculés en prenant comme référence l'intensité de fluorescence des cellules vivantes sans irradiation.

II. Analyse des cassures doubles brins

Les particules α induisent principalement des cassures doubles brins. Nous avons donc étudié la cinétique d'induction des cassures doubles brins dans les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} après incubation avec 2,96 MBq d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. L'analyse a été faite 15 min, 30 min, 1h, 2h et 6h après dépôt de l'AcM radiomarqué, en cytométrie de flux par un marquage avec un anticorps anti- γ H2AX phosphorylé (**figure 60**).

Pour les deux lignées cellulaires les cassures doubles brins sont détectables dès 15 minutes min après le dépôt de l'AcM radiomarqué et leur quantité augmente suivant la même cinétique au fil du temps pour atteindre un maximum au bout de 2 h. A partir de 6h après le début de l'irradiation, la phosphorylation de l'histone γ H2AX diminue (**figure 60**).

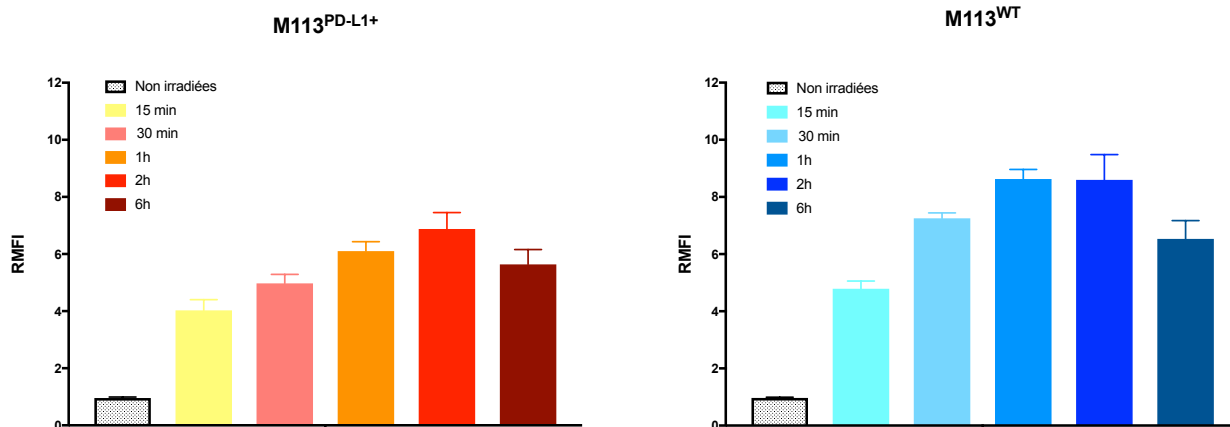


Figure 60 : Induction de cassures doubles brins par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113^{WT} et M113^{PD-L1+}.

Les cellules M113^{PD-L1+} et M113^{WT} ont été irradiées avec 2,96 MBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Les cassures doubles brins sont analysées à différents temps 15 min, 30 min, 1h, 2h et 6h après l'irradiation par cytométrie en flux en utilisant AcM anti-phospho- γ H2AX-Alexa Fluor 488 ou un isotype contrôle-Alexa Fluor 488. Les résultats sont exprimés en rapport d'intensité de fluorescence entre le marquage phospho- γ H2AX et le marquage avec l'isotype contrôle. Les histogrammes représentent la moyenne et l'écart type. (n=3/lignées/temps)

III. Analyse de la mort cellulaire

Les cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+} présentent de nombreuses cassures doubles brins rapidement après incubation avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 ce qui, comme présenté ci-dessus, bloque leur prolifération. Nous avons donc étudié le type de mort cellulaire qui conduit à ces phénomènes. Les lignées cellulaires ont été irradiées avec 2,96 MBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 puis analysées 24h, 48h et 72h plus tard. Des contrôles ont été réalisés en incubant les 2 lignées cellulaires avec 10 μ g/mL d'AcM anti-PD-L1 humain nu en en parallèle. Apoptose et nécrose ont été analysées par cytométrie en flux après marquage avec l'annexine V et l'iodure de propidium (PI) comme indiqué en **(figure 61)**.

Le dépôt d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 induit une apoptose importante à 48h après incubation avec l'AcM radiomarqué. L'apoptose reste importante à 72h. De la nécrose est notable dès 24h mais reste relativement faible jusqu'à 72h **(tableau 9)**.

Ces résultats suggèrent que la mort cellulaire après irradiation avec le bismuth-213 se produit principalement par apoptose pour les deux lignées.

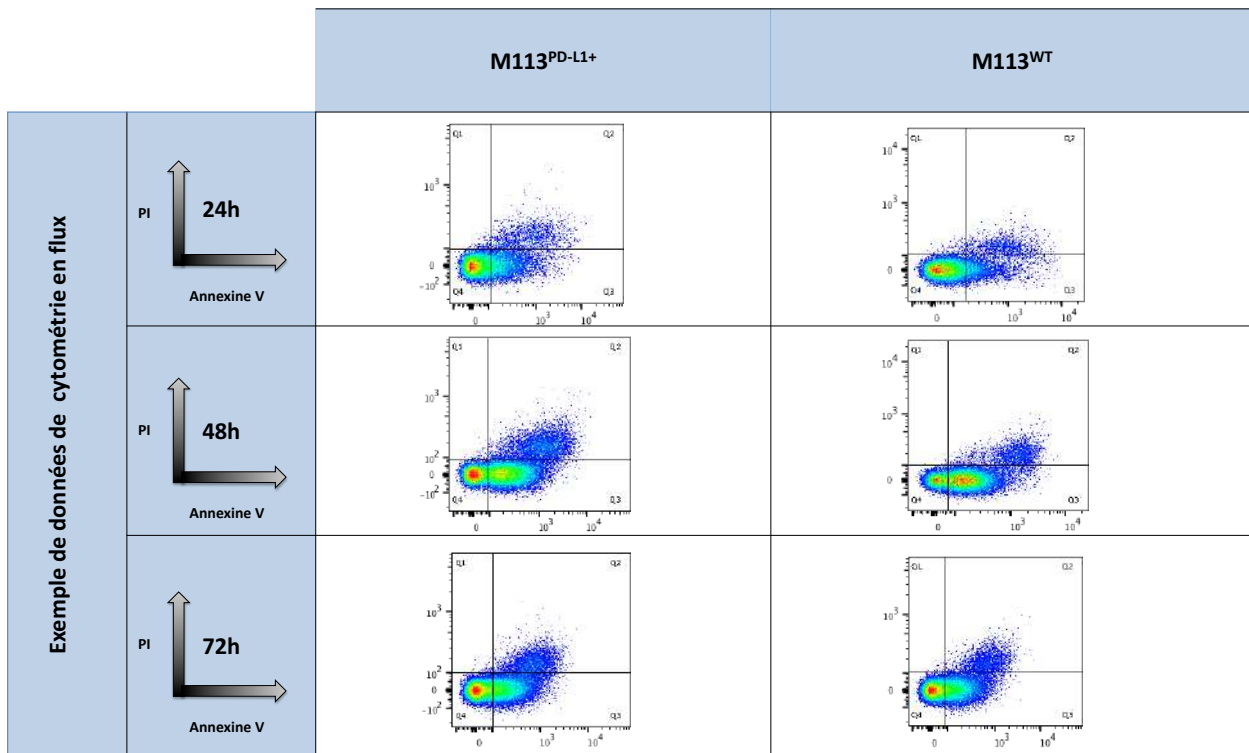


Figure 61 : Induction d'apoptose et nécrose par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113^{WT} et M113^{PD-L1+}.

Les cellules M113^{PD-L1+} et M113^{WT} ont été incubées avec 2,96 MBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. En parallèle des cellules ont été incubées avec 10 µg/mL d'Ac anti-PD-L1 humain nu. L'analyse par cytométrie en flux de l'induction de l'apoptose et/ou nécrose a été effectuée par un marquage à l'Annexine-APC/iodure de propidium (PI) à 24h, 48h et 72h. L'apoptose est définie sur la base d'un simple marquage avec l'annexin V, la nécrose par un double marquage annexin V et PI. Les courbes représentent la moyenne et les barres l'écart type. (n=2/lignée/condition/temps).

Tableau 9 : Résumé des résultats de l'induction d'apoptose et nécrose par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 dans les lignées de mélanome humain M113^{WT} et M113^{PD-L1+}

		Apoptose (moyenne du % de cellules et écart-type)			Nécrose (moyenne du % de cellules et écart-type)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
AcM anti-PD-L1 humain nu	M113 ^{PD-L1+}	5,50 ± 0,06	4,95 ± 0,19	6,17 ± 0,25	0,42	0,29	0,24
	M113 ^{WT}	5,17 ± 0,06	4,59 ± 1,3	6,82 ± 0,1	0,25 ± 0,11	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,02
AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213	M113 ^{PD-L1+}	19,70 ± 2,12	48,15 ± 1,62	34,10 ± 1,56	5,57 ± 0,21	11,75 ± 0,07	7,44 ± 0,32
	M113 ^{WT}	14,25 ± 0,8	66,30 ± 2,1	37,25 ± 0,5	4,67 ± 0,41	6,04 ± 0,14	5,13 ± 0,42

IV. Analyse de la sécrétion de cytokines

Nous avons déjà démontré dans des travaux publiés que le bismuth-213 pouvait induire la mort immunogène de cellules tumorales (Gorin 2015). C'est pourquoi une étude a été menée afin de déterminer si le même phénomène était observable avec les lignées M113^{PD-L1+} et M113^{WT}. Nous nous sommes intéressés à HMGB1, un DAMP, à l'IFNβ, une cytokine pro-inflammatoire et

CXCL10, une chimiokine ligand du récepteur CXCR3 des LT. Les lignées de mélanome ont été incubées avec 0 ; 92,5 ; 185 ; ou 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 et le milieu de culture a été récupéré 24h, 48h et 72h après dépôt de l'AcM radiomarqué (**figure 62**).

Les dosages ELISA ont montré que les cellules de mélanome M113^{PD-L1+} et M113^{WT} après incubation avec l'AcM radiomarqué au bismuth-213, produisaient de l'IFN β , du CXCL10 et de l'HMGB1. Cependant la sécrétion de chacune de ces molécules est différente.

La sécrétion d'IFN β par les deux lignées de mélanome ne semble pas dose dépendante, puisqu'elle est similaire quelle soit l'activité d'AcM radiomarqué déposée. La production de CXCL10 quant à elle n'est notable qu'à la plus forte activité, soit 2,96 MBq/mL, rien n'est détectable aux faibles activités de 92,5 ou 185 kBq/mL. Enfin, pour HMGB1, plus l'activité d'AcM radiomarqué déposée est importante plus la sécrétion est importante. Cependant, la concentration d'HMGB1 n'augmente que peu entre 185 kBq et 2,96 MBq/mL.

Au delà des différences entre chacune des molécules sécrétées, on observe aussi une différence importante entre les es tumorales au niveau des cinétiques de production, ce qui semble donc refléter l'impact du ciblage spécifique dans l'induction de la production de ces facteurs solubles.

En ce qui concerne l'IFN β , quelle soit la dose, on observe qu'au niveau des cellules de mélanome M113^{PD-L1+}, la sécrétion 24h après le dépôt de l'AcM radiomarqué est nulle, elle atteint son maximum à 48h et diminue légèrement à partir de 72h. La cinétique de production par les cellules de mélanome M113^{WT} est différente, puisque, quelle soit la dose, rien n'est détecté ni à 24h ni à 48h et c'est seulement à 72h après dépôt de l'AcM radiomarqué que l'on peut détecter une augmentation de la sécrétion d'IFN β .

Pour CXCL10 qui n'est produit qu'après dépôt de 2,96 MBq/mL d'AcM radiomarqué, la plus forte activité testée, on observe le même retard dans la cinétique de production entre les cellules M113^{PD-L1+} et M113^{WT}. Ainsi la sécrétion de CXCL10 par les M113^{PD-L1+} est notable dès 48h et augmente encore à 72h. Au niveau des cellules M113^{WT}, ce n'est qu'à 72h après irradiation que l'on détecte une augmentation de la concentration de CXCL10.

Enfin pour HMGB1, la sécrétion semble être très précoce et transitoire dans les cellules M113^{PD-L1+} après dépôt de l'AcM anti-PD-L1 radiomarqué, car la concentration maximale est détectée à 24h avec un retour au niveau basal dès 48h après irradiation. Dans les cellules M113^{WT}, 24h après incubation avec l'AcM radiomarqué, la sécrétion semble légèrement augmentée par rapport au niveau basal. La concentration en HMGB1 augmente de façon transitoire jusqu'à un maximum à 48h après irradiation.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le bismuth-213 est capable d'induire une mort immunogène des cellules de mélanome, par la libération de facteurs tels que HMGB1, IFN β et CXCL10 qui peuvent tous différemment stimuler des effecteurs de l'immunité. Ces résultats montrent aussi que la vectorisation du bismuth via l'AcM anti-PD-L1 qui permet de délivrer spécifiquement les rayonnements ionisants au niveau de la membrane des cellules M113^{PD-L1+} semble induire une sécrétion plus rapide de ces molécules.

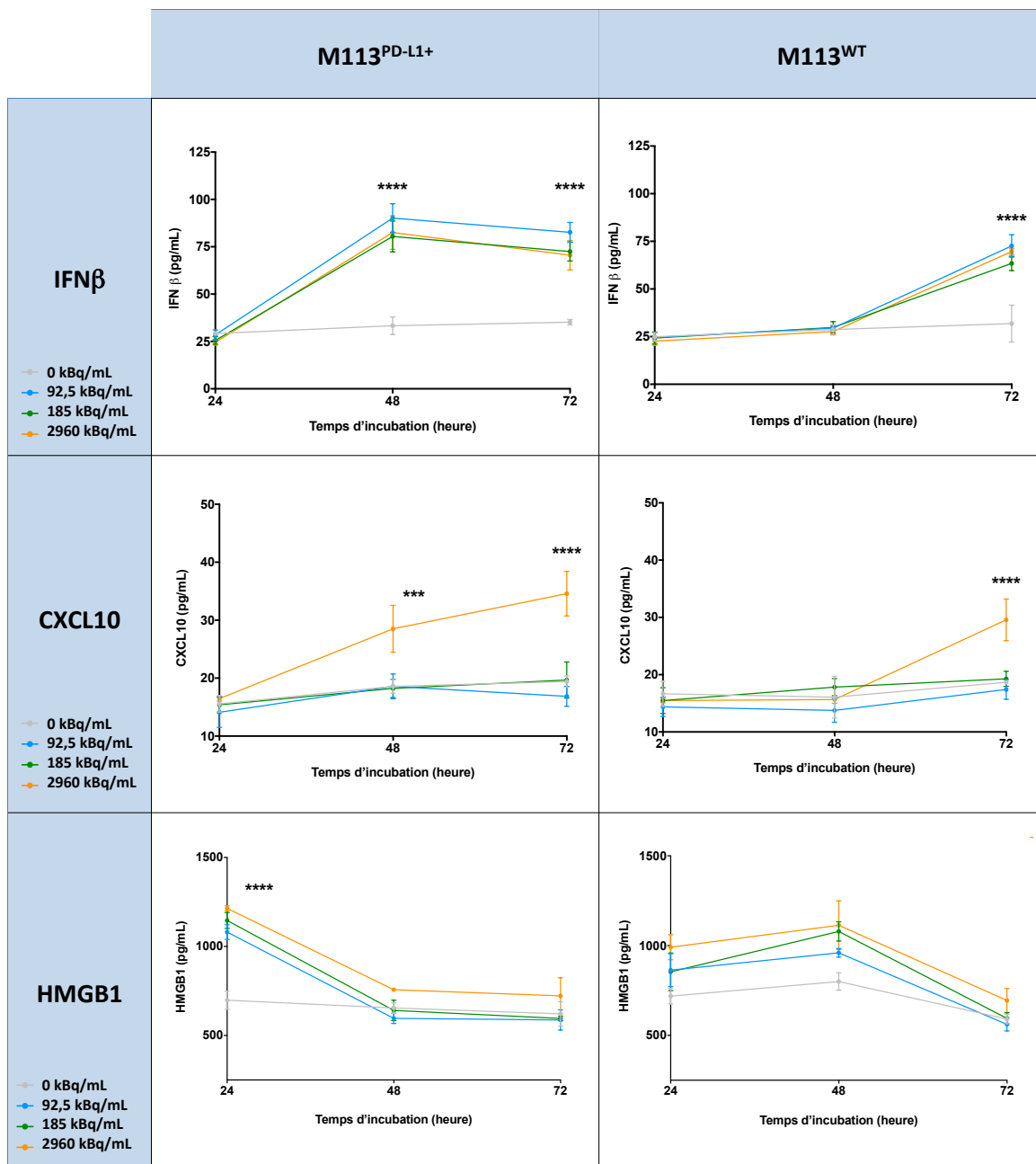


Figure 62 : Libération de IFN β , CXCL10 et HMGB1 par M113^{PD-L1+} et M113^{WT} après irradiation au bismuth-213.

Les cellules M113^{PD-L1+} et M113^{WT} ont été incubées avec 0 ; 92,5 ; 185 et 2960 kBq/mL d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Les surnageant ont été récoltés à 24h, 48h et 72h après dépôt de l'anticorps radiomarqué. Un test ELISA a été réalisé pour déterminer la concentration en IFN β , CXCL10 et HMGB1. Les courbes représentent la moyenne et les barres l'écart type. Un test ANOVA à 2 facteurs suivis d'un test de comparaison multiple de Tukey ont été réalisés (n=3/lignées/dose/temps).

Chapitre III : Association thérapeutique RIV- α anti-PD-L1 et immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ PD-1 KO spécifiques du mélanome

Dans le modèle préclinique de mélanome humain étudié, la RIV- α avec l'AcM anti-PD-L1 radiomarqué au bismuth-213 retarde la progression tumorale et permet une augmentation de la survie des animaux. Le second objectif de mon travail de thèse consistait à évaluer le potentiel thérapeutique de l'association RIV- α anti-PD-L1 et le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques du mélanome, modifiés génétiquement et n'exprimant plus PD-1 (LT CD8⁺ PD-1 KO), dans le but de potentialiser la réponse anti-tumorale. Ce projet a été développé en collaboration avec l'équipe 3 du CRCINA qui a généré les cellules génétiquement modifiées. Dans ces expériences d'associations thérapeutiques, l'immunothérapie est réalisée par un transfert adoptif de LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques du complexe HLA-A2-Melan A/Mart1, antigène tumoral qui est exprimé à la surface des cellules M113^{WT} et M113^{PD-L1+}. Les expériences ont aussi été réalisées avec des cellules contrôles : les LT CD8⁺ parentaux exprimant PD-1 (LT CD8⁺ WT). L'avidité fonctionnelle et la fonction effectrice cytotoxique des LT CD8⁺ WT et des LT CD8⁺ PD-1 KO sont similaires (Marotte et al. article soumis).

I. L'association RIV- α anti-PD-L1 et transfert adoptif de LT PD-1 KO améliore la réponse anti-tumorale et la survie

Pour étudier cette association thérapeutique, 7 jours après greffe d'une tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+}, la RIV- α a été réalisée par injection en *i.v* de 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Le transfert adoptif a ensuite été effectué par 3 injections soit de $5 \cdot 10^6$ LT WT, soit de $5 \cdot 10^6$ LT PD-1 KO à 1, 14 et 21 jours après la RIV, soit 8, 15 et 22 jours après la greffe tumorale. La réponse aux traitements a été évaluée par un suivi de la croissance tumorale et du taux de survie des animaux. Les associations thérapeutiques ont été comparées à chacune des thérapies, RIV et transferts adoptifs, seules, ainsi qu'à un groupe contrôle non traité ayant reçu du PBS (**figures 63 et 64**).

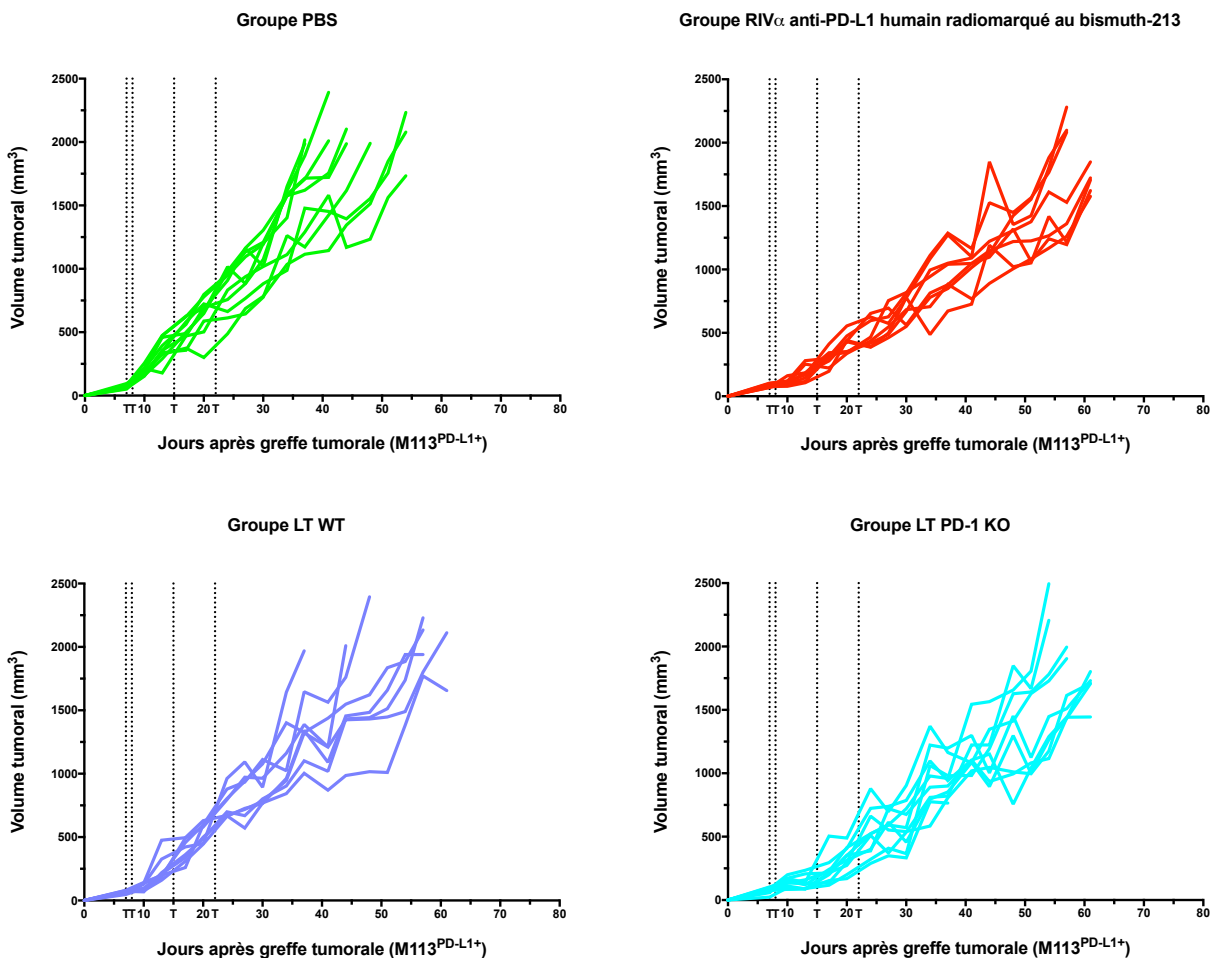
Dans le groupe contrôle PBS, la progression tumorale a été constante au cours du temps jusqu'au volume limite. Le transfert adoptif de LT WT seul n'a pas eu d'impact significatif sur la croissance tumorale comparé au contrôle. Au contraire, la RIV- α ainsi que le transfert adoptif de LT PD-1 KO, en monothérapie ont induit un retard de la croissance tumorale par rapport au

contrôle (**** $p < 0,0001$). Il n'y a cependant pas de différence significative entre les deux groupes traités par ces thérapies

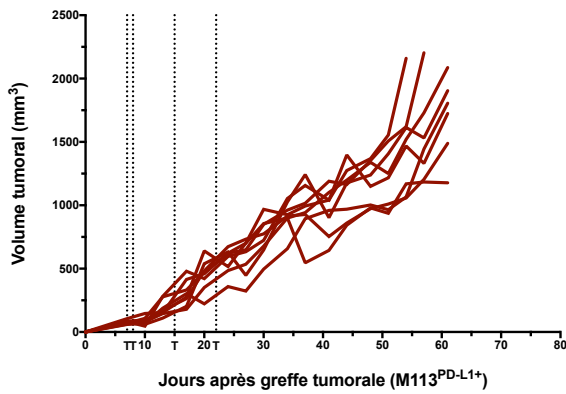
Chaque association thérapeutique, excepté le groupe ACT LT WT, a induit un retard dans le développement tumoral par rapport au contrôle (**** $p < 0,0001$). Cependant, il n'y a pas de différence significative au niveau du développement des tumeurs entre le groupe traité par la combinaison thérapeutique RIV- α + LT WT et le groupe RIV- α seule, démontrant que dans cette combinaison l'effet anti-tumoral est uniquement lié à la RIV.

Au contraire, le groupe traité par la combinaison thérapeutique RIV- α + LT PD-1 KO présente le retard le plus important dans le développement tumoral. Cette inhibition est significativement plus importante que dans le groupe traité par RIV- α seule (***, $p = 0,0004$) ou le groupe traité par transfert adoptif de LT PD-1 KO seul (**, $p = 0,0015$).

Les résultats montrent que les traitements par RIV- α anti-PD-L1 seule ou LT PD-1 KO seul, ont une efficacité anti-tumorale similaire au niveau du développement tumoral. La thérapie combinée RIV- α anti-PD-L1 + LT PD-1 KO présente cependant le plus fort ralentissement dans la progression tumorale ce qui démontre l'intérêt de cette association thérapeutique.



Groupe RIV α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 + LT WT



Groupe RIV α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 + LT PD-1 KO

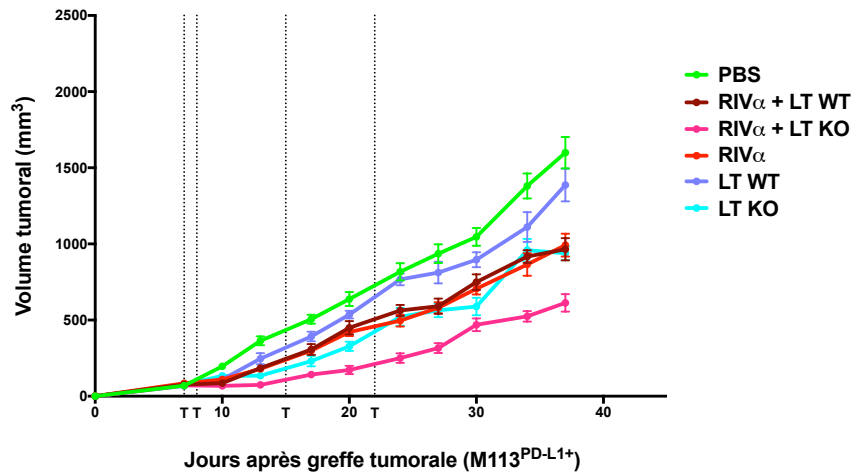
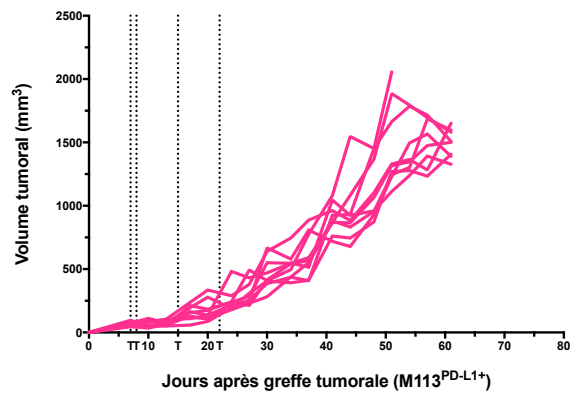


Figure 63 : Développement tumoral après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques.

7 jours après greffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en s.c, les animaux ont été traités avec une injection en i.v de 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Un transfert adoptif de LT WT ou de LT PD-1 KO a été réalisé à 8, 15 et 22 jours après greffe. Le groupe contrôle a reçu du PBS (n=10). Groupe traité par RIV- α + LT WT (n=8). Groupe traité par RIV- α + LT PD-1 KO (n=9). Groupe traité par RIV- α (n=9). Groupe traité par LT WT (n=8). Groupe traité par LT PD-1 KO (n=10). Les résultats présentent le volume tumoral de chaque animal en fonction du temps après greffe ou la moyenne des volumes tumoraux avec les écart-types pour chaque condition en fonction du temps.. Les animaux sont sacrifiés lorsque le volume tumoral atteint approximativement 2000 mm³. L'analyse statistique a été réalisée avec une ANOVA à deux voies suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey.

Parallèlement au développement tumoral, une étude de survie a été réalisée (**figure 64**).

Les médianes de survie des groupes traités par monothérapie RIV- α , LT PD-1 KO ou LT WT sont de 64, 59 et 56 jours respectivement contre 44 jours pour le groupe contrôle. Les augmentations de survie entre chacun de ces groupes traités et le groupe contrôle sont significatives (** $p=0,0005$ et ** $p=0,0006$ et * $p=0,0178$ respectivement). Quant aux

combinaisons thérapeutiques RIV- α + LT WT et RIV- α + LT PD-1 KO, les médianes de survie sont de 64 et 71 jours.

La médiane de survie du groupe traité par RIV- α + LT WT est identique à celle du groupe traité uniquement par RIV- α seule ce qui montre que dans cette association thérapeutique la RIV contribue principalement à l'augmentation de la survie des animaux .

La médiane de survie la plus importante est observée dans le groupe traité par la combinaison thérapeutique RIV- α + LT CD8⁺ PD-1 KO, et cette augmentation de survie est très significative par rapport au groupe contrôle PBS (****p<0,0001).

Le retard de croissance tumorale induite par les différentes thérapies s'accompagne d'une augmentation de la survie. L'association thérapeutique RIV- α + LTCD8⁺ PD-1 KO qui génère l'effet anti-tumoral le plus important, induit également l'augmentation de la médiane de survie la plus importante.

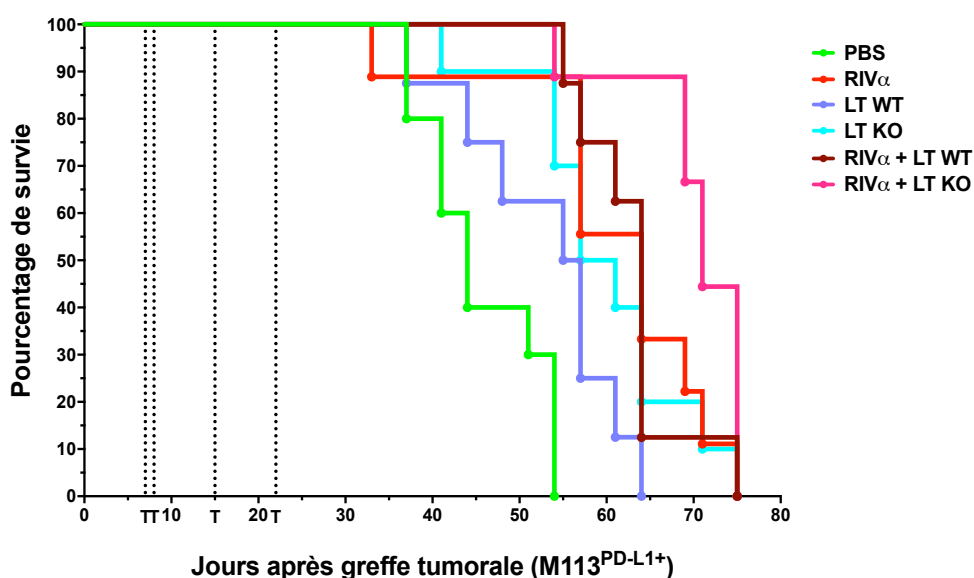


Figure 64 : Courbes de survie après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques.

7 jours après greffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en s.c, les animaux ont été traités avec une injection en i.v de 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Un transfert adoptif de LT WT ou LT PD-1 KO a été réalisé 8, 15 et 22 jours après greffe. Le groupe contrôle a reçu du PBS (n=10). Groupe traité par RIV- α + LT WT (n=8). Groupe traité par RIV- α + LT PD-1 KO (n=9). Groupe traité par RIV- α (n=9). Groupe traité par LT WT (n=8). Groupe traité par LT PD-1 KO (n=10). La survie de la souris a été analysée jusqu'à ce que le volume de la tumeur atteigne 2000 mm³. L'analyse statistique a été réalisée avec un test de log-rank

II. Analyse de la toxicité hématologique après association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques

Un suivi hématologique a également été effectué lors de cette étude préclinique. Le nombre d'érythrocytes et de plaquettes ont été comptés 7 jours avant la greffe en référence de numération initiale (T0), puis 34 jours après la greffe en numération intermédiaire et au moment du sacrifice des animaux.

Aucune différence significative du nombre d'érythrocytes n'est observée ni au sein de chaque groupe aux trois temps du suivi, ni entre les groupes que les animaux aient été traités ou pas (**figure 65 A**). Les différents traitements seuls ou en combinaison n'ont donc aucun impact sur les érythrocytes.

En ce qui concerne les plaquettes, leur numération reste stable au cours du temps pour le groupe contrôle PBS, et les groupes ayant été traités avec les immunothérapies seules, soit par injection de LT CD8⁺ PD-1 KO, soit par injection de LT WT. Au contraire, une diminution significative des plaquettes est observée pour l'ensemble des groupes ayant reçu une RIV- α seule ou en combinaison avec une immunothérapie (**figure 65 B**). Cette baisse est significative au temps intermédiaire et le demeure jusqu'au moment du sacrifice. Ces résultats confirment le fait que l'injection de 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 induit une toxicité hématologique au niveau des plaquettes qui persiste dans le temps.

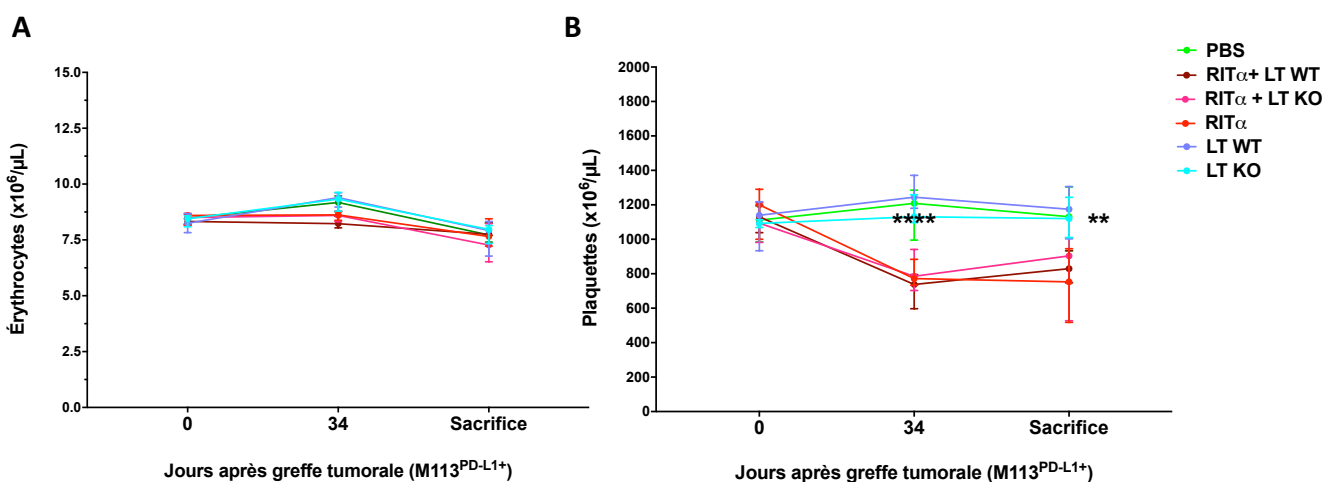


Figure 65 : Toxicité hématologique après traitement par RIV- α , transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques ou association thérapeutique RIV- α et transfert adoptif de LT CD8⁺ spécifiques.

7 jours après greffe de la tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+} en *s.c.*, les animaux ont été traités avec une injection en *i.v.* de 125 kBq/g d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Un transfert adoptif de LT WT ou LT PD-1 KO a été réalisé 8, 15 et 22 jours après greffe. Le groupe contrôle a reçu du PBS (n=10). Groupe traité par RIV- α + LT WT (n=8). Groupe traité par RIV- α + LT PD-1 KO (n=9). Groupe traité par RIV- α (n=9). Groupe traité par LT WT (n=8). Groupe traité par LT PD-1 KO (n=10). **A.** Le nombre d'hématies, **B.** de nombre de plaquettes ont été déterminés avant la greffe, 34 jours après greffe et au moment du sacrifice. Les courbes représentent la médiane et les barres représentent l'écart-type. L'analyse statistique a été réalisée avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de comparaisons multiples de Sidak.

Chapitre IV : Développement d'une immuno-TEP anti-PD-L1 humain au zirconium-89.

Dans l'objectif de visualiser *in vivo* le développement tumoral, la réponse aux traitements ainsi que l'évolution de l'expression de PD-L1 au niveau de la tumeur, nous avons dans le troisième objectif mon travail de thèse initié le développement d'une immuno-TEP/CT anti-PD-L1 radiomarké au zirconium-89 (demi-vie 78,41h) dans le même modèle préclinique de mélanome humain.

Pour cela, à 7 et 15 jours après greffe d'une tumeur de mélanome humain M113^{PD-L1+}, une analyse par immuno-TEP/CT a été réalisée à la suite d'une injection en *i.v* de 2,5 MBq d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarké au zirconium-89. Des images de coupes coronales ont été acquises à 24h, 48h et 72h après injection du traceur (**figure 66**). Une souris sans tumeur a été étudiée en parallèle.

Dès 7 jours, la tumeur M113^{PD-L1+} est visible sur les acquisitions faites 48h après l'injection du traceur. La fixation à la tumeur augmente jusqu'à 72h. Les tumeurs de 15 jours sont détectées dès l'acquisition faite 24h après injection de l'AcM radiomarké, l'accumulation du traceur continue à 48h et se stabilise à 72h.

Cependant dès 24h un marquage non spécifique au niveau des os est détecté et s'intensifie jusqu'à 72h (plus précisément au niveau des épiphyses des os longs, les os du crâne et les os du squelette vertébral jusqu'à la queue). Le marquage du squelette est dû à la fixation de zirconium-89 libre, en lien avec un manque de stabilité du radiomarkage. D'autre part une fixation au niveau de la rate et du foie est remarquée à tous les temps. La fixation au foie est vraisemblablement non spécifique, par contre l'antigène PD-L1 étant exprimé dans les organes lymphoïdes peut expliquer la fixation au niveau de la rate.

Ces premiers essais d'immuno-TEP anti-PD-L1 radiomarké au zirconium-89 ont permis de montrer qu'il était possible de visualiser les tumeurs de mélanome M113^{PD-L1+} dès 7 jours. Il nous sera donc possible d'analyser la réponse tumorale *in vivo* à partir du début des thérapies. Cependant, l'importante fixation osseuse, impose d'améliorer le radiomarkage de l'AcM anti-PD-L1 et la stabilité de l'AcM radiomarké. Alternativement, le radiomarkage peut être réalisé avec du cuivre-64. Ces études se poursuivent actuellement.

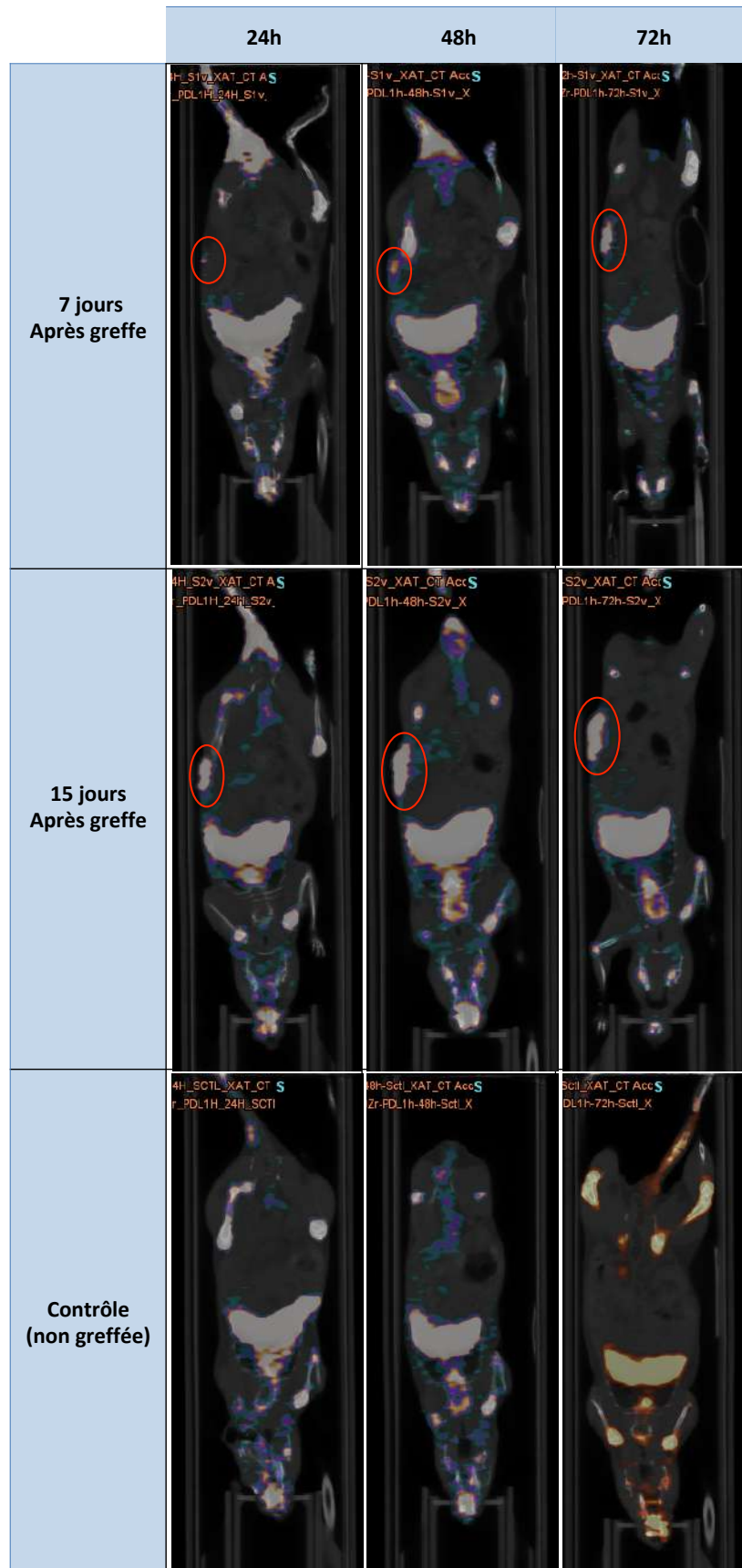


Figure 66 : Immuno-TEP/CT avec l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au zirconium-89.

Une immuno-TEP/CT est réalisée 7 et 15 jours après la xéno greffe en *s.c* de la lignée M113^{PD-L1+}, la souris contrôle n'est pas greffée. Les images sont obtenues à 24h, 48h et 72h après l'injection en *i.v* de 2,5 MBq d'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au zirconium-89 (n=3/temps). L'ovale rouge indique la tumeur. Les images ont été obtenues avec une microTEP/CT Inveon (Siemens Preclinical Solutions).

Discussion

Le mélanome bien qu'il ne représente que 3,1 % de l'ensemble des cancers de la peau, il possède un haut potentiel métastatique qui fait de lui le cancer cutané le plus agressif et le plus mortel. Au stade métastatique le mélanome est réfractaire à la chimiothérapie. C'est pourquoi les thérapies ciblées ont été développées dont le Vemurafenib qui a augmenté la médiane de survie des patients d'environ 2 mois par rapport à la chimiothérapie de référence, la Dacarbazine (Curti & Urba 2012). Cependant, seuls les patients porteurs de la mutation BRF^{V600E} sont éligibles pour ce traitement, à savoir 50% des cas de mélanomes, ce qui restreint son utilisation (Wellbrock 2010). L'arrivée de l'immunothérapie avec l'utilisation d'anticorps bloquants a révolutionné la prise en charge médicale des patients. Par conséquent, en 2018, le prix Nobel de physiologie et de médecine a été décerné à James Allison et Tasuku Honjo pour leur découverte des protéines de contrôle du système immunitaire, CTLA-4 et PD-1 respectivement. Des anticorps monoclonaux bloquant anti-CTLA4 (Ipilimumab) et anti-PD-1 (Nivolumab ou Pembrolizumab) ont été développés et utilisés dans le traitement du mélanome afin de lever l'inhibition des fonctions effectrices lymphocytaires. Le nivolumab est utilisé en première ligne de traitement pour les mélanomes métastatiques de stade III et IV. Il a permis une augmentation de la survie des patient à 5 ans de 44 % (source : European Society for Medical Oncology 2019) néanmoins le taux de réponses objectives de 40%, reste limité (Robert 2015, 2019).

En cancérologie, une des stratégies thérapeutiques prometteuses est la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Elle allie la spécificité d'un vecteur qui peut être immunologique avec la toxicité d'un radio-isotope. Dans le mélanome, les RIV ciblaient initialement un antigène intracellulaire, la mélanine libérée par les cellules tumorales qui nécrosent. Allen et *al.* ont récemment démontré, dans une étude préclinique comparant une RIV- β au lutetium-177 et une RIV- α au bismuth ciblant la mélanine, la supériorité des émetteurs α (Allen 2019). Ces résultats semblent être liés aux caractéristiques physiques des émetteurs α (TEL élevé, faible parcours dans les tissus évitant la toxicité sur les tissus sains environnants) et à leur efficacité qui ne dépend que faiblement du degré d'oxygénation des tissus ou de l'état du cycle cellulaire (Baidoo 2013). Par ailleurs, une meilleure compréhension des caractéristiques spécifiques des mélanocytes et des cellules de mélanome ont permis le développement de RIV ciblant des antigènes de surface dont MC1R, VLA-4 et MSCP. Néanmoins, à notre connaissance aucune étude analysant le ciblage direct par la RIV d'immune check point dont PD-L1, n'a été entreprise. Le ligand PD-L1 semble être une cible thérapeutique appropriée dans les stratégies anti-tumorales puisqu'il est exprimé à la surface des cellules de mélanome et des cellules immunitaires tolérogènes pro-tumorales.

C'est dans ce contexte que dans la première partie de ma thèse de doctorat, nous nous sommes intéressés au développement et à l'étude *in vivo* d'une RIV- α anti-PD-L1 radiomarqué au

bismuth-213, dans le traitement du mélanome humain dans un modèle préclinique murin immunodéficient. Le but de cette étude était d'apporter une **preuve de concept de la RIV- α dans le traitement d'une tumeur solide, le mélanome, en ciblant un antigène de surface, PD-L1.**

Les expériences menées ont nécessité l'obtention d'une lignée de mélanome humain exprimant stablement la protéine PD-L1 (lignée M113^{PD-L1+}) après transfection d'une lignée parentale issue d'une métastase de mélanome d'un patient (lignée M113^{WT}). Cette transfection était nécessaire puisque les cellules de mélanome en culture *in vitro* perdent l'expression de PD-L1 en raison de l'absence de l'inducteur principal de l'expression de PD-L1 qui est l'IFN γ (Garcia-Diaz 2017). Après une analyse par cytométrie en flux et par immunohistochimie des cellules M113^{PD-L1+}, cette expression reste stable *in vitro* et *in vivo* jusqu'au jour de la thérapie.

Dans les tumeurs solides dont le mélanome, l'indice mitotique tumoral est élevé, provoquant une réduction de la densité vasculaire au centre de la tumeur (Less 1991). Cette distance et la pression exercée sur les vaisseaux génèrent l'apparition de zones hypoxiques et nécrotiques au centre de la tumeur suite à leur déformation (Padera 2004). Ces zones hypoxiques sont retrouvées dans les modèles de xénogreffes de mélanome au centre tandis que les zones en périphérie sont mieux vascularisées (Simonsen 2012 ; Gaustad 2017). Ces caractéristiques sont retrouvées dans notre modèle de mélanome : l'indice mitotique élevé est reflété par l'expression d'un marqueur de prolifération cellulaire, le Ki67, analysé en immunohistochimie. De plus, l'analyse histologique des tumeurs a révélé la formation d'îlots tumoraux par les lignées M113^{PD-L1+} et M113^{WT}.

Au cours de ces travaux nous avons d'abord démontré que le radiomarquage de l'AcM anti-PD-L1 humain au bismuth-213 n'altérerait pas de façon importante son affinité pour PD-L1, qui est de l'ordre du nanomolaire. Nous avons donc par la suite procédé à une étude de la distribution tissulaire de l'Ac radiomarké. Cette étude a démontré une fixation spécifique de l'Ac radiomarké à la tumeur dès 5 min après injection. Néanmoins un pourcentage élevé de la dose injectée est absorbé par la rate, ce qui est retrouvé régulièrement dans la littérature pour un anticorps entier. Cette fixation est liée en partie par la vascularisation très riche de cet organe, ce qui indique un passage non spécifique de l'Ac radiomarké via la circulation sanguine. Cependant, l'expression de récepteur du fragment constant des Ac pourrait expliquer cette absorption également. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression des récepteur Fc à la rate par une analyse immunohistochimique.

À partir des résultats obtenus de cette biodistribution, une dosimétrie peut être déterminée, cette analyse est en cours de traitement.

La mise en place de cette RIV- α anti-PD-L1 humain a nécessité une escalade de doses de l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarké au bismuth-213 chez des animaux non greffés. Cette étude nous a permis de déterminer les activités utilisables en thérapie, transposables à la dose maximale

tolérée (MTD), dose pour laquelle 100% des animaux survivent. Dans ce modèle murin, elle est de 165 kBq/g, néanmoins elle s'accompagne d'une légère toxicité plaquettaire et médullaire. Compte tenu du nombre limité d'animaux par groupe lors de cette étude (n=3), nous avons décidé d'utiliser en thérapie les activités de 125 et 165 kBq/g.

Les études thérapeutiques menées *in vivo* sur la lignée exprimant PD-L1 (M113^{PD-L1+}) ont démontré que l'AcM anti-PD-L1 humain nu n'a aucun effet thérapeutique, puisqu'il ne retarde pas la progression tumorale ni n'augmente la survie des animaux. Par conséquent les effets obtenus avec la RIV- α sont uniquement dû à la présence de l'AcM radiomarqué au bismuth-213. Les résultats obtenus suite à la RIV- α mettent en évidence un effet anti-tumoral puisqu'une régression importante et significative du volume tumoral est observée ce qui a permis une augmentation de la médiane de survie des animaux dans un modèle tumoral qui se développe très rapidement. Nous avons constaté une baisse persistante des plaquettes jusqu'au sacrifice mais aucune toxicité médullaire à 125 kBq/g n'a été observée contrairement à l'activité 165 kBq/g. Ces résultats ont été confirmés par une étude menée sur la lignée parentale (M113^{WT}) qui n'exprime pas PD-L1. Elle a démontré qu'aucun effet thérapeutique de la RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 n'était observé en l'absence de l'expression de PD-L1, confirmant que cette approche thérapeutique est directement associée au ciblage spécifique de la tumeur

L'ensemble des données de cette première étude a révélé l'efficacité anti-tumorale de la RIV- α anti-PD-L1 humain avec le bismuth-213 dans le traitement du mélanome.

Cependant, le contrôle de la progression tumorale n'est pas total. Dans le but de renforcer les effets thérapeutiques de cette RIV- α , une association avec une autre RIV ciblant un autre antigène tel que la mélanine pourrait être envisagé. En effet comme évoqué précédemment, Allen et al ont démontré l'efficacité thérapeutique du ciblage de la mélanine par un Ac entier radiomarqué au bismuth-213 (Allen 2019). Cependant les effets sont observés 7 jours après l'injection. Ainsi, menée tout d'abord une RIV- α ciblant PD-L1 permettrait d'une part de contrôler dès l'injection la progression tumorale et d'autre part d'induire une mort cellulaire libérant ainsi la mélanine, qui est un antigène intracellulaire, pourrait donc être ciblée ensuite par une deuxième RIV- α . De plus, ils ont obtenu des résultats similaires à ceux obtenus pour la RIV- α anti-PD-L1, à savoir qu'aucune toxicité n'est observée excepté une baisse du nombre de plaquettes, ce qui soutient cette association thérapeutique.

De plus, toujours dans cette optique d'améliorer l'efficacité de cette RIV- α , il a été démontré que l'expression de PD-L1 augmente après irradiation (Hiro Sato 2017). La plupart des traitements en radiothérapie sont réalisés en plusieurs fractions. Ainsi ce phénomène d'augmentation de l'expression de PD-L1 pourrait favoriser la RIV- α anti-PD-L1. Il serait donc intéressant de réaliser une thérapie fractionnée afin de déterminer si les effets thérapeutiques en monothérapie pourraient être renforcés.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux impacts radiobiologiques du bismuth-213 sur les cellules de mélanomes. Les particules α induisent un grand nombre d'ionisations sur une très courte distance provoquant de multiples lésions sur l'ADN, notamment des cassures doubles brins, difficilement réparables (Graf 2014, Kikass 2008) conduisant à la mort cellulaire.

Nous avons tout d'abord analysé l'effet du bismuth-213 sur la prolifération cellulaire. Nous avons constaté une inhibition de la prolifération cellulaire qui est dose-dépendante dès 24h après l'irradiation. Cette inhibition semble être spécifique puisque la lignée M113^{PD-L1+} aux plus basses activités voit sa prolifération diminuer contrairement aux M113^{WT}. Cependant aux fortes doses elles sont toutes les deux affectées de manière comparable, révélant que la présence du bismuth-213 peut induire une inhibition non spécifique de la prolifération (rappelant l'effet « feu croisé »).

À la suite de cette expérience, nous nous sommes placé à la plus forte activité volumique pour analyser d'autres effets radiobiologiques à savoir l'induction de cassures double-brin de l'ADN et l'induction de la mort cellulaire.

Nous avons démontré que l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 induit des cassures double-brin atteignant un maximum à 2h après l'irradiation de façon équivalente chez les deux lignées de mélanome humain.

Ces résultats sont en accord avec une étude menée par notre groupe, qui a montré également la formation de cassures doubles brins dans des cellules de myélome multiple humain et murin avec la BSA radiomarquée au bismuth-213, par un marquage en cytométrie de flux de γ H2AX (Gorin 2015). La signalisation déclenchée par les cassures doubles brins induit l'arrêt transitoire du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN avant les phases critiques du cycle. Si le nombre de cassures doubles brins est trop important la cellule sera éliminée par apoptose (Houtgraaf 2006). Nous avons ensuite cherché à identifier les mécanismes de mort cellulaire résultants de l'irradiation par le bismuth-213. Le marquage à l'Annexine V et à l'iodure de propidium a démontré une importante induction de mort par apoptose chez les deux lignées.

La formation de cassures double-brin et l'induction de la mort cellulaire devraient être analysée aux activités volumiques les plus faibles afin de déterminer s'il existe une différence entre ces deux lignées, ce qui a été observé lors de l'étude de la prolifération cellulaire.

L'immunodéficiência des souris utilisées dans notre modèle empêche l'analyse *in vivo* de la réponse immunitaire endogène, nous avons cependant déterminé *in vitro* si le bismuth-213

induisait une mort immunogène pouvant potentiellement stimuler le système immunitaire. En effet l'irradiation favorise la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IFN β et le TNF α qui participent à l'effet cytotoxique de l'irradiation sur les tumeurs (Formenti & Demaria, 2013; Burnette 2011). L'IFN β sécrété par les cellules tumorales suite à la formation et à la détection de cassures doubles brins par le système cGAS/STING/IRF3 induit à son tour par un effet autocrine ou paracrine la production d'une chimiokine, le CXCL10 (Vanpouille-Box 2017 ; Chanut 2019) favorisant le recrutement des LT CD8⁺ effecteurs (Gebremeskel 2015). De plus, la mort immunogène fait intervenir des DAMPS libérés dans le milieu extracellulaire par les cellules tumorales dont HMGB1 permettant le chimiotactisme des LT et des DC, améliorant également leur capacité de présentation antigénique (Hagemann 2007, Gorin 2015).

Nous avons analysé *in vitro* la libération d'IFN β , de CXCL10 et HMGB1 par les cellules de mélanome irradiées par l'AcM anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213. Nous avons observé une libération importante et significative d'IFN β et de CXCL10 par la lignée M113^{PD-L1+} dès 24h avec un maximum à 48h après irradiation par le bismuth-213. La cinétique de libération de ces molécules est en phase avec l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

Concernant HMGB1, sa concentration sérique elle augmente chez des patients atteints de mélanome primaire et métastatique (Huber 2016). Il semblerait que HMGB1 peut être surexprimé et libéré de manière progressive au cours du temps après l'irradiation de cellules tumorales favorisant la prolifération cellulaire par effet paracrine (He 2018). Tandis que nous observons que HMGB1 est produit et libéré de façon rapide et importante uniquement à 24h après l'irradiation des cellules M113^{PD-L1+}. Il est probable que cette augmentation rapide et importante peut avoir un effet différent puisque des études ont démontré que la sécrétion de HMGB1 suite à une chimiothérapie ou une radiothérapie était nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale (Apetoh 2007 ; Gorin 2014). Il serait intéressant de déterminer si cette production a lieu avant 24h.

Au vu de ces résultats, l'Ac anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213 induit la formation de cassures double-brin de l'ADN bloquant la prolifération cellulaire et amenant à une mort par apoptose qui est immunogène.

En 1975, Milas et *al.* proposèrent que l'association de la radiothérapie à un autre traitement (inoculation de bactéries) renforcerait les effets anti-tumoraux en stimulant le système immunitaire. Trente ans plus tard, Demaria et collaborateurs énoncèrent le concept : « exploiter la radiothérapie pour aider l'immunothérapie ». C'est dans cette optique que notre équipe a mené une étude préclinique dans le but d'analyser l'effet thérapeutique de l'association d'une RIV- α avec un AcM anti-CD138 radiomarqué au bismuth-213 et une immunothérapie basée sur le transfert adoptif de LT CD8⁺ cytotoxiques dans un modèle préclinique de myélome multiple murin

syngénique. La combinaison thérapeutique ou les monothérapies retardent de manière significative la croissance tumorale et augmentent la survie par rapport au contrôle. Une potentialisation de ces deux thérapies est observée, la combinaison de la RIV- α et de cette immunothérapie est plus efficace que les monothérapies dans le contrôle de la progression tumorale (Ménager 2015).

Dans le prolongement de la première étude de la RIV- α anti-PD-L1 humain radiomarqué au bismuth-213, nous avons **évalué le potentiel thérapeutique de l'association de cette RIV- α anti-PD-L1 humain et d'une immunothérapie basée sur le transfert adoptif de LT CD8⁺ cytotoxiques anti-Melan-A/MART-1 exprimant ou non le co-récepteur inhibiteur PD-1**. Cette association thérapeutique a été réalisée chez le même modèle murin de xénogreffe de mélanome humain exprimant PD-L1.

Chez les patients, Les LT CD8⁺ cytotoxiques activés exprimant PD-1 voient leurs fonctions effectrices inhibées par le microenvironnement tumoral immunosuppresseur (expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou les DC tolérogènes). L'injection d'anticorps bloquant anti-PD-1 lève l'inhibition et restaure leurs fonctions. Ainsi l'inactivation de l'expression du gène PD-1 dans les LT avant l'ACT a été effectuée dans le but de s'affranchir de l'administration d'AcM anti-PD-1.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que dans les groupes traités avec les monothérapies RIV- α et LT PD-1 KO, la progression tumorale est retardée et la survie des animaux est augmentée de manière significative et comparable. Le groupe LT WT n'a aucun effet thérapeutique. La combinaison thérapeutique de la RIV- α et des LT WT induit des résultats similaires au groupe RIV- α seule, ce qui signifie que les résultats obtenus sont uniquement liés à la présence de la RIV- α . Les résultats les plus impressionnants sont obtenus avec l'association RIV α + LT PD-1 KO. Les animaux présentent une diminution de la croissance tumorale qui est associée à une augmentation également importante et significative de la survie.

L'analyse de la toxicité hématologique révèle une baisse du nombre de plaquettes pour l'ensemble des groupes ayant reçu une RIV- α , comme le démontrent les expériences de RIV- α précédentes.

L'ensemble des données démontre que la RIV- α est tout aussi efficace que le transfert adoptif de LT PD-1 KO (contrairement au transfert adoptif de LT WT). Nous avons pu potentialiser l'efficacité thérapeutique de ces deux thérapies en les combinant. Cela montre également que l'absence du récepteur PD-1 protège d'une inhibition de ces LT activés par l'engagement de PD-L1 exprimé sur les cellules de mélanome.

À long terme il serait intéressant de passer à un modèle immunocompétent syngénique de mélanome murin afin de déterminer si l'irradiation par la RIV- α anti-PD-L1 radiomarqué au bismuth-213 induit une mort immunogène et un phénomène d'épitope spreading (« extension/libération d'épitopes ») (Hardwick 2011). En effet, ces phénomènes activeraient les cellules dendritiques et ainsi une réponse immunitaire T endogène qui serait théoriquement amplifiée et renforcée par le transfert adoptif de LT PD-1 KO.

Par ailleurs, cette étude pourrait être complétée par une analyse *ex vivo* sur des tumeurs M113^{WT} et M113^{PD-L1+} à différents temps après l'injection de l'anticorps radiomarqué pour confirmer si une mort immunogène est induite, notamment la sécrétion de CXCL10 qui pourrait favoriser le recrutement des LT injectés.

Une étude dans le glioblastome traité par la RIV- α utilisant un AcM radiomarqué à l'actinium-225 ciblant une cadhérine modifiait la matrice extracellulaire et les vaisseaux sanguins permettant l'accès à la dasatinib, une thérapie ciblée (Behling 2016). Dans notre modèle préclinique, il a été observé que les LT WT et PD-1 KO utilisés en thérapie se retrouvent massivement en périphérie et s'infiltrèrent faiblement et graduellement dans les îlots tumoraux (résultats Equipe 3 CRCINA). Il serait intéressant d'analyser si la RIV- α permettrait une modification de la MEC permettant l'accessibilité au sein de la tumeur des LT ce qui pourrait expliquer en partie la potentialisation de ces deux thérapies.

Il serait intéressant d'analyser *in vivo* l'évolution de l'expression de PD-L1 par immuno-TEP qui semble être un outil approprié pour déterminer la méthode et la cinétique des injections des thérapies. C'est pourquoi nous avons commencé le **développement d'une Immuno-TEP/CT utilisant le même AcM administré en thérapie radiomarqué au zirconium-89**. Les premières images révèlent une bonne résolution et détection de la tumeur au moment de la thérapie, lorsque les masses tumorales sont petites, difficiles à palper et tout juste mesurables. Cependant, dans nos mains, l'instabilité du radiomarquage génère un bruit de fond très important avec une fixation du zirconium-89 libre dans la trame osseuse. Cette libération n'est pas due à la métabolisation par le foie, puisque dès 24h nous avons une fixation non spécifique sur les os. C'est pourquoi en parallèle de l'amélioration du radiomarquage, une immuno-TEP utilisant au cuivre-64 sera réalisée.

Pour résumer, l'ensemble des résultats précliniques apporte la preuve de concept de l'efficacité de la RIV- α dans le traitement du mélanome. Ce qui pourrait représenter une alternative thérapeutique pour les patients qui ne sont pas éligibles pour des thérapies ciblées anti-BRAF^{V600E} ou qui ne répondent pas aux immunothérapies. Pour la première fois dans le

traitement d'une tumeur solide, l'association thérapeutique de la RIV- α et le transfert adoptif de LT CD8⁺ PD-1 KO a permis par potentialisation une augmentation de l'activité anti-tumorale ralentissant la progression tumorale et augmentant la survie des animaux. L'analyse de la radiobiologie du bismuth-213 a confirmé que cet émetteur α induit une mort immunogène suite à l'induction de cassures doubles brins provoquant une mort principalement par apoptose et induisant la libération d'IFN β , CXCL10 et HMGB1, dont la cinétique correspond au moment du transfert adoptif de LT *in vivo*.

Annexe

Annexe n°1 : Article scientifique

Revue soumise au JNM

Premier auteur

1 **Anti-tumor efficacy of TAT targeting PD-L1 in a human melanoma xenograft model**

2

3 Marisa Capita¹, Justine Perrin¹, Sylvain Simon¹, Sébastien Gouard¹, Nicolas Chouin^{1,2}, Frank
4 Bruchertseifer³, Alfred Morgenstern³, Latifa Rbah-Vidal¹, Michel Chérel^{1,4}, Emmanuel Scotet¹,
5 Nathalie Labarrière¹, Yannick Guilloux¹, Joëlle Gaschet^{1*}

6

7 ¹ CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

8 ² Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes, France

9 ³ European Commission, Joint research centre, Institute for Transuranium Elements,
10 Karlsruhe, Germany

11 ⁴ Nuclear Medicine Department, ICO-René Gauducheau Cancer Center, Saint-Herblain,
12 France

13

14

15

16 * **Correspondence to :**

17 Joëlle Gaschet, CRCINA Inserm U1232, 8 Quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1

18 Joelle.Gaschet@univ-nantes.fr

19 **ABSTRACT**

20

21 PD-L1, the ligand for PD-1 inhibitory receptor, is expressed on various tumors and its
22 expression is correlated with a poor prognostic in melanoma. Anti-PD-L1 mAbs have been
23 developed along with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies for immune checkpoint inhibitor
24 (ICI) therapy and anti-PD-1 mAbs are now used as first line treatment in melanoma. However,
25 many patients do not respond to ICI therapies and therefore new treatment alternatives should
26 be developed. Because of its expression on the tumor cells and on immunosuppressive cells
27 within the tumor microenvironment, PD-L1 represents an interesting target for targeted alpha-
28 therapy (TAT). **Methods:** we developed a TAT approach in a human melanoma xenograft
29 model that stably expresses PD-L1 using a ²¹³Bi-anti-human-PD-L1 mAb. Evaluation of
30 treatment efficacy and targeting specificity was done in parallel with unlabeled anti-hPD-L1
31 mAb and in mice bearing melanoma xenograft tumors that do not express PD-L1. Cytokine
32 release from bismuth-213 irradiated melanoma cells was also assessed *in vitro*. **Results:** TAT
33 targeting PD-L1 significantly delayed melanoma tumor growth and improved animal survival.
34 A slight decrease in platelets was observed but no toxicity on red blood cells, bone marrow,
35 liver or kidney was induced. Anti-tumor efficacy was associated with specific tumor targeting
36 since no therapeutic effect was observed in animals bearing PD-L1 negative melanoma
37 tumors. Melanoma cells incubated *in vitro* with ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb secreted significant
38 amounts of IFN β , HMGB1, and CXCL10, molecules that can stimulate immune cells.
39 **Conclusion:** This study demonstrates that anti-PD-L1 antibodies may be used efficiently for
40 TAT treatment in melanoma. TAT can also induced immunogenic cell death of melanoma cells
41 and therefore could potentiate an anti-tumor immune response.

42

43 **Keywords:** TAT, PD-L1, melanoma, bismuth-213, alpha-particles

44 INTRODUCTION

45

46 PD-L1 (Programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274) is the primary ligand for PD-1 inhibitory
47 receptor (1). PD-L1 is constitutively expressed among various immune cells like T-cells, B-
48 cells, macrophages and dendritic cells (DC) and upregulated upon activation (2,3). Its function
49 is not limited to inhibiting effector T-cells, as PD-L1 can induce Tregs in the periphery (iTregs)
50 and sustain their suppressive functions (4). PD-L1 is also expressed by various tumor cells,
51 like melanoma non-small-cell lung carcinoma (NSCLC), triple-negative breast cancer (TNBC)
52 as well as within the tumor microenvironment, on tumor-associated macrophages (TAM) and
53 myeloid-derived suppressor cells (MDSC) (5-9). In this context, PD-L1 expression results from
54 pro-inflammatory stimuli and is subjected to a complex regulation (10,11). In melanoma, it has
55 been shown that IFN γ produced by tumor infiltrating T-lymphocytes (TILs) is the main factor
56 inducing expression of PD-L1 (12,13). Indeed, in biopsies of melanoma patients, colocalization
57 of PD-L1 expressing tumor cells, CD8+ TILs and IFN γ has been observed, and heterogenous
58 expression of PD-L1 was related to the T-cell infiltrate (14). In addition, hypoxia, a frequent
59 feature of solid tumors, and hypoxia inducible factor, HIF-1 α , may also contribute to PD-L1
60 regulation in tumor in its microenvironment (9,15). PD-L1 expression is considered to be one
61 of the major tumor escape mechanisms and has been correlated with a more aggressive
62 phenotype (16-18). Several anti-PD-L1 mAbs, atezolizumab, avelumab and durvalumab have
63 been developed as immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy molecules and, based on their
64 promising results in patients, have been recently approved for clinical use by the FDA and
65 EMA (19-21).

66

67 PD-L1 represents also a potent biomarker to select forefront the patients who can benefit from
68 ICI therapy and to evaluate response to treatment. So far, PD-L1 is determined by
69 immunohistochemistry (IHC). However IHC has several limitations related to the
70 heterogeneous expression of the molecule (22,23). Therefore, numerous clinical trial are

71 currently awaited or ongoing to assess reliability and sensitivity of *in vivo* molecular imaging
72 using anti-PD-L1 mAbs radiolabeled with positron emitting radionuclides that is immuno-PET
73 (positron emission tomography) imaging (24). In a preclinical study evaluating PD-L1 as target
74 for molecular imaging in an immunocompetent breast cancer model, Josefsson et al. provided
75 biodistribution and dosimetry data supporting the feasibility of using a radiolabeled anti-PD-L1
76 mAb not only for molecular imaging but also for targeted radionuclide therapy (TRT) (25). The
77 ideal radionuclide to use for such TRT application would associate high toxicity to kill the tumor
78 cells and the immunosuppressive cells within the tumor microenvironment, a short range of
79 action to preserve surrounding healthy tissues and the potency of stimulating immunity to
80 provide an immune modulation.

81

82 Targeted alpha-particle therapy (TAT) is a TRT modality based on the use of alpha-particle
83 emitters delivered specifically to the tumor by the mean of a vector, usually a mAb or a peptide.
84 The alpha decay energy is comprised between 5 to 9 MeV along a short linear path in the
85 tissues ranging from 50 à 100 μm , their linear energy transfer (LET) is therefore very high (50
86 to 230 $\text{keV}/\mu\text{m}$) and provides a high cytotoxic potential. Moreover, the radiobiological effects
87 of this type of radionuclides are largely independent of dose rate, oxygenation or cell
88 proliferation (26). Therefore alpha-particle emitters are considered as interesting anti-tumor
89 agents for micrometastases, residual tumors and hematological cancers (27). We previously
90 demonstrated that among alpha-particle emitters, bismuth-213 (^{213}Bi), could modulate the
91 immune system by inducing immunogenic cell death which could greatly potentiate anti-tumor
92 efficacy (28,29). Besides these observations, TAT in a preclinical immunocompetent
93 melanoma model using ^{213}Bi -anti-melanin mAb has been shown to significantly delay tumor
94 growth (30). In the clinic promising results have also been obtained in melanoma patients using
95 ^{213}Bi -anti-MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan) mAb. In a first clinic
96 trial involving 16 patients, the radiolabeled mAb was delivered locally in melanoma lesions. In
97 this context, TAT induced massive cell death with no toxicity (31). In a second trial, the same
98 radiopharmaceutical was delivered systemically in 38 patients developing metastatic

99 melanoma. No major toxicity was observed and the maximum tolerated dose (MTD) was not
100 reached. An objective partial response was observed in 10% of the patients and 15% survived
101 more than 3 years (32,33).

102
103 Considering that PD-L1 expression is correlated with a poor prognostic in melanoma (34,35),
104 that despite very promising clinical results, at best, 40% of metastatic melanoma patients
105 objectively respond to ICI therapy targeting either PD-1 or PD-L1 (36,37), and that PD-L1
106 expression in the tumor and its stroma makes it a most interesting target for TAT, the aim of
107 this study was to develop and investigate TAT using ²¹³Bi-anti-PD-L1 mAb in a preclinical
108 model of human melanoma.

109

110 **MATERIALS AND METHODS**

111

112 **Cells and reagents**

113

114 The M113_{WT} and M113_{PD-L1+} human melanoma cell lines were kindly provided by Dr. Nathalie
115 Labarrière (CRCINA, France). The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco),
116 supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), 100 ug/mL
117 streptomycin (Gibco), 10% heat-inactivated fetal bovin serum (Biosera, South America).
118 M113_{PD-L1+} transfected cells were also supplemented by addition of 0.8 µg/mL of G418. Cells
119 were incubated at 37°C, 5% CO₂, in a humidified-saturated incubator.

120

121 The GoInVivo™ purified anti-human PD-L1 mouse mAb (anti-hPD-L1 mAb), PE-conjugated
122 anti-hPD-L1 mAb (clone 29E.2A3), GoInVivo™ purified mouse IgG2bk isotype control and PE-
123 conjugated mouse IgG2bk isotype control (clone MPC-11) were purchased from Biolegend.
124 PE-conjugated goat anti-mouse IgG, F(ab')₂, was purchased from Jackson ImmunoResearch.
125 Flow cytometry experiments were performed using a FACS Canto II flow cytometer (BD
126 Biosciences) and the events were analysed using the FlowJo software (Treestar).

127

128 Before bismuth-213 radiolabelling, the anti-hPD-L1 mAb and the mouse IgG2bk isotype control
129 were modified using 2-(4-isothiocyanato-benzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepenta-acetic
130 acid (SCN-CHX-A''-DTPA; Macrocyclics) with 20 equivalents of CHX-A''-DTPA in carbonate
131 buffer (0.05 M, pH 8.7). After 12h incubation at 25°C, modified mAbs were purified by high-
132 performance liquid chromatography on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham
133 Biosciences). The mean chelate number per antibody, assessed as previously described (38)
134 using a buffered ammonium acetate lutetium-177 solution, was 2. For bismuth-213
135 radiolabelling, 100 µg of each immunoconjugate was incubated with bismuth-213 eluted from
136 a actinium-225/bismuth-213 generator (Institute for Transuranium Elements, Germany) for 10
137 min at 37°C in 0.8 M ammonium acetate (pH 5.3), 1.5% ascorbic acid. The resulting ²¹³Bi-
138 labeled immunoconjugates were separated from unbound bismuth-213 by size-exclusion
139 chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare). Radiochemical purity was 98.7 ± 1.1
140 %, as determined by instant thin-layer chromatography silica gel (ITLC-SG) using 0.1 M
141 sodium citrate solution (pH 5.3) as mobile phase.

142

143 **Mouse xenograft model**

144

145 Female NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice were purchased from Charles River
146 laboratory, housed and bred at the UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN,
147 University of Nantes, license number: B-44-278) under specific pathogen free conditions.
148 Subcutaneous xenograft tumors were established by injection of 1x10⁶ M113^{PD-L1+} or M113^{WT}
149 human melanoma cells in 100µL PBS (DPBS, ThermoFisher Scientific), into the flank of 8-9
150 weeks old NSG mice. Seven days later, when tumor volumes reached around 80 mm³, mice
151 were randomly allocated into the different experimental groups. For each experiment, frozen
152 M113^{PD-L1+} or M113^{WT} cells were thawed and grown in culture for 10 days before graft.
153 Meanwhile, the absence of mycoplasma contamination was checked using a HEK-Blue
154 Detection Kit (Invivogen) and PD-L1 expression was confirmed by flow cytometry analysis.

155 **Histology and immunohistochemistry staining**

156

157 Tumors were collected, formalin-fixed and paraffin-embedded. Hematoxylin and eosin (H&E)
158 or immunohistochemistry (IHC) staining were performed on 3µm paraffin sections. Expression
159 of PD-L1 was analysed using rabbit anti-human-PD-L1 (E1L3N®, Cell Signaling) or rabbit
160 isotype control (Cell Signaling) primary antibodies, and then using HRP-conjugated secondary
161 antibody. Proliferation was analysed using mouse anti-Ki67 (Clone MIB-1, Dako) or mouse
162 isotype control (BD pharmigen) primary mAbs and HRP-conjugated secondary antibody.
163 Revelation was done using DAB substrate solution and the sections were counterstained with
164 Hematoxylin. Acquisitions were performed using a slide scanners (Nanozoomer, Hamamatsu
165 Photonics).

166

167 **Dose-Escalation Study**

168

169 Naïve 10-11 week old NSG mice received an i.v injection in the vein tail of 125, 165, 210, 335
170 and 395 kBq/g ²¹³Bi-PD-L1 human mAb (n=3 per group) and monitored for 100 days.
171 Experiment was approved by the local veterinary committee (APAFIS #7915) and carried out
172 in accordance with relevant guidelines and regulations. Animals were sacrificed in case of
173 marked distress signs or/and a weight loss greater than 20% of initial body weight.

174

175 **Therapy studies**

176

177 Immunotherapy using unlabeled anti-hPD-L1 mAb was performed on mice bearing M113_{PD-L1+}
178 tumors. On day 7 after tumor graft, animals were treated by *i.v.* injection of either 20 µg (n=10)
179 or 100 µg (n=9) of anti-hPD-L1 mAb in 100 µL PBS, or received only 100 µL PBS (n=7).

180

181 TAT studies were performed on mice bearing M113_{PD-L1+} or M113_{WT} tumors. Seven days after
182 tumor graft, animals were treated by *i.v.* injection in the tail vein of a single dose of either 125

183 kBq/g (n=17) or 165 kBq/g (n=10) ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. TAT control groups received either
184 125 kBq/g (n=10) or 165 kBq/g (n=10) ²¹³Bi-mouse IgG2bk isotype control. Finally, PBS control
185 group received only an injection of 100 μL PBS (n=20).

186

187 Experiments were approved by the local veterinary committee (APAFIS #7823) and carried
188 out in accordance with relevant guidelines and regulations. Animals were monitored two to
189 three times a week. Tumor burden was measured using a caliper and the volume was
190 calculated based the following formula: volume = (LxW²)/2, where L was length and W was
191 width. Mice were sacrificed taking into account the appearance of necrosis in tumors, weight
192 loss greater than 20% of initial body weight, and tumor volume greater than 2 000 mm³.
193 Statistical analyses of tumor volumes were performed using two-way ANOVA followed by
194 Sidak's multiple comparisons, and by log-rank test for survivals.

195

196 **Toxicity Study**

197

198 Hematological toxicity was assessed by numeration of red blood cells and platelets on an
199 automated hematology analyzer (Nihon Kohden). Statistical analysis was performed with two-
200 way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

201

202 Bone marrow, liver and kidney toxicity was assessed on plasma isolated by centrifugation (10
203 min at 600 x g). Each sample was assessed in duplicate. FLT3-Ligand concentration was
204 quantified by ELISA (R&D Systems) following manufacturer's protocol. ASAT (Bioo Scientific),
205 ALT, (Bioo Scientific), urea (BioAssay Systems) and creatine (BioAssay Systems) were
206 quantified using quantitative colorimetric assays following manufacturer's instructions.
207 Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's multiple
208 comparison test.

209

210 **Cytokine detection in culture media**

211

212 M113_{PD-L1+} melanoma cells (0.25 x 10⁶ cells) seeded in 6-well plates were incubated with 0,
213 92.5, 185 and 2 960 kBq/mL ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. Culture supernatants were collected 24,
214 48 and 72h after deposit of radiolabeled mAb, centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4°C, to
215 remove cell debris, and frozen. Supernatants from 3 experiments were analysed in duplicates
216 using ELISA assays directed against IFN β (R&D Systems), HMGB1 (Novus Biologicals) and
217 CXCL10 (R&D Systems) according to manufacturer's protocols. Statistical analysis was
218 performed with two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

219

220 **Statistical analysis**

221

222 Statistical analysis were performed using Prism (GraphPad Software Inc). A p value of 0.05 or
223 less was considered significant.

224

225 **RESULTS**

226

227 **PD-L1 expression on M113_{PD-L1+} and M113_{WT} melanoma cells and xenograft tumors**

228

229 M113_{PD-L1+} melanoma cells have been generated by transfection with *PCDC1* cDNA for stable
230 cell surface expression of PD-L1 (39) since its expression had been lost in M113_{WT} parental
231 cells, derived from a melanoma patient, after *in vitro* culture. PD-L1 expression on both M113_{WT}
232 and M113_{PD-L1+} cell lines was first confirmed on *in vitro* cultures by flow cytometry analysis
233 using saturating concentrations of PE-conjugated anti-PD-L1 mAb or PE-conjugated mouse
234 IgG2bk isotype control (Fig. 1). This staining confirmed that 99% of M113_{PD-L1+} cells express
235 PD-L1 (Fig. 1A). Expression appeared heterogenous on the cells, with 75% expressing high
236 levels and 25% expressing low levels of PD-L1. M113_{WT} cells were negative (Fig. 1B). After
237 subcutaneous engraftment in NSG mice flank, M113_{PD-L1+} and M113_{WT} melanoma tumors
238 reached a volume around 80 mm³ within 7 days. Such tumor volume appeared suitable to

239 investigate TAT efficacy. Therefore we next confirmed *ex vivo* expression of PD-L1 on M113_{PD-}
240 _{L1+} and M113_{WT} melanoma tumors, 7 days after implantation. Hematoxylin and eosin staining
241 demonstrated that cell structure is similar in both type of tumors (Fig. 1C and D). However,
242 immunochemistry staining showed that only M113_{PD-L1+} tumors express PD-L1 (Fig. 1G). PD-
243 L1 expression was not recovered in M113_{WT} cells after *in vivo* implantation (Fig. 1H). No
244 staining were observed with the isotype control (Fig. 1E and 1F). In parallel to PD-L1
245 expression, we also insured that M113_{PD-L1+} and M113_{WT} xenograft tumors were indeed
246 proliferating at the time of TAT treatment. Therefore, a Ki67 immunohistochemistry staining
247 was performed on those tumors collected 7 days after implantation in NSG mice. The Ki67
248 staining demonstrated that cells in both type of tumors are in proliferation at the time we
249 planned on initiating TAT (Fig. S1). Staining also showed a central necrotic zone in the M113_{WT}
250 tumor that may develop early in this xenograft melanoma model (Fig. S1A). These results
251 demonstrated that PD-L1 expression is stable *in vitro* and *in vivo* on M113_{PD-L1+} melanoma
252 cells, and confirmed that M113_{PD-L1+} was a relevant tumor target to assess TAT efficacy, while
253 M113_{WT} tumors that do not express PD-L1 represented a suitable control to evaluate targeting
254 specificity. In addition, both tumors are proliferating 7 days after engraftment when TAT will be
255 performed.

256

257 **Dose escalation study of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb**

258

259 The radiochemical yields of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb were 98.7 ± 1.1 % in all experiments and
260 affinity after radiolabeling was slightly decreased compared to unmodified anti-hPD-L1 mAb
261 (6.5×10^{-9} vs 2×10^{-9} M respectively), but remained in the nanomolar range (Fig. S2) which was
262 high and suitable for the study. A dose escalation study was then performed on naïve NSG
263 mice to define the best activities for TAT. Groups of 3 mice received activities of ²¹³Bi-anti-
264 hPD-L1 mAb ranging from 125 to 395 kBq/g. Kaplan Meier survival curves showed that
265 activities of 395, 335 and 205 kBq/g were highly toxic with median survivals of 9 and 10 days
266 respectively (Fig. 3A). In these groups, mice were sacrificed based on weight loss that was

267 extremely rapid and greater than 20% of initial body weight (Fig. S3). Instead, groups receiving
268 125 and 165 kBq/g ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb survived until the end of the study (Fig. 3A).
269 Hematologic and biochemistry parameters were determined at end point for each mouse and
270 compared to status before injection of the radiopharmaceutical (T0). Hematologic toxicity was
271 assessed by platelet and erythrocyte (RBC) counts. At end point, all the mice injected with 165
272 to 395 kBq/g of radiolabeled anti-hPD-L1 mAb exhibited a significant and dose dependent drop
273 of the platelets compare to T0 (Fig. 3B). The group that received 125 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1
274 mAb demonstrated a slight but not significant decrease in platelet count. No change was
275 observed in any group for RBC count (Fig. 3C). These results indicated that, except with 125
276 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb, all the other injected activities induced significant leucopenia
277 in the animals. In addition to hematologic parameters, bone marrow toxicity was determined
278 by dosing plasma Flt3-ligand concentration (Fig. 3D). At T0, median Flt3-ligand concentration
279 in plasma was 190 pg/mL. A considerable and very significant increase in Flt3-ligand
280 concentration was observed in mice injected with 335 and 395 kBq/g of radiopharmaceuticals,
281 with median concentrations reaching 2058 and 2091 pg/mL respectively. Plasma Flt3-ligand
282 was also increased in the 205 kBq/g group, in particular up to 1618 pg/mL in one mouse that
283 developed acute toxicity. These results demonstrated that acute toxicity observed in the mice
284 injected with activities ranging from 205 to 395 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb was associated
285 with bone marrow impairment. Finally, we also observed some increase in Flt3-ligand
286 concentration in the groups that received 125 et 165 kBq/g of radiolabeled mAb. AST, ALT
287 and urea were also assessed as biochemical parameters of liver and kidney failure. No change
288 was observed for AST or ALT in any group (data not shown). Urea, instead, was increased in
289 all the groups injected the radiopharmaceutical at activities of 205 kBq/g and greater (Fig. 3E).
290 No kidney toxicity was observed in the groups that received 125 et 165 kBq/g of radiolabeled
291 mAb. These results suggested that despite a slight hematologic toxicity on platelets and a
292 minor impact on bone marrow, TAT experiments could eventually be investigated with 125 et
293 165 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb.

294

295 **Assessment of TAT efficacy using ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb in M113_{PD-L1+} melanoma**
296 **xenograft model**

297

298 We first confirmed that anti-hPD-L1 mAb without modification or radiolabeling had no impact
299 on tumor growth or survival in our preclinical melanoma model, by treating M113_{PD-L1+}
300 melanoma tumor bearing mice with 20 and 100 μg of mAb, which were respectively 4 to 20
301 fold the amount of mAb used in TAT experiments (Fig. S4). Then, 7 days after subcutaneous
302 graft of M113_{PD-L1+} melanoma cells, when tumor reached an average volume of 80 mm^3 , TAT
303 was performed by *i.v.* injection of 125 or 165 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb. Control groups
304 included treatment with 125 or 165 kBq/g of IgG2b κ isotype control radiolabeled with bismuth-
305 213 or injection of 100 μL PBS. TAT efficacy was determined based on tumor growth and
306 survival. Mice treated with 125 and 165 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb demonstrated a
307 significant and similar tumor growth delay compared to mice treated with the radiolabeled
308 isotype control at 125 or 165 kBq/g , or to the PBS control mice (Fig. 4A). No difference was
309 observed between these 3 control groups as respect to tumor growth. More precisely, a few
310 days after TAT and throughout the follow up, M113_{PD-L1+} melanoma development was
311 significantly delayed in mice injected with 125 and 165 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb
312 compared to PBS control group (Fig 4B,C) (* $p=0.0313$, *** $p=0.0007$, **** $p<0.0001$). This
313 impact on tumor progression resulted in improved survival. Median survival were indeed of 64
314 and 67 days in the groups treated with TAT at 125 and 165 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb
315 respectively, compared to PBS control group (MS=47.5 days, **** $p<0.0001$), or compared to
316 each relevant ^{213}Bi -IgG2b κ isotype control group at 125 kBq/g (MS=49 days, **** $p<0.0001$) or
317 165 kBq/g (MS=53 days, *** $p=0.0008$). No significant survival difference was observed
318 between the 2 groups treated with TAT using radiolabeled anti-hPD-L1 mAb. However, one
319 mouse died early after injection of 165 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb due to undefined
320 reasons, which implies that this activity may induce acute toxicity. All these results
321 demonstrated that TAT using bismuth-213 and targeting PD-L1 is efficient in this melanoma

322 preclinical model, and suggested that optimal treatment activity is 125 kBq/g.

323

324 **Hematologic toxicity after TAT using ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb in M113 $^{\text{PD-L1+}}$ melanoma**
325 **xenograft model**

326

327 Hematologic toxicity was assessed in animals treated with TAT at 125 and 165 kg/g of ^{213}Bi -
328 anti-hPD-L1 mAb and in PBS control animals. Platelets and RBC counts were evaluated before
329 tumor engraftment (T0), 20 to 28 days after TAT (Intermediate) and at end point (Fig. 5). As
330 already observed during dose escalation study, we noted a significant decrease in platelet
331 numbers in both groups treated with TAT, 20 to 28 days after injection of ^{213}Bi -anti-hPD-L1
332 mAb (**** $p < 0.0001$) and the amount of platelets was not restored at end point (** $p = 0.0023$,
333 **** $p < 0.0001$) (Fig. 5A). TAT had no impact on RBC count (Fig. 5B).

334

335 **Bone marrow, liver and kidney toxicity after TAT using ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb in**
336 **M113 $^{\text{PD-L1+}}$ melanoma xenograft model**

337

338 Toxicity to bone marrow, liver and kidneys was also investigated in the mice treated with TAT
339 or receiving only PBS at end point to compare with status before xenograft (T0) (Fig. 6). Dosing
340 of Flt3-Ligand in plasma showed a significant increase of its concentration at end point in
341 animals treated with 165 kg/g (**** $p < 0.0001$) of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb (Fig. 6A). We observed
342 a similar toxicity with 165 kBq/g of ^{213}Bi -isotype control mAb (data not shown). These data are
343 consistent with the dose escalation study results and confirmed that TAT targeting PD-L1
344 induced some bone marrow toxicity, especially at 165 kg/g, and reinforced the use of 125
345 kBq/g for therapy. No increase was observed for AST, ALT or urea after TAT, attesting that
346 this treatment and the activities selected did not impair liver or kidney function (Fig. 6B, C, D).
347 In addition, weight follow up, as assessed by % weight variation compare to initial body weight,
348 did not demonstrate any major variation between the groups treated with radiolabeled mAb or
349 receiving only PBS (Fig. S5).

350

351 **Assessment of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb efficacy in M113_{WT} melanoma xenograft model**

352

353 Based on anti-tumor response and toxicity study, the previous results demonstrated that TAT
354 should be performed with 125 kBq/g. To confirm that TAT efficacy we observed was a result
355 of a specific tumor targeting, we repeated the same experiment in mice engrafted with M113_{WT}
356 melanoma tumors that do not express PD-L1. Seven days after M113_{WT} tumor graft, animals
357 were treated with either 125 kBq/g of ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb or ^{213}Bi -IgG2b_K isotype control,
358 and control animals received 100 μL of PBS. In this experiment, tumor growth and survival
359 appeared identical in all the groups independently of the treatment received by the animals
360 (Fig. 7). These data demonstrated that TAT efficacy in the M113_{PD-L1+} melanoma xenograft
361 model was indeed achieved because of PD-L1 specific tumor targeting.

362

363 **^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb induces cytokines release from M113_{PD-L1+} melanoma cells**

364

365 We were also interested in studying the impact of bismuth-213 on M113_{PD-L1+} melanoma cells.
366 Although we established a xenograft melanoma model in NSG immunodeficient mice, we
367 decided to evaluate cytokines that are linked to immunity like IFN β , a pro-inflammatory cytokine,
368 HMGB1, a DAMP (damage-associated molecular pattern) and CXCL10, a chemokine, ligand
369 for CXCR3 receptor on T-cells. For this purpose, M113_{PD-L1+} melanoma cells were incubated
370 with 0, 92.5, 185 or 2 960 kBq/mL ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb. Culture medium was collected 24,
371 48 and 72h after incubation with the various radiolabeled anti-hPD-L1 activities, and the
372 different cytokines were quantified by ELISA (Fig. 8). The 3 cytokines were indeed secreted
373 by irradiated melanoma cells but interestingly, each cytokine showed a different secretion
374 pattern. IFN β and HMGB1 secretions were not dose dependent as concentrations appeared
375 quite similar after incubation with 92.5, 185 or 2 960 kBq/mL of radiolabeled mAb. CXCL10
376 release was only significant at 2 960 kBq/mL. In addition, the kinetic of secretion was also

377 different depending on the cytokine. For IFN β , secretion was undetectable at 24h but reached
378 a maximum at 48h that remained stable at 72h after irradiation (Fig. 8A). For HMGB1, release
379 occurred early after deposit of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb and was transient since maximum
380 detection was observed at 24h, back to a basal level at 48h after incubation. Finally for
381 CXCL10, release was significant 48h after addition of radiolabeled anti-PD-L1 mAb and kept
382 increasing at 72H. These results suggested that bismuth-213 can promote immunogenic cell
383 death in M113^{PD-L1+} melanoma cells, by inducing release of molecules such as IFN β , HMGB1
384 and CXCL10, all of which can differently stimulate immune effectors.

385

386 **DISCUSSION**

387

388 Melanoma has a high metastatic potential which makes it the most aggressive and lethal
389 cutaneous cancer. Over the past decade, the development of ICI therapies with the blocking
390 antibodies directed against anti-CTLA-4, anti-PD-1 and anti-PD-L1 has totally change the fate
391 of metastatic melanoma patients thanks to their impressive therapeutic efficacy. However,
392 objective response rate remains limited to 40% (36,37) which means that other therapeutic
393 strategies are still needed. TAT is one of the promising treatment strategy currently developed
394 in oncology (40). TAT combines the toxicity of an alpha-particle emitter and the specificity of a
395 vector that can be immunologic. Comparison of TAT and TRT with beta particle emitters
396 labelling the same vector, in preclinical and clinical studies, has demonstrated the superiority
397 of alpha-particle emitters in terms of efficacy (41). These results are related to the physical
398 characteristics of alpha-particles (high LET, short linear path limiting the toxicity to the
399 surrounding healthy tissues) and the fact that their efficacy is not affected by hypoxia or cell
400 cycle status (27).

401

402 In this study we developed and investigated the efficacy of TAT targeting PD-L1 antigen in a
403 preclinical melanoma xenograft model. PD-L1 appeared indeed a very interesting target as
404 already mentioned, because of its expression on the cell surface of the tumor cells and within

405 the tumor microenvironment increasing the amount of antigen to target, but also because
406 several antibodies are already available for clinical application (19-21). For such purpose, we
407 used a human melanoma cell line expressing stable cell surface PD-L1, M113_{PD-L1+}, after
408 transfection of a parental cell line derived from a melanoma patient metastasis, M113_{WT} (39).
409 This transfection was indispensable since melanoma cells lose expression of PD-L1 after *in*
410 *vitro* culture without IFN γ that is the main inducer of its expression on tumor cells (13).
411 However, PD-L1 expression was not restored in M113_{WT} even if IFN γ was added in culture
412 medium (data not shown). Flow cytometry and immunochemistry analysis of M113_{PD-L1+} cells
413 and tumors showed that PD-L1 expression was stable *in vitro* and *in vivo* until TAT was
414 initiated. Moreover, PD-L1 expression appeared somewhat heterogeneous by flow cytometry,
415 since 75% expressed high levels versus 25% of the cells expressing low levels of PD-L1. This
416 heterogeneity was also observed on the M113_{PD-L1+} tumors by immunochemistry (data not
417 shown). Such heterogenous expression is commonly observed between melanoma patients
418 but also between the different tumor sites within a patient (42). In our model, tumor also exhibit
419 a high mitotic index, reflected by Ki67 staining. In such situation, tumors develop fast with
420 decreased vascularization in the center leading to hypoxic zones (43).

421

422 The dose escalation study we performed on naïve mice, determined the activities of ²¹³Bi-anti-
423 hPD-L1 mAb for further TAT study. Indeed at 125 and 165 kBq/g, all the animals survived over
424 100 days after injection of the radiolabeled mAb. At 165 kBq/mL, a slight but significant
425 hematologic toxicity on platelets was observed, however no bone marrow toxicity was
426 noticeable. The next higher activity, 205 kBq/g, on the contrary was associated with
427 hematologic, bone marrow and kidney toxicity, and underlined that 165 kBq/g might be close
428 to the edge for medullary toxicity and that therapeutic window is narrow. Therefore for further
429 therapy study, we used both 125 and 165 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. Interestingly, even
430 at very high activities (335 and 395 kBq/g) that induced significant bone marrow toxicity, we
431 did not observed any impact on RBC.

432

433 TAT study on M113^{PD-L1+} tumors showed a significant anti-tumor effect since an important
434 delay in tumor growth was triggered resulting in significant median survival improvement. No
435 differences were observed between 125 and 165 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb in terms of
436 efficacy. No therapeutic effect was induced with none radiolabeled anti-hPD-L1 mAb or ²¹³Bi-
437 isotype-control on M113^{PD-L1+} tumors, nor with ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb on M113^{WT} tumors that
438 do not express PD-L1, demonstrating that the anti-tumor effect we observed with TAT is due
439 to mAb radiolabeling and PD-L1 specific targeting on the melanoma tumor. In this experiment,
440 we observed a more significant platelet toxicity in animals treated with 125 and 165 kBq/g of
441 ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. The timeline for analysis was shorter than in the biodistribution study
442 in which counting and dosing were done 100 days after injection of radiolabeled mAb and this
443 might account for the difference. Indeed, in TAT study, for all the mice but one, intermediate
444 analysis occurred at 20 or 28 days and end point was performed between 44 and 71 days after
445 injection of radiolabeled mAb. A significant bone marrow toxicity was also observed with 165
446 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. Beside the difference in timeline analysis, a similar toxicity
447 was induced with 165 kBq/g of ²¹³Bi-isotype control mAb implying that bone marrow irradiation
448 resulted from the blood flow and not from a specific targeting of this compartment. One mouse
449 treated with 165 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb died 6 days after TAT, however no sampling
450 could be done on this animal to determine if acute toxicity occurred. No toxicity was observed
451 on RBC, on the few leukocytes circulating in NSG mice (data not shown) nor on the kidney or
452 the liver. Finally, treatment and toxicity data demonstrated that TAT using bismuth-213 and
453 targeting PD-L1 is efficient in this melanoma xenograft model and that optimal treatment
454 activity was 125 kBq/g of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb.

455

456 In has been recently shown *in vitro* and *in vivo* that PD-L1 expression on tumor is transiently
457 increased after irradiation and in particular when DNA-double strand break are induced
458 (44-46). Therefore it would be interesting to confirm by molecular imaging if TAT with ²¹³Bi-
459 anti-hPD-L1 mAb can induce upregulation of PD-L1 expression and then investigate
460 fractionated TAT to further improve treatment efficacy.

461

462 One of the major limit of our xenograft model is the animal immunodeficiency which is
463 preventing on one hand, analysis of TAT impact on the immune cells that constitutively express
464 PD-L1, and on the other hand, analysis of endogenous immune response. Concerning TAT
465 toxicity, the study by Josefsson et al. is providing interesting dosimetric data. They
466 demonstrated that the spleen was expected to receive the highest activity deposit, followed by
467 the tumor, liver and thymus, and that the dose limiting organ would be the bone marrow (25).
468 This supports the feasibility of targeting PD-L1 with TAT since spleen is not considered as a
469 vital organ, liver is quite a radioresistant organ and thymus function is reduced in adults.
470 Concerning the impact on endogenous immune response, we investigated *in vitro* if ¹³Bi-anti-
471 hPD-L1 mAb could stimulate the immune system. Indeed, it has been demonstrated that
472 irradiation can favor the production of pro-inflammatory cytokines, like IL-1 β , IFN β and TNF α ,
473 which contribute to the cytotoxic effect of irradiation on the tumors (47,48). IFN β secreted by
474 tumor cells in response to irradiation and DNA-double strand break induces paracrine
475 production of the chemokine CXCL10 which recruits CD8⁺ effector T-cells (49,50). Moreover,
476 immunogenic cell death implies secretion of DAMP molecules by tumor cells including HMGB1
477 that activates anti-tumor immune response after chemotherapy or irradiation (28,51). We
478 demonstrated that ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb induced the secretion of IFN β , CXCL10 and HMGB1
479 by M113^{PD-L1+} tumor cells *in vitro*, with a particular secretion pattern for each cytokine. These
480 results suggest that TAT with ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb could promote an endogenous immune
481 response towards melanoma. It would be interesting to confirm such findings *in vivo* in an
482 immunocompetent melanoma tumor model. Alternatively, since combination therapies may
483 provide synergistic effects and a better tumor control, we are currently investigating the
484 potential of combining TAT with ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb and adoptive transfer of tumor specific
485 T-cells in the same preclinical human melanoma model.

486 **CONCLUSION**

487

488 In this study we showed that TAT targeting PD-L1 in a human melanoma xenograft model was

489 associated with efficient anti-tumor response as demonstrated by significant delay in tumor
490 growth and improved survival with minimal hematologic toxicity. This demonstrates that anti-
491 PD-L1 antibodies may be used in molecular imaging to select patients for ICI therapy and
492 assess response to treatment but also in TAT to target the tumor and its stroma. In addition,
493 we have shown that TAT can induce immunogenic cell death which could foster an
494 endogenous immune response and further improve anti-tumor efficacy.

495

496 **DISCLOSURE**

497

498 This work was funded by La Ligue Contre le Cancer, the Labex IGO (ANR-11-LABX-0016-01),
499 the Labex IRON (ANR-11-LABX-0018-01) programs, and the ArronaxPlus Equipex (ANR-11-
500 EQPX-0004) funded by the French Government “Investissements d’Avenir” program,
501 managed by the French National Research Agency (ANR). MC was supported by a grant from
502 the Labex IGO program (ANR-11-LABX-0016-01). AM and FB are supported by the European
503 Commission. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

504

505 **ACKNOWLEDGEMENTS**

506

507 We thank Noémie Joalland, Catherine Maurel and Sylvia Lambot for expert assistance in *in*
508 *vivo* experiments. We thank the UTE animal facility (SFR Santé), the Cytometry facility
509 “CytoCell” (SFR Santé), the Radioactivity platform (SFR Santé) and the cellular and tissular
510 imaging core facility “Micropicell” (Université de Nantes) for expert technical assistance.

511

512

513

514 **KEY POINTS**

515

516 **Question:** Can PD-L1 be used at a tumor target for TAT?

517 **Pertinent findings:** TAT targeting PD-L1 demonstrates significant anti-tumor efficacy in
518 melanoma xenograft model and induced immunogenic tumor cell death.

519 **Implication for patient care:** TAT targeting PD-L1 can be a new treatment to improve anti-
520 tumor response in melanoma patients.

521

522 REFERENCES

523

- 524 1. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor
525 by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp*
526 *Med.* 2000;192:1027–1034.
- 527 2. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates
528 T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5:1365–1369.
- 529 3. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine
530 T cells and APC. *J Immunol.* 2002;169:5538–5545.
- 531 4. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development,
532 maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental*
533 *Medicine.* 2009;206:3015–3029.
- 534 5. Sunshine JC, Nguyen PL, Kaunitz GJ, et al. PD-L1 Expression in Melanoma: A
535 Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison. *Clin Cancer Res.*
536 2017;23:4938–4944.
- 537 6. Pawelczyk K, Piotrowska A, Ciesielska U, et al. Role of PD-L1 Expression in Non-Small
538 Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological
539 Factors and Diagnostic Markers. *Int J Mol Sci.* 2019;20.
- 540 7. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative
541 breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:361–370.
- 542 8. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-
543 L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515:563–567.

- 544 9. Noman MZ, Desantis G, Janji B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its
545 blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *Journal of*
546 *Experimental Medicine*. 2014;211:781–790.
- 547 10. Barach YS, Lee JS, Zang X. T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion
548 pathways and emerging therapeutics. *Trends Mol Med*. 2011;17:47–55.
- 549 11. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer
550 Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front Immunol*. 2019;10:2022.
- 551 12. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the
552 melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*.
553 2013;5:200ra116.
- 554 13. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways
555 Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 2017;19:1189–1201.
- 556 14. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-
557 h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism
558 of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4:127ra37.
- 559 15. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-
560 mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*. 2014;74:665–
561 674.
- 562 16. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on
563 tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor
564 immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:307–314.
- 565 17. Mu C-Y, Huang J-A, Chen Y, Chen C, Zhang X-G. High expression of PD-L1 in lung
566 cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through
567 suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28:682–688.
- 568 18. Gao Q, Wang X-Y, Qiu S-J, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with
569 tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma.
570 *Clin Cancer Res*. 2009;15:971–979.

- 571 19. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of
572 Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;378:2288–2301.
- 573 20. Baker M, Cordes L, Brownell I. Avelumab: a new standard for treating metastatic Merkel
574 cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18:319–326.
- 575 21. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall Survival with Durvalumab after
576 Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379:2342–2350.
- 577 22. Rehman JA, Han G, Carvajal-Hausdorf DE, et al. Quantitative and pathologist-read
578 comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in
579 non-small cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2017;30:340–349.
- 580 23. Kluger HM, Zito CR, Turcu G, et al. PD-L1 Studies Across Tumor Types, Its Differential
581 Expression and Predictive Value in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors.
582 *Clin Cancer Res*. 2017;23:4270–4279.
- 583 24. Verhoeff SR, van den Heuvel MM, van Herpen CML, Piet B, Aarntzen EHJG, Heskamp
584 S. Programmed Cell Death-1/Ligand-1 PET Imaging: A Novel Tool to Optimize
585 Immunotherapy? *PET Clin*. 2020;15:35–43.
- 586 25. Josefsson A, Nedrow JR, Park S, et al. Imaging, Biodistribution, and Dosimetry of
587 Radionuclide-Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent Mouse Model of Breast
588 Cancer. *Cancer Research*. 2016;76:472–479.
- 589 26. Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, et al. MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology
590 and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy. *J Nucl Med*.
591 2010;51:311–328.
- 592 27. Baidoo KE, Yong K, Brechbiel MW. Molecular pathways: targeted α -particle radiation
593 therapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19:530–537.
- 594 28. Gorin J-B, Ménager J, Gouard S, et al. Antitumor immunity induced after α irradiation.
595 *Neoplasia*. 2014;16:319–328.
- 596 29. Gorin J-B, Guilloux Y, Morgenstern A, Chérel M, Davodeau F, Gaschet J. Using α radiation
597 to boost cancer immunity? *Oncoimmunology*. 2014;3:e954925.

- 598 30. Allen KJH, Jiao R, Malo ME, et al. Comparative Radioimmunotherapy of Experimental
599 Melanoma with Novel Humanized Antibody to Melanin Labeled with ²¹³Bismuth and
600 ¹⁷⁷Lutetium. *Pharmaceutics*. 2019;11.
- 601 31. Allen BJ, Raja C, Rizvi S, et al. Intralesional targeted alpha therapy for metastatic
602 melanoma. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:1318–1324.
- 603 32. Raja C, Graham P, Abbas Rizvi SM, et al. Interim analysis of toxicity and response in
604 phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol*
605 *Ther*. 2007;6:846–852.
- 606 33. Allen BJ, Singla AA, Rizvi SMA, et al. Analysis of patient survival in a Phase I trial of
607 systemic targeted α -therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy*. 2011;3:1041–
608 1050.
- 609 34. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell
610 apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8:793–800.
- 611 35. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1
612 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116:1757–1766.
- 613 36. Hamid O, Molinero L, Bolen CR, et al. Safety, Clinical Activity, and Biological Correlates
614 of Response in Patients with Metastatic Melanoma: Results from a Phase I Trial of
615 Atezolizumab. *Clin Cancer Res*. 2019;25:6061–6072.
- 616 37. Robert C, Ribas A, Schachter J, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced
617 melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre,
618 randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2019;20:1239–1251.
- 619 38. Chérel M, Gouard S, Gaschet J, et al. ²¹³Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138
620 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J Nucl Med*. 2013;54:1597–
621 1604.
- 622 39. Marotte L, Simon S, Vignard V, et al. Increased anti-tumor efficacy of PD-1 deficient
623 melanoma-specific human Lymphocytes . *J Immunother Cancer*. In press.
- 624 40. Morgenstern A, Bruchertseifer F. Development of Targeted Alpha Therapy from Bench to
625 Bedside. *J Med Imaging Radiat Sci*. 2019;50:S18–S20.

- 626 41. Marcu L, Bezak E, Allen BJ. Global comparison of targeted alpha vs targeted beta therapy
627 for cancer: In vitro, in vivo and clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;123:7–20.
- 628 42. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked
629 heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials.
630 *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28:245–253.
- 631 43. Gaustad J-V, Simonsen TG, Andersen LMK, Rofstad EK. Vascular abnormalities and
632 development of hypoxia in microscopic melanoma xenografts. *J Transl Med*.
633 2017;15:241–10.
- 634 44. Wu C-T, Chen W-C, Chang Y-H, Lin W-Y, Chen M-F. The role of PD-L1 in the radiation
635 response and clinical outcome for bladder cancer. *Sci Rep*. 2016;6:19740–9.
- 636 45. Kikuchi M, Clump DA, Srivastava RM, et al. Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-
637 89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1
638 upregulation in head and neck cancer and melanoma. *Oncoimmunology*.
639 2017;6:e1329071.
- 640 46. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates
641 PD-L1 expression in cancer cells. *Nat Commun*. 2017;8:1751–11.
- 642 47. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a
643 paradigm shift. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:256–265.
- 644 48. Burnette BC, Liang H, Lee Y, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of
645 type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Research*.
646 2011;71:2488–2496.
- 647 49. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates
648 radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*. 2017;8:15618.
- 649 50. Gebremeskel S, Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy
650 induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for
651 combined therapies. *Oncotarget*. 2015;6:41600–41619.

652 51. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of
653 the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.*
654 2007;13:1050–1059.

655

656 **FIGURE LEGENDS**

657

658 **Figure 1. *In vitro* and *ex vivo* expression of PD-L1 on M113 melanoma cells and**
659 **xenograft tumors.** *In vitro* expression of PD-L1 was assessed by flow cytometry on M113_{PD-}
660 _{L1+} **(A)** and M113_{WT} **(B)** cell lines, using a PE-conjugated anti-hPD-L1 mAb (gray histogram) or
661 PE-conjugated mouse IgG2b isotype control (--- histogram). Flow cytometry was performed
662 on a BD FACS Canto II™ system. Data are representative of more than 5 separate
663 experiments. Formalin-fixed and paraffin-embedded histologic sections of M113_{PD-L1+} **(C, E, G)**
664 and M113_{WT} **(D, F, H)** melanoma xenograft tumors were examined immunohistochemically
665 after hematoxylin and eosin **(C, D)**, mouse IgG2b isotype control **(E, F)** and mouse anti-hPD-
666 L1 **(G, H)** staining. All sections were photographed at 40 x original magnification, scale bars,
667 50 μm. Data are representative of 4 different M113_{PD-L1+} and M113_{WT} tumors.

668

669 **Figure 2. Survival and toxicity studies after dose-escalation of ²¹³Bi-anti-hPD-L1 in naive**
670 **NSG mice.** Naive NSG mice (n=3 per group) received an *i.v.* injection of 125 (■), 165 (●),
671 205 (△), 335 (□), 395 (○) kBq/g ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. **(A)** Kaplan-Meier survival analysis.
672 Activities ranging from 205 to 395 kBq/g ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb induced acute toxicity as
673 demonstrated by weight loss > 20% of initial weight and resulting in mouse sacrifice. Animals
674 surviving acute toxicity were followed for a 100-day period before euthanasia. **(B)** RBC, **(C)**
675 Platelet counts, as well as **(D)** plasma FLT3-Ligand and **(E)** urea concentrations were
676 monitored for each animal, before injection of radiolabeled anti-hPD-L1 mAb (T0) and at end
677 point. Each sample was assessed in duplicate. Bar represents the median. Activities ranging
678 from 205 to 395 kBq/g ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb induced significant toxicity on platelets
679 (*p=0.0297, **p=0.0023, ***p=0.0001, ****p<0.0001), bone marrow (*p=0.0163, ****p<0.0001),

680 and kidneys (*p=0.0297, **p=0.0045). Statistical analysis was performed with two-way ANOVA
681 followed by Sidak's multiple comparison test.

682

683 **Figure 3. M113^{PD-L1+} melanoma xenograft tumor growth and survival after TAT with ²¹³Bi-**

684 **anti-hPD-L1 mAb.** At day 0, NSG mice were grafted subcutaneously with 1×10⁶ M113^{PD-L1+}

685 melanoma cells. At day 7, TAT was performed by *i.v.* administration of 125 kBq/g ²¹³Bi-Anti-

686 hPD-L1 mAb (■, n=17), 165 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-L1 mAb (●, n=10), 125 kBq/g ²¹³Bi IgG2b

687 isotype control (□, n=10), 165 kBq/g ²¹³Bi IgG2b isotype control (○, n=10) or PBS for control

688 animals (◆, n=20). **(A)** Tumor volume, represented by mean and SD, was determined

689 sequentially from engraftment until volume reached 2000 mm³ and animals were sacrificed.

690 Compared to PBS control group, TAT significantly delayed tumor growth in mice treated with

691 **(B)** 125 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-L1 mAb or **(C)** 165 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-L1 mAb (*p=0.0313,

692 ***p=0.0007, ****p<0.0001). Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed

693 by Sidak's multiple comparison test. **(D)** Kaplan-Meier survival analysis. TAT with 125 kBq/g

694 and 165 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-L1 mAb significantly increased survival (MS=64 and 67 days

695 respectively) compared to PBS control group (MS=47.5 days, ****p<0.0001). Survival was not

696 significantly different in both isotype control groups compared to PBS control group. P values

697 were determined by log-rank test.

698

699 **Figure 4. Hematologic toxicity after TAT with ²¹³Bi-anti-hPD-L1 mAb. (A)** Platelet and **(B)**

700 RBC counts were assessed in animals receiving TAT treatment with 125 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-

701 L1 mAb (■), 165 kBq/g ²¹³Bi-Anti-hPD-L1 mAb (■) or receiving PBS (□). In each group

702 analysis was performed before TAT (T0), 20 to 28 days after TAT (Intermediate) and at End

703 point. Box extends from the 25th to 75th percentiles, line represents the median and the

704 whiskers go down to the smallest value and up to the largest. Statistical analysis was

705 performed with two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (**p=0.0023,

706 ****p<0.0001)

707

708 **Figure 5. Bone marrow, liver and kidney toxicity after TAT with ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb.**
709 **(A)** FLT3-Ligand, **(B)** AST, **(C)** ALT and **(D)** urea concentrations were assessed in animals
710 receiving TAT treatment with 125 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb (■), 165 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-
711 L1 mAb (■) or receiving PBS (□). In each group analysis was performed before TAT (T0) and
712 at End point. Each sample was assessed in duplicate. Box extends from the 25th to 75th
713 percentiles, line represents the median and the whiskers go down to the smallest value and
714 up to the largest. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's
715 multiple comparison test (****p<0.0001)

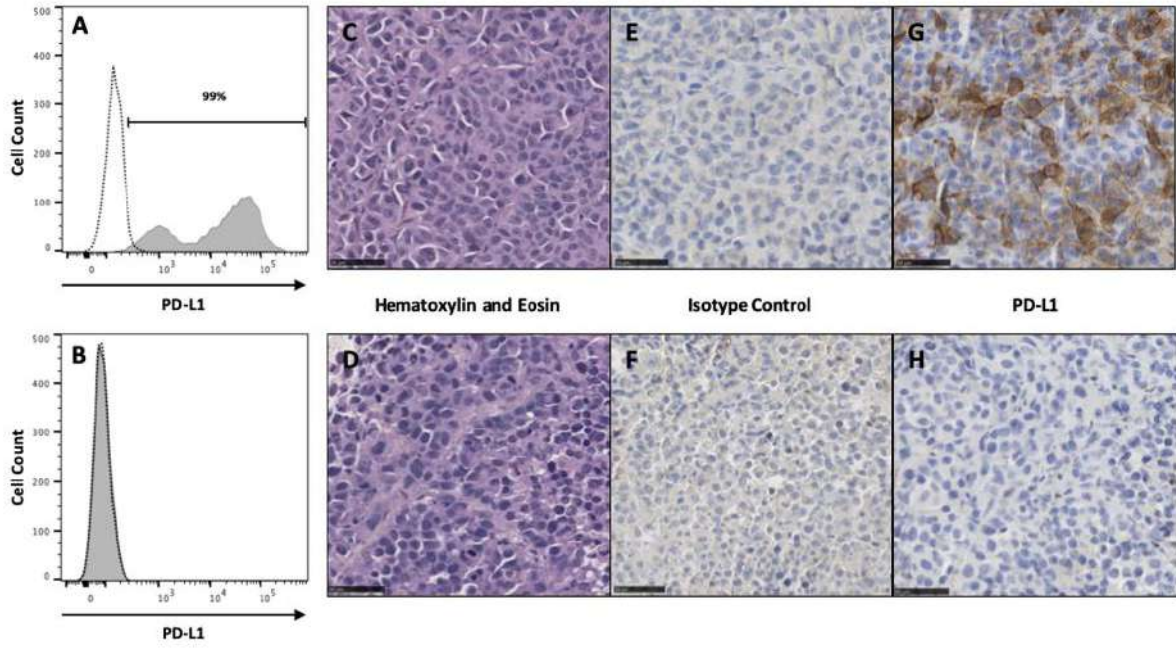
716

717 **Figure 6. M113_{WT} melanoma xenograft tumor growth and survival after TAT with ^{213}Bi -**
718 **anti-hPD-L1 mAb.** At day 0, NSG mice were grafted subcutaneously with 1×10^6 M113_{WT}
719 melanoma cells that do not express PD-L1. At day 7, TAT was performed by *i.v.* administration
720 of 125 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb (■, n=10), 125 kBq/g ^{213}Bi IgG2b isotype control (□,
721 n=10) or PBS for control animals (◇, n=14). **(A)** Tumor volume, represented by mean and SD,
722 was determined sequentially from engraftment until volume reached 2000 mm³ and animals
723 were sacrificed. No difference was observed in tumor growth between the different groups. **(B)**
724 Kaplan-Meier survival analysis. Treatment with 125 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb or ^{213}Bi
725 IgG2b isotype control had no impact on survival (MS=43 and 42 days respectively) compared
726 to PBS control group (MS=41 days).

727

728 **Figure 7. Irradiation with ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb induces M113_{PD-L1+} melanoma**
729 **immunogenic cell death.** M113_{PD-L1+} melanoma cells (4×10^5 cells/mL) were incubated *in vitro*
730 with 92.5(■), 185 (▲) or 2 960 (◆) kBq/mL ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb or no mAb (○). After 24,
731 48 and 72 hour incubation, cell supernatants were assessed by ELISA for IFN β , HMGB1 and
732 CXCL10 release (n=3 for each activity and each time point). Each sample was assessed in
733 duplicate. Data represent average of 3 experiments. Statistical analysis was performed with
734 two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (****p<0.0001).

735

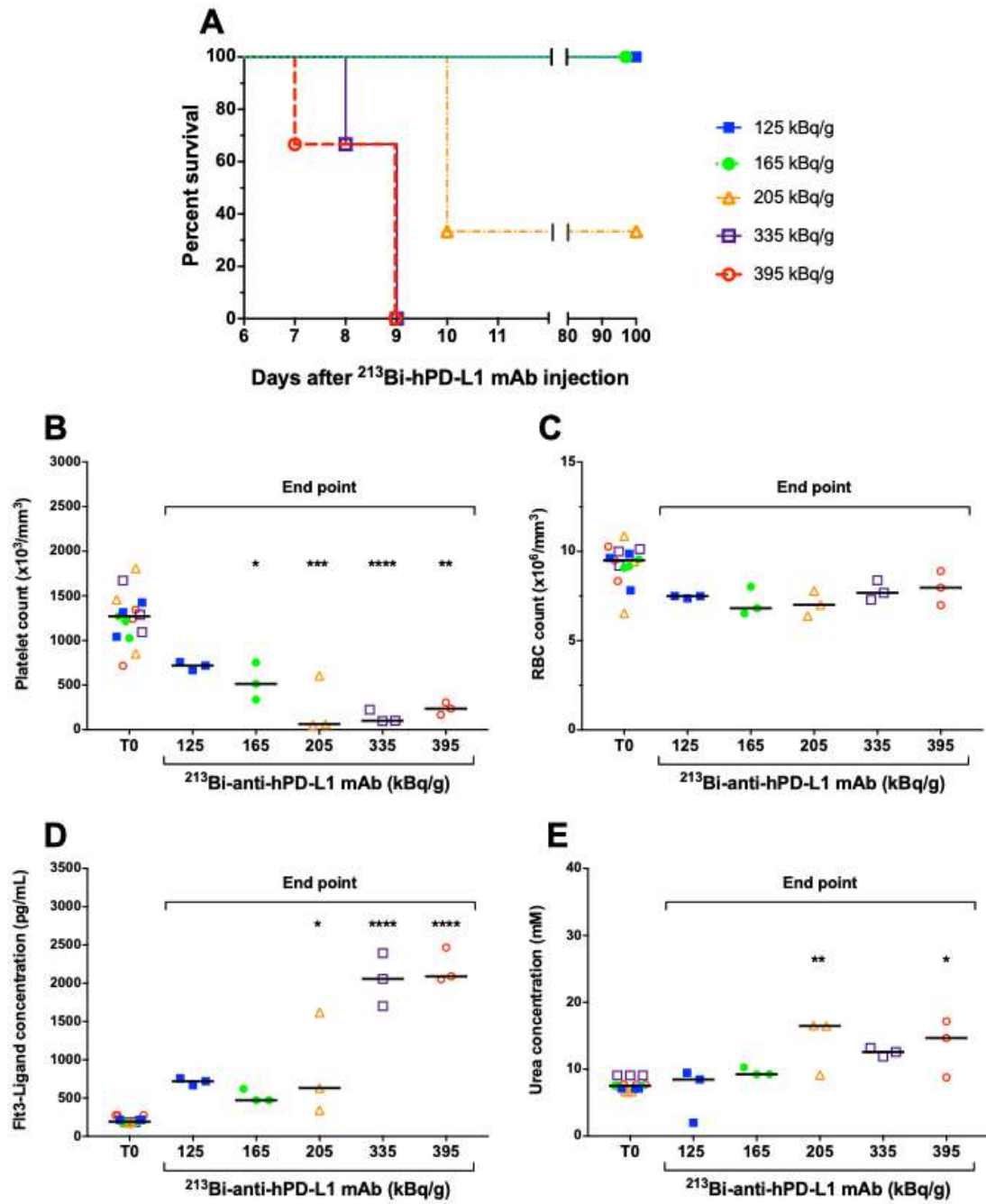


736

737

738

Figure 1

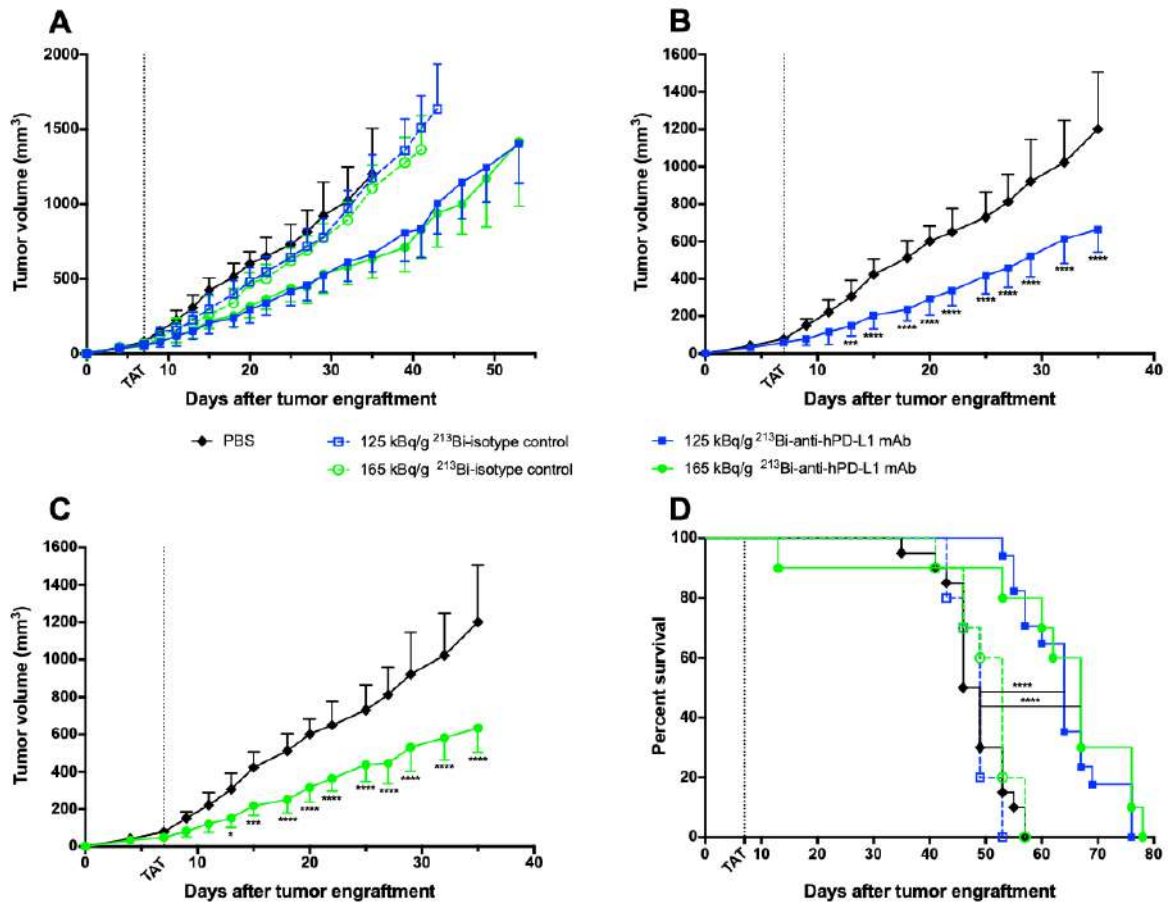


739

740

741

Figure 2



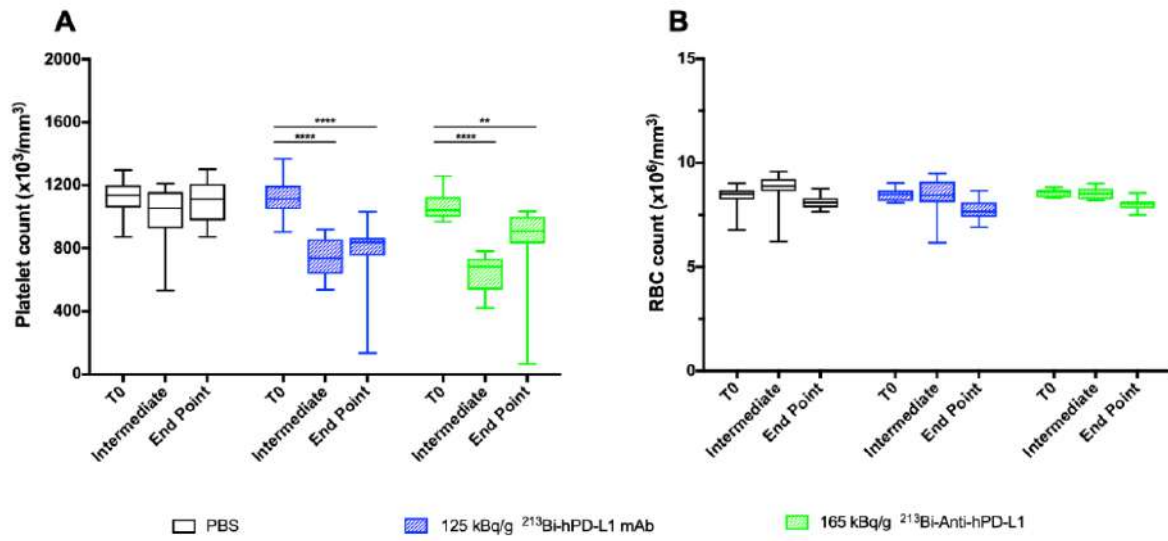
742

743

744

Figure 3

745

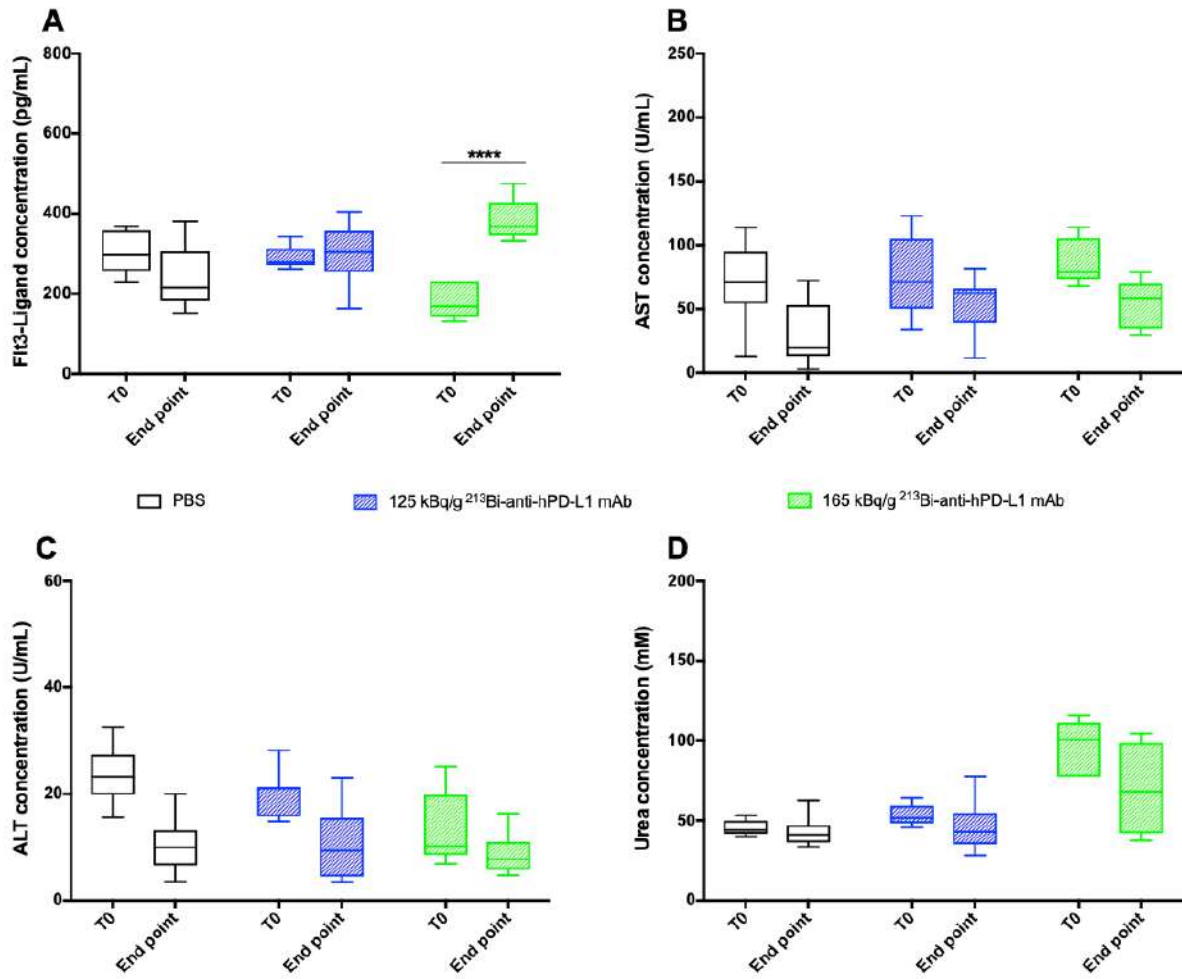


746

747

748

Figure 4

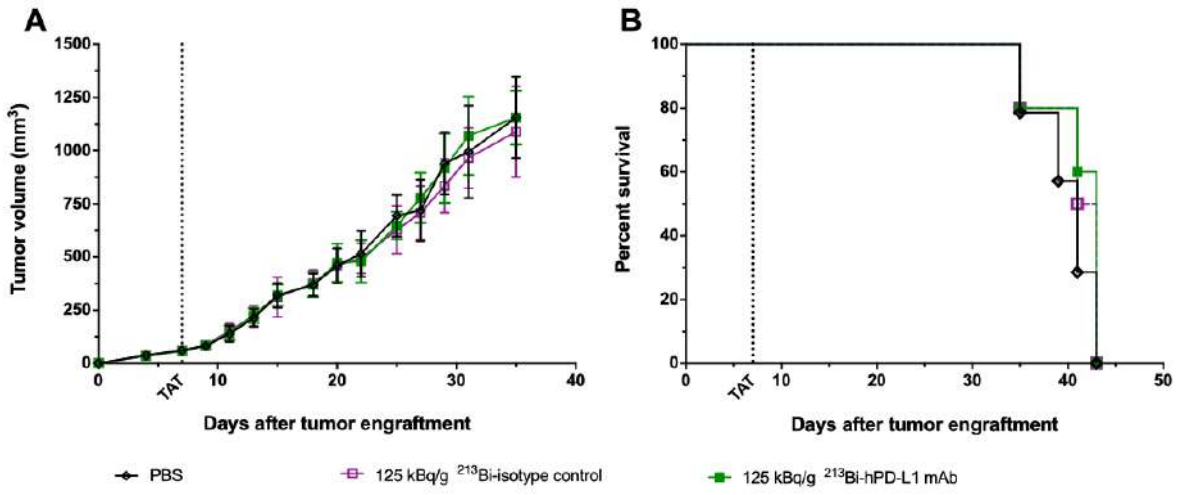


749

750

751

Figure 5



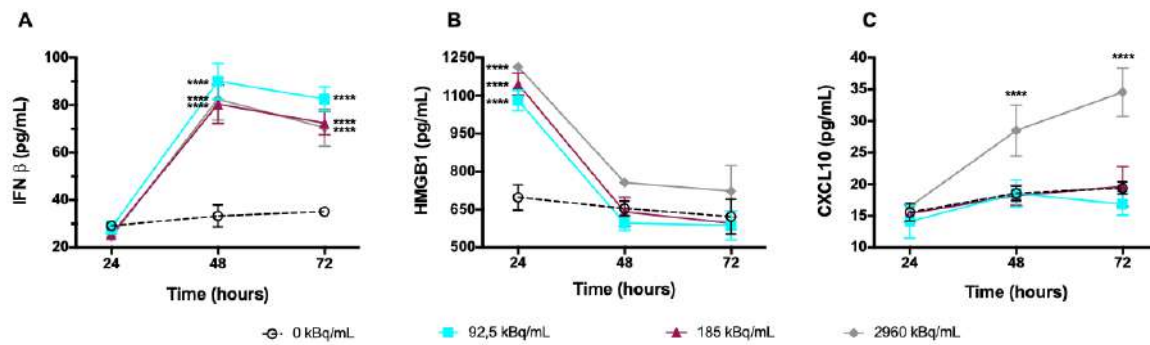
752

753

754

755

Figure 6

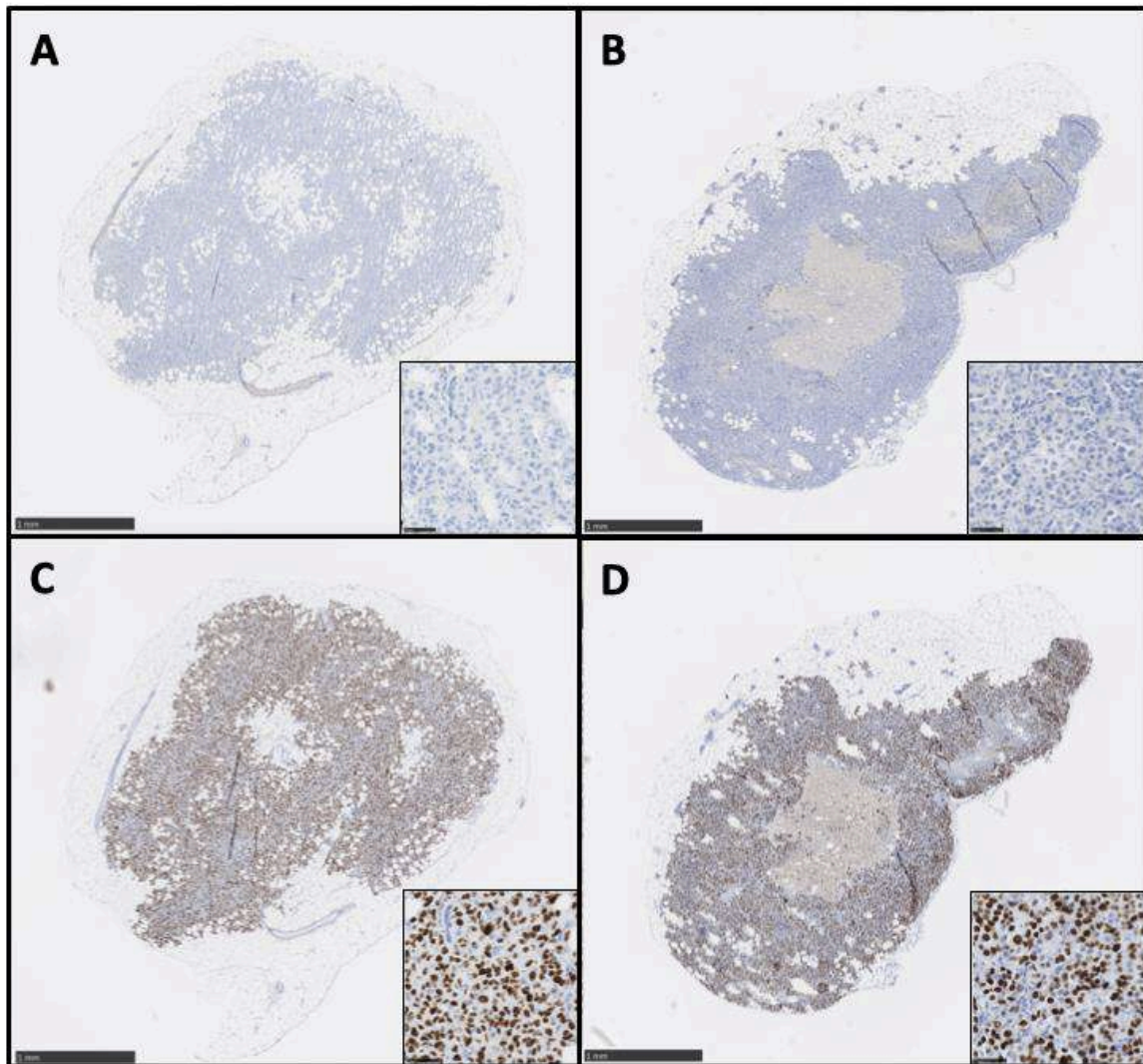


756

757

758

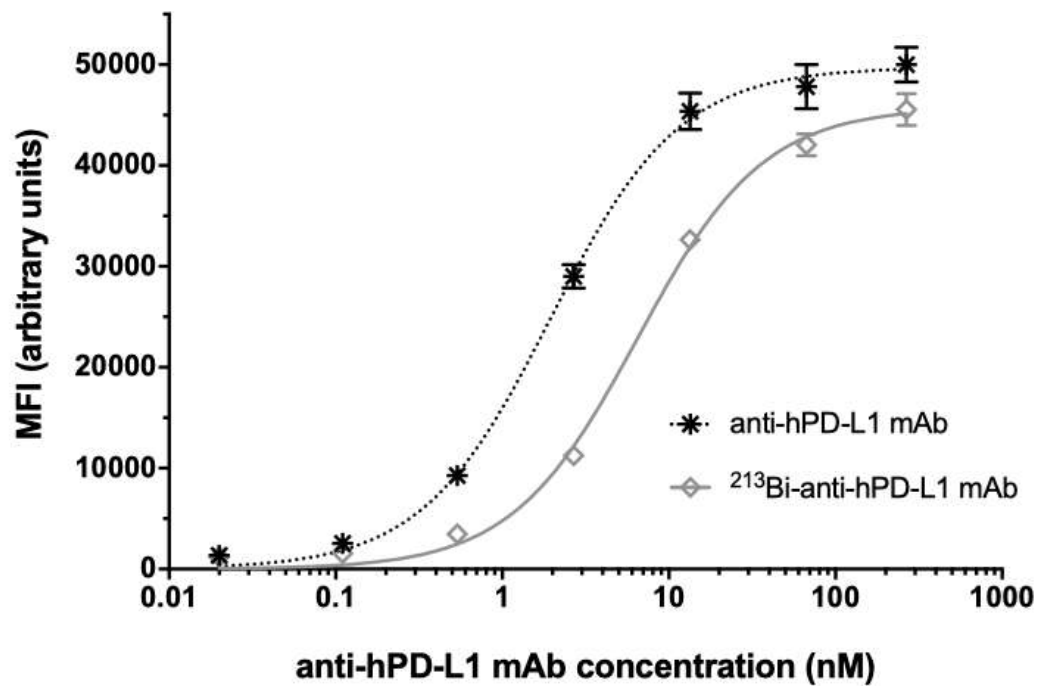
Figure 7



761

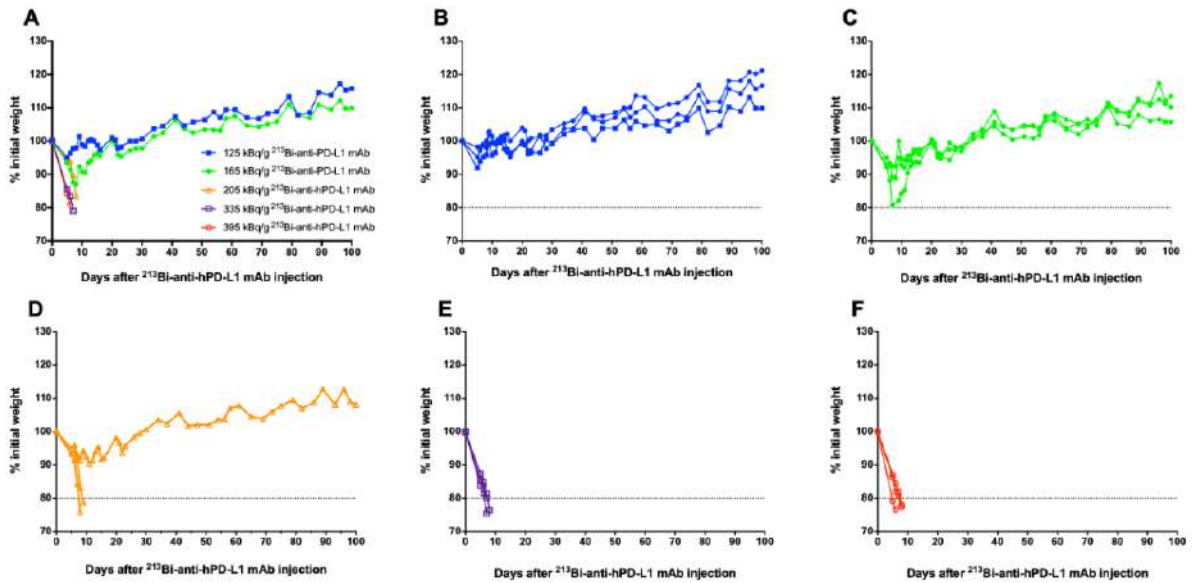
762

763 **Supplemental Figure 1. Ex vivo proliferation analysis of M113 melanoma xenograft**
764 **tumors.** M113^{PD-L1+} (A, C) and M113^{WT} (B, D) melanoma tumor proliferation was examined on
765 formalin-fixed and paraffin-embedded histologic sections after immunohistochemical staining
766 with mouse anti-human Ki67 mAb or mouse IgG1 κ isotype control. Scale bars are 1 mm for
767 whole tumors and 50 μ m for tumor focus. Data are representative of 4 different M113^{PD-L1+} and
768 M113^{WT} tumors.



769

770 **Supplemental Figure 2. Binding affinity of unlabeled anti-hPD-L1 and ²¹³Bi-anti-hPD-L1**
 771 **mAbs on M113_{PD-L1++} melanoma cells.** M113_{PD-L1++} melanoma cells were incubated *in vitro*
 772 with increasing concentrations of unlabeled or radiolabeled anti-hPD-L1 mAbs followed by
 773 incubation with PE-conjugated polyclonal anti-mouse IgG Ab. After staining, cells were
 774 analyzed by flow cytometry using a FACSCanto II and FlowJo software. K_d was determined
 775 based on fluorescence intensity using prism graphpad software. Experiment was performed in
 776 duplicates and means ± SD are plotted.



777

778

779 **Supplemental Figure 3. Weight follow up in naive NSG mice subjected to dose-**

780 **escalation with ^{213}Bi -anti-hPD-L1.** Naive NSG mice (n=3 per group) received an *i.v.* injection

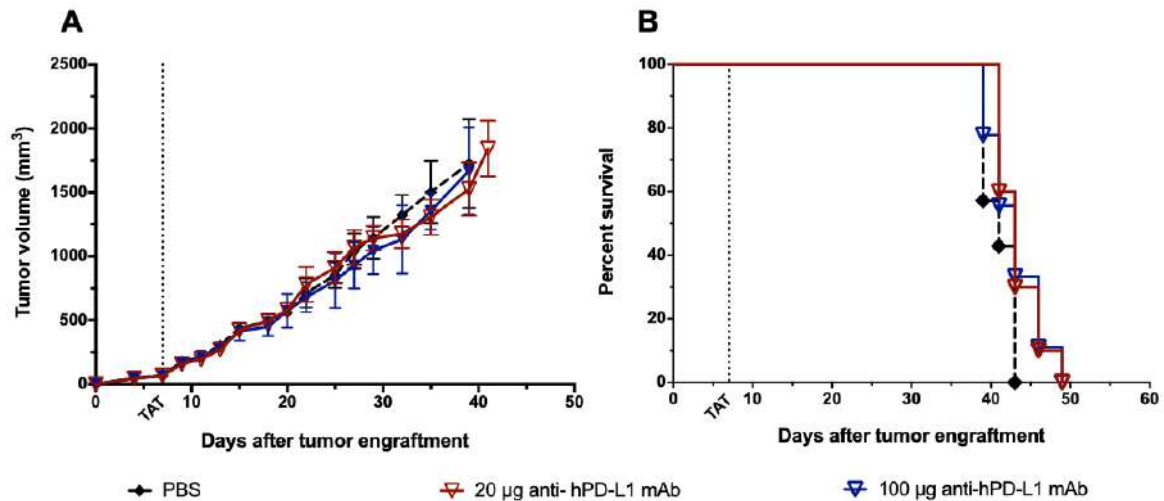
781 of 125 (■), 165 (●), 205 (△), 335 (□), 395 (○) kBq/g ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb. (A) Mean weight

782 variation in each group, as expressed as percent of initial weight. Weight variation of each

783 animal after injection of (B) 125, (C) 165, (D) 205, (E) 335 and (F) 395 kBq/g ^{213}Bi -anti-hPD-

784 L1 mAb. Animals experiencing acute toxicity as demonstrated by weight loss > 20% of initial

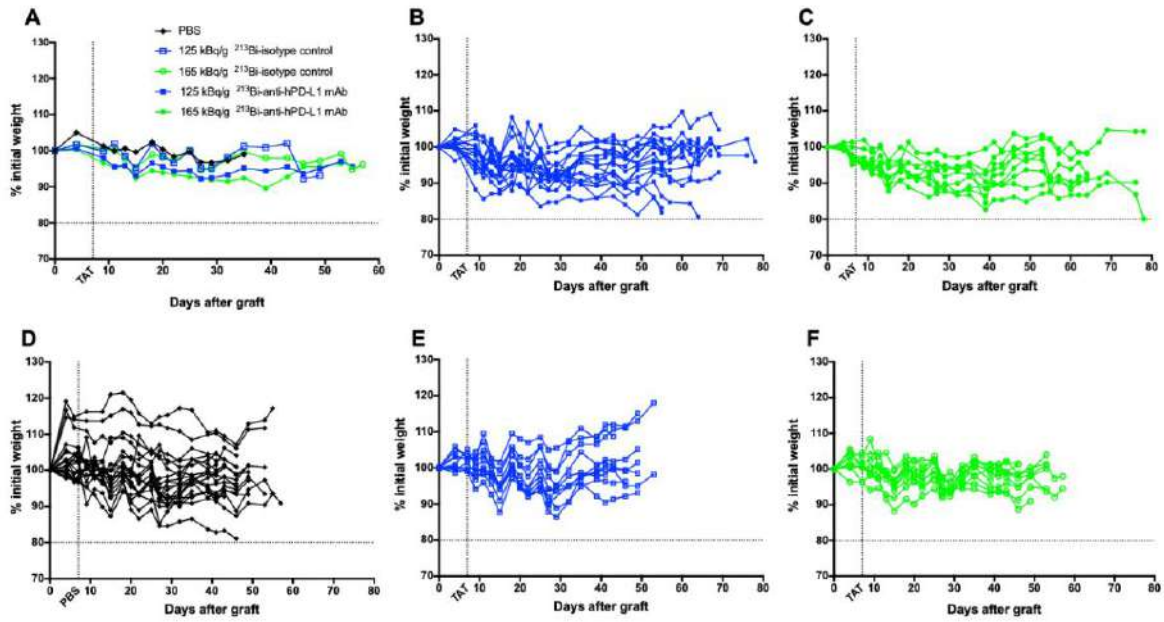
785 body weight were sacrificed. Study follow-up was performed over a 100-day period.



786

787

788 **Supplemental Figure 4. M113_{WT} melanoma xenograft tumor growth and survival after**
 789 **immunotherapy with unlabeled anti-hPD-L1 mAb.** At day 0, NSG mice were grafted
 790 subcutaneously with 1×10^6 M113_{PD-L1+} melanoma cells. At day 7, treatment was performed by
 791 *i.v.* injection of 20 µg anti-hPD-L1 mAb (▽, n=10), 100 µg anti-hPD-L1 mAb (▽, n=9) or PBS
 792 for control animals (◆, n=7). **A)** Tumor volume, represented by mean and SD, was determined
 793 sequentially from engraftment until volume reached 2000 mm³ and animals were sacrificed.
 794 No difference was observed in tumor growth between the different groups. **(B)** Kaplan-Meier
 795 survival analysis. Treatment with 20 or 100 µg unlabeled anti-hPD-L1 mAb had no impact on
 796 survival (MS=43 days for both groups) compared to PBS control group (MS=41 days).



797

798

799 **Figure S5. Weight follow up after TAT with ^{213}Bi -anti-hPD-L1 mAb in M113 $^{\text{PD-L1+}}$**

800 **melanoma tumor engrafted mice.** At day 0, NSG mice were grafted subcutaneously with

801 1×10^6 M113 $^{\text{PD-L1+}}$ melanoma cells. At day 7, TAT was performed by *i.v.* administration of 125

802 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb (■, n=17), 165 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb (●, n=10), 125

803 kBq/g ^{213}Bi IgG2b isotype control (□, n=10), 165 kBq/g ^{213}Bi IgG2b isotype control (○, n=10)

804 or PBS for control animals (◆, n=20). **(A)** Mean weight variation in each group, as expressed

805 as percent of initial weight. Weight variation of each animal after injection of **(B)** 125 kBq/g

806 ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb, **(C)** 165 kBq/g ^{213}Bi -Anti-hPD-L1 mAb, **(D)** 125 kBq/g ^{213}Bi IgG2b

807 isotype control, **(E)** 165 kBq/g ^{213}Bi IgG2b isotype control and **(F)** PBS. Animals were sacrificed

808 when tumor volume reached 2 000 mm 3 .

Annexe n°2: Revue scientifique
Revue soumise à Frontiers in Medicine
Co-Premier auteur

Cell tracking in immunotherapy

Justine Perrin^{1*}, Marisa Capita^{1*}, Marie Mougín-Degraef^{1,2}, François Guérard¹, Alain Faivre-Chauvet^{1,2}, Latifa RBAH-VIDAL¹, Joëlle Gaschet¹, Yannick Guilloux¹, Françoise Kraeber-Bodéré^{1,2,3}, Michel Chérel^{1,3,4}, Jacques Barbet⁴

¹INSERM U1232 Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA), France, ²Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes, France, ³Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), France, ⁴Arronax, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Medicine

Specialty Section:
Nuclear Medicine

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
458234

Received on:
04 Mar 2019

Revised on:
28 Nov 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

* J. Perrin and M. Capitao contributed equally to this work

Keywords

Cell Tracking, Immunotherapy, PET - Positron Emission Tomography, SPECT (single photon emission tomography), MRI - Magnetic resonance imaging, Adoptive Transfer, Tumor Microenvironment, imaging

Abstract

Word count: 343

The impressive development of immunotherapy in the last few years originates from a more precise understanding of control mechanisms in the immune system that leads to the discovery of new targets and new therapeutic tools. Indeed at different stages of disease progression elicit different local and systemic inflammatory responses, the ability to longitudinally interrogate the migration and expansion of immune cells throughout the whole body will greatly facilitate disease characterization and guide selection of appropriate treatment regimens. While using radiolabeled white blood cells to detect inflammatory lesions has been a classical nuclear medicine technique for years, new non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms have emerged. They are designed to improve the detection sensitivity and allow for a better preservation of cell activity and integrity. These methods include the monitoring of labeled therapeutic cells but also of all cells related to a specific disease or therapeutic approach. Labeling of therapeutic cells for imaging may now be performed *in vitro*, with some limitations on sensitivity and duration of observation. Alternatively, *in vivo* labeling may be performed by genetically engineered cells or mice that may be revealed *in vivo* through imaging. In addition, SPECT or PET imaging based on monoclonal antibodies have been used to detect tumors in the human body for years. They may be used to detect and possibly quantify the presence of specific cells within the lesions. These methods have been the object of several recent reviews that have concentrated on technical aspects, stressing the differences between direct and indirect labeling. They are described here by distinguishing *ex vivo* (labeling cells with paramagnetic, radioactive or fluorescent tracers) and *in vivo* (*in vivo* capture of radioactive, fluorescent or luminescent tracers injected, or directly by using labeled antibodies, ligands or pretargeted clickable substrates) imaging methods. Cell tracking in specific therapeutic applications, namely cell therapy, and particularly CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cell therapy, is a fast-growing research field with various therapeutic indications. The potential impact of imaging on the progress of these new therapeutic modalities is discussed.

Contribution to the field

Immune cell therapies have been used in many fields to treat cancer, prevent the rejection of graft, autoimmune and inflammatory diseases, etc. Following these cells have been of major interest to improve and predict efficacy and decrease the toxicity of cell transfer. Up to date, many review have made an inventory of the different ways to track transferred and tumor cells. This field is rapidly growing, and new technologies arise fast. Our work focuses on new techniques that allow the labeling and tracking of

immune cells by imaging methods. We will describe the different approach to label the main therapeutics cells used in adoptive transfer, such as CAR T cell, stem cells and dendritic cells. New techniques mainly include imaging by PET and MRI, which allow a better resolution compared to bioluminescence and/or fluorescence imaging.

Funding statement

This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research, called "Investissements d'Avenir" IRON Labex n° ANR-11-LABX-0018-01, IGO Labex n° ANR-11-LABX-0016-01), SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558), i-Site Next (ANR-16-IDEX-0007) and ArronaxPlus Equipex n° ANR-11-EQPX-0004.

Data availability statement

Generated Statement: No datasets were generated or analyzed for this study.

In review

Cell tracking in cancer immunotherapy

Authors: Justine Perrin^{1*}, Marisa Capitaio^{1*}, Marie Mougin-Degraef^{1,2}, François Guérard¹, Alain Faivre-Chauvet^{1,2}, Latifa Rbah-Vidal¹, Joëlle Gaschet¹, Yannick Guilloux¹, Françoise Kraeber-Bodéré^{1,2,3}, Michel Chérel^{1,3}, Jacques Barbet⁴

1. CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

2. Nuclear Medicine, University Hospital, Nantes, France,

3. Nuclear Medicine, ICO Cancer Center, Saint-Herblain, France,

4. GIP Arronax, Saint-Herblain, France

* J. Perrin and M. Capitaio contributed equally to this work

Corresponding author: Jacques Barbet GIP Arronax, 1 rue Aronnax, 44817 SAINT-HERBLAIN Cedex, France

Phone: +33 (2) 28212121 - Fax: +33 (2) 40948130 - E-mail: barbet@arronax-nantes.fr

Running Title: Cell tracking in immunotherapy

This work has been supported in part by grants from the French National Agency for Research called "Investissements d'Avenir" IRON Labex n° ANR-11-LABX-0018-01 and ArronaxPlus Equipex n° ANR-11-EQPX-0004.

Abstract

The impressive development of cancer immunotherapy in the last few years originates from a more precise understanding of control mechanisms in the immune system leading to the discovery of new targets and new therapeutic tools. Since different stages of disease progression elicit different local and systemic inflammatory responses, the ability to longitudinally interrogate the migration and expansion of immune cells throughout the whole body will greatly facilitate disease characterization and guide selection of appropriate treatment regimens. While using radiolabeled white blood cells to detect inflammatory lesions has been a classical nuclear medicine technique for years, new non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms have emerged. They are designed to improve detection sensitivity and allow for a better preservation of cell activity and integrity. These methods include the monitoring of therapeutic cells but also of all cells related to a specific disease or therapeutic approach. Labeling of therapeutic cells for imaging may be performed in vitro, with some limitations on sensitivity and duration of observation. Alternatively, in vivo cell tracking may be performed by genetically engineering cells or mice so that may be revealed through imaging. In addition, SPECT or PET imaging based on monoclonal antibodies has been used to detect tumors in the human body for years. They may be used to detect and quantify the presence of specific cells within cancer lesions. These methods have been the object of several recent reviews that have concentrated on technical aspects, stressing the differences between direct and indirect labeling. They are briefly described here by distinguishing ex vivo (labeling cells with paramagnetic, radioactive or fluorescent tracers) and in vivo (in vivo capture of injected radioactive, fluorescent or luminescent tracers, or by using labeled antibodies, ligands or pretargeted clickable substrates) imaging methods. This review focuses on cell tracking in specific therapeutic applications, namely cell therapy, and particularly CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cell therapy, which is a fast-growing research field with various therapeutic indications. The potential impact of imaging on the progress of these new therapeutic modalities is discussed.

Keywords: cell tracking, immunotherapy, PET, SPECT, MRI, adoptive transfer, tumor microenvironment, imaging, cancer

SUMMARY :

INTRODUCTION 2

CELL TRACKING METHODS: LOOKING FOR CELLS IN ANIMAL OR HUMAN BODIES..... 3

EX VIVO CELL LABELING 3

Radioactive (SPECT, PET)..... 4

Magnetic resonance imaging (MRI)..... 4

IN VIVO LABELING 5

Genetically engineered cells for radioactive, MRI or bioluminescence imaging..... 5

 Radioactive imaging 5

 Magnetic resonance imaging..... 6

 Optical imaging..... 6

Metabolically engineered cells and click chemistry 7

Indirect methods: labeled antibodies and tracers 7

BI(MULTI)MODAL IMAGING 8

CELL TRACKING ACHIEVEMENTS: WHAT HAPPENED IN CELL TRACKING OVER THE LAST TEN YEARS?..... 9

INVESTIGATING THE TUMOR AND ITS MICROENVIRONMENT 9

Imaging tumor cellular composition..... 9

Imaging TILs 9

Macrophages 10

Imaging tumor metabolic activity..... 10

IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS: ASSESSMENT OF IMMUNE STATUS IN TUMOR LESIONS..... 11

MONITORING THE ACTIVATION AND EXPANSION OF IMMUNE EFFECTOR CELLS 12

Imaging immune cell activation 12

Imaging trafficking of immune effector cells..... 12

CELL-BASED THERAPIES 13

Earlier results in cell-based therapy..... 13

Tracking antigen-presenting cells in vivo 13

CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cell therapy..... 14

Other adoptive T-cell transfer therapies 14

Stem cell therapies..... 15

DISCUSSION..... 15

REFERENCES 17

Introduction

The origins of immunotherapy go back to early centuries of history as illustrated by the fight against smallpox. Realization that survivors were immune to the disease eventually led to the practice of inoculation or variolation, that spread throughout Europe in the early XVIIIth century. The discovery of cowpox vaccination by Edward Jenner in 1796 ultimately resulted, after a global vaccination campaign, in the eradication of the disease announced by the World Health Organization in 1977. Fighting infectious diseases with vaccines proved successful, but eradication of other diseases remains elusive. While Jonas Salk developed the first poliomyelitis vaccine in the 1950, the disease is not yet considered as eradicated and remains endemic in several African countries(1). In the meantime, the role of immunity in other pathologies has been explored and the immune system is now identified as a general defense system that distinguishes self from non-self or altered self. Its ability to recognize normal cells from infected or tumor cells has implications in cancer immune surveillance, graft rejection and many other pathologies but can also result in autoimmune and inflammatory diseases. It was also realized that the immune system uses an incredibly complex network of connected cellular and molecular agents, not yet fully known and understood.

The focus of this review is on anti-cancer immunotherapy as it is making impressive progress. However, the concepts can also be paralleled in other immune-mediated disorders and for conditions requiring immunotherapeutic intervention. Therapeutic antibodies and cell-based therapies, such as adoptive immunotherapy and stem-cell therapy, have been developed years ago, but, in the last few years, a more precise understanding of control mechanisms of the immune system triggered an impressive development of immunotherapy (2). Novel therapeutic approaches have recently emerged that reached clinical practice with remarkable success in a variety of cancers (3,4). The different types of tissue injuries and the different stages of disease progression are more precisely identified, as well as the different local and systemic inflammatory responses. Monitoring the depletion, migration, and expansion of immune cells throughout the whole body should help characterizing the diseases and guiding selection of appropriate treatment regimens (5). Such methods have an important role in basic cancer research, where they serve to elucidate novel biological mechanisms. The development of effective therapeutic strategies, targeting tumor cells as well as their micro-environment, also requires the ability to determine *in vivo* the location, distribution, and long-term viability of the cell populations as well as their biological fate with respect to cell activation and differentiation.

This process is referred to as cell tracking and is not limited to therapeutic cells but includes all cells related to a specific disease or therapeutic approach, like tumor cells, immune cells or microenvironment. It involves noninvasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms. In conjunction with various noninvasive imaging modalities, cell-labeling methods, such as exogenous labeling or transfection with a reporter gene, allow visualization of labeled cells *in vivo* in real time, as well as monitoring and quantifying cell accumulation and function by a variety of imaging approaches. In this Review, we briefly describe the basic principles of cell-tracking methods and explain various approaches to cell tracking. Then we highlight recent examples of application of new technologies in animals, focusing on immune checkpoint inhibitor antibodies and cell-based therapies that use natural or genetically engineered T cells, dendritic cells, macrophages or stem cells and, when documented, the clinical potential of these methods.

Cell tracking methods: looking for cells in animal or human bodies

Most earlier reviews on this topic have classified imaging techniques as direct or indirect labeling methods. The distinction between direct and indirect labeling is not entirely clear and here we will discuss *ex vivo* versus *in vivo* labeling: *ex vivo* labeling include labeling cells with paramagnetic, radioactive or fluorescent tracers before injection, while *in vivo* labeling relates to *in situ* imaging cells by injecting radioactive, fluorescent or luminescent tracers or antibodies.

SPECT and PET imaging with labeled monoclonal antibodies has been used for years to detect cancer cells. With the development of immuno-PET, they are now used to detect, quantify and longitudinally monitor *in vivo* a variety of cells in the context of immunotherapy of cancer and other diseases (6). Using radiolabeled tracers for *in vivo* imaging will thus be discussed in this review as one of the possible methods of cell tracking.

The various labeling techniques discussed in this review are presented schematically in figure 1.

Ex vivo cell labeling

While the administration of radiolabeled white blood cells has been a classical nuclear medicine technique for years to detect inflammatory lesions (7), new non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms have emerged. They aim at improving the detection sensitivity and allowing for a better preservation of cell activity and integrity. These methods have been the subject of many reviews (8). Labeling therapeutic cells for imaging may now be performed *in vitro* with little impact on cell function nor migration ability, with some limitations on sensitivity and duration of observation (7,11,12). Methods based on radioactive

imaging or MRI have the highest potential for clinical imaging. They are briefly presented here in this order, highlighting recent progress.

Radioactive (SPECT, PET)

Labeling cells with long-lived radionuclides before re-injection has been used for years in nuclear medicine routine, as mentioned above, but concerns about cell viability and maintenance of cell functions arose. Typically, ^{111}In -oxine is used to label leukocytes (9). Cell labeling yield is good, but a significant efflux rate was reported, and image quality is considered suboptimal with this high energy single photon emitter.

Most recent developments relate to cell labeling using positron emitters because, in human, PET imaging offers better resolution and more precise quantification compared to SPECT. Copper-64 is an interesting candidate, with good imaging properties and a relatively long half-life of 12.7 hr. ^{64}Cu -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone (^{64}Cu -PTSM) was thus used to label C6 glioma cells, as the lipophilic complex is readily taken up in cells. A good cell labeling yield, but a significant efflux rate from cells was observed (10). Zirconium-89 has a half-life of 78.4 hr, which is quite convenient to monitor cell trafficking over a few days after administration. Myeloma cells were labeled with ^{89}Zr -oxine using a technique similar to that used for In-111 cell labeling (11). Cell labeling yield was reasonable but contrasting results for efflux rate and cell viability were reported. Sato et al. (12) reported that ^{89}Zr -oxine complex readily labeled dendritic cells (DC) with an efficiency range of 13.0%-43.9% and $83.5\% \pm 1.8$ retention 5 days after labeling. In this study, it was considered that labeling did not affect the viability of mouse DCs and Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs), nor did it affect functionality. More recently ^{89}Zr -labeled CAR (Chimeric Antigen Receptor) T cells were shown to retain more than 60% of the ^{89}Zr over 6 days while their capacity of in vitro cytokine production, migration, and tumor cytotoxicity, as well as their in vivo antitumor activity (13) were preserved. To further reduce efflux rate and improve viability and cell functions, labeling mixed lymphocyte cell populations with Zr-89 radiolabeled nanoparticles was explored (14,15).

An alternative approach to loading the radionuclide inside the cells has been proposed. It uses Zr-89-desferrioxamine-NCS, which chemically couples to the membrane of cells. Mouse melanoma cells, dendritic cells and human mesenchymal stem cells were labeled by this method, which was shown to afford stable labeling for 7 days, with little effect of on cell viability and proliferation and to allow for serial PET scans in mouse models (16).

With its fast and efficient uptake and good retention, ^{18}F -labeled fluoro-2-deoxy-2-D-glucose (^{18}F -FDG) may be used to label cells in vitro to monitor cell traffic in vivo. For instance, cardiac stem cells were labeled and their biodistribution and retention was quantified in a pig model of chronic myocardial infarction (17). A potential drawback of ^{18}F -FDG for assessing cell therapies following implantation is the local retention of radiotracer released from the cells. Thus, 3'-deoxy-3'-L- ^{18}F -fluorothymidine (^{18}F -FLT) has been proposed to label cells instead of ^{18}F -FDG. Human Umbilical Endothelial Vein Cells (HUVECs) incubated with ^{18}F -FLT and injected in mice with hind-limb ischemia were shown to provide a better estimation of HUVECs retention than cells labeled with ^{18}F -FDG (18).

Magnetic resonance imaging (MRI)

Gadolinium(III) chelates, such as gadopentetate dimeglumine, are effective paramagnetic contrast agents owing to their unpaired electrons. These electrons confer a magnetic moment that increases the relaxivity of water protons, shortens the longitudinal relaxation rate (T1) and, therefore, increases the signal by creating a positive contrast in T1-weighted MRI images (19). The amount of gadolinium that may be loaded into cells obviously limits the sensitivity. As an example, rat mesenchymal stem cells (MSC) were loaded in vitro with Gd-DTPA using the lipidic transfection agent Effectene. Electron microscopy detected the presence of Gd-DTPA particles in the MSCs and no difference was observed in cell viability or proliferation between the labeled and unlabeled MSCs. T1-weighted MRI was then used to detect the labeled cells in vitro and in the rat brain (20).

Superparamagnetic iron-oxide particles have an inherently larger effect on MRI relaxivity than soluble paramagnetic agents. Their core may contain several thousand iron atoms, which increases the local iron concentration and sensitivity. These particles may be coated with dextran, siloxan, citrate, or polymers to improve biodistribution. The superparamagnetic agent results in negative contrast in T2-weighted sequences by causing inhomogeneities in the local magnetic field and spin-spin dephasing, which shortens transverse relaxation times (21). Ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO) of 10–50 nm, superparamagnetic iron oxide (SPIO) of 50–100 nm and micrometer-sized iron oxide (MPIOs) up to >1 µm particles have been used (8). Again, cell viability limits the intracellular particle concentrations and thus cell detection sensitivity. Phagocytic cells, such as dendritic cells or pancreatic islet cells, can accumulate large amounts of nanoparticles to allow for their detection in animals and patients (22). Macrophages were easily and efficiently labeled with micrometer-sized particles of iron-oxide (MPIO) in situ and analyzed via ex vivo magnetic resonance microscopy (MRM) and in vivo monitoring by magnetic resonance imaging (MRI). The results were confirmed by fluorescence with an anti-macrophage phenotype marker F4/80 antibody (23). Technological improvements in the sensitivity of MRI equipment afforded promising results in detecting smaller numbers of cells that are difficult to label, including T lymphocytes (24).

Chemical exchange saturation transfer has been proposed as a new mechanism for contrast enhancement in MRI (25). In diamagnetic CEST or paramagnetic CEST (PARACEST), exchangeable protons resonate at a chemical shift different from that of water. Radiofrequency applied at their frequency saturates exchangeable protons, which transfer into water and reduce MRI signal in their vicinity. Although the sensitivity is rather low, the possibility of switching the signal "on" and "off" has attracted much interest (26).

Magnetic resonance also allows for high sensitivity detection of non-radioactive fluorine (¹⁹F). Human NK cells were cultured for 24 or 48 h with a commercially available emulsified PFPE perfluorocarbon (CS-ATM-1000) under conditions where labeling had no measurable effect on cell viability and cytotoxicity against K562 leukemia cells. ¹⁹F-labeled NK cells could then be detected at the site of injection and shown to migrate (27).

In vivo labeling

Even if in vitro cell labeling looks rather easy and if progress has been made, direct labeling of cells prior to injection does not allow for long term in vivo imaging. Sensitivity is limited, especially for MRI, when cell viability and functionality is preserved. One drawback has been repeatedly mentioned: macrophages can take up cells or cell debris at the site of injection and migrate. The dilution of the imaging probe during cell division and its release from the cell eventually lead to the disappearance of the signal. Thus, finding alternative routes for tracking cells of interest in vivo has been the subject of many technical developments. One such alternative is the in vitro cell transfection with genes coding for transporters or enzymes as well as metabolic engineering that allow in vivo cell detection using various molecular imaging techniques after injection of a specific tracer.

Genetically engineered cells for radioactive, MRI or bioluminescence imaging

To achieve long term labeling, cells can be genetically engineered to express reporter genes. This reporter gene will allow the targeting of the cells by administering an imaging probe. A stable expression of this reporter allows for a virtually unlimited number of imaging sessions, without any impact of cell division.

Radioactive imaging

Iodine is taken up by the thyroid and by a few other tissues through the sodium-iodine symporter (NIS). Thus, cells were transfected with the NIS gene, most often the human gene (hNIS), injected and imaged by SPECT using a variety of radioactive tracers including iodine-123 (sodium iodide) and technetium-99m (sodium pertechnetate) in a variety of animal models (28). NIS may also be used for

PET with iodine-124 or ^{18}F -tetrafluoroborate (29,30). This approach was used recently to label tumor cells in vivo (31) and to monitor dendritic cell traffic from the skin to lymph nodes (32). This approach has some limitations, though. First, as mentioned above, NIS is expressed by a variety of normal cells, particularly in thyroid, salivary glands and stomach. Thus, imaging cells in these organs is excluded due to background signal. Second, sensitivity for the detection and quantification of transfected cells expressing NIS in vivo is limited because, in the transfected cells, the radioactive tracer does not become linked to tyrosine as iodine is in the thyroid.

Another reporter gene that has attracted much interest is the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk). With this kind of genes that code for intracellular proteins, the risk of immune reactions is reduced. HSV1-tk allows for PET and SPECT using a variety of anti-viral agents specific for the virus kinase and not recognized by the human enzyme. They enter cells and become phosphorylated and trapped intracellularly only in HSV1-tk-transfected cells. Compounds such as FIAU (5-iodo-2-fluoro-2-deoxy-1-D-arabino-furanosyl-uracil), FEAU (2-fluoro-2-deoxyarabinofuranosyl-5-ethyluracil) or acycloguanosine derivatives (e.g. FPCV: fluoropenciclovir, FHBG: 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl) butyl] guanine) may be labeled with ^{18}F and used for in vivo PET imaging. Sensitivity may be improved by using a mutated gene, HSV1-sr39tk, that codes for a more potent enzyme. HSV1-sr39tk may be used with [^{18}F]-FHBG as a tracer (33).

In a similar approach to the transfection of cells with viral thymidine kinase, animals may be engineered to express thymidine kinases in specific cells. As an example, Rosa26-mT/sr39tk mice were generated and HSV1-sr39tk expression in platelets, T lymphocytes or cardiomyocytes was induced. Longitudinal PET imaging and quantification of T-cell homing during inflammation and cardiomyocyte viability after myocardial infarction could then be monitored using [^{18}F]-FHBG, a cell-permeable tracer that is phosphorylated by HSV1-tk and retained inside the cells (34).

Alternatively, cells may be transfected to express cell-surface receptors for peptides as, for instance, the human glucagon-like peptide 1 receptor gene and imaged with the peptide labeled with fluorine-18 (35). A similar approach was used to detect transplanted pancreatic islet cells that express glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) by PET imaging after the injection of ^{64}Cu -DO3A-VS-Cys40-Exendin-4, showing persistent and specific uptake in the mouse pancreas (36). The mutated version of the dopamine receptor, D2R80A, that internalize ^{18}F -Fallypride, has also been proposed for imaging mesenchymal stem cells (37,38).

Magnetic resonance imaging

Reporter-gene transfection has been proposed for MRI. The transferrin receptor has been used to capture transferrin-conjugated SPIO particles (39). Dendritic cells transfected with the ferritin gene show increased iron uptake that may be detected by MRI (40,41). A very similar approach to the NIS system may be used for MRI, by transfecting cells with the Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) that can import manganese (42). In the same setting, radioactive manganese (^{52}Mn), may be used for PET imaging (43).

Optical imaging

Bioluminescence imaging (BLI) consists in the use of a luciferase enzyme, which reacts with its substrate, luciferin, and emits light between 480 and 600 nm, depending on the type of enzyme (firefly, Renilla or bacterial) and substrate (44). This method implies the insertion of the luciferase gene inside the genome of the tracked cells by cell transfection during in vitro culture or by engineering mice to express the luciferase in target cells. In this later case, the mouse itself allow for visualizing intrinsic cells during the development of a pathology. In the case of adoptive cellular therapy, the cells can be isolated from the mouse before the adoptive transfer without need for in vitro transfection. Although the insertion and expression of luciferase is stable, so far adoptively transferred cells have only been followed up to a week, due to the decay of the signal. This may be

linked to the death of transferred cells (45). However, after the disappearance of the BLI signal, mice were sacrificed, and histology or flow cytometry was performed. It has been reported that, although the cells are still present and express luciferase, the BLI signal is no more detectable (46). Metabolic changes may be suspected as luciferases need energy and cofactors. Due to this lack of sensitivity, BLI is very often associated with another reporter gene, like Green Fluorescent Protein (GFP), which allow the ex vivo detection by flow cytometry or immunostaining of the organs.

Indeed, these reporter genes are most of the times not used alone but in association, either to enhance the signal (39) or to confirm its specificity by a different imaging approach (47,48). Most of these proteins are endogenous and not toxic (dopamine receptor, NIS, ferritin). They can be expressed naturally in some organs of the human body, limiting their use. On the other side, inducing their expression in cells implies a possible impact on the functions of the cells.

Animals may also be made to express fluorescent proteins or luciferase in specific cells. This approach has been extensively developed for many different studies, including oncogenesis and cancer therapy (49). For instance, the photoconvertible fluorescent protein Kikume green-red protein was used to track dendritic cells in vivo. The KikGR protein changes its color from green to red upon UV illumination. Then, migration of dendritic cells, specifically CD103⁺ dendritic cells, from the skin to lymph nodes could be monitored after UV illumination of the skin of knock-in mice expressing the protein (50).

Metabolically engineered cells and click chemistry

Metabolic engineering and click chemistry (also known as bio-orthogonal chemistry) takes advantage of fast and high yield chemical reactions that may take place in aqueous media and even in vivo. A variety of chemical reagents have been developed that allow for highly specific reactions that are not hindered by biological conditions. Cells of interest were labeled by glycoengineering and bioorthogonal click chemistry by incubation in vitro with tetra-acetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine to generate unnatural sialic acids with azide groups on their surface. The cells may then be injected in vivo and detected by the second click chemistry reagent, coupled to a fluorochrome such as dibenzyl cyclooctyne-conjugated Cy5 (DBCO-Cy5) for near-infrared fluorescence imaging or to iron-loaded nanoparticles for MRI (51). This approach was shown to improve labeling efficacy and to reduce false signals generated by macrophage phagocytosis of in vitro labeled cell debris. It does not require genetic modifications. So far, this approach has only been used for near-Infrared fluorescence (NIR) with stem cells and tumor cells (52,53). Although NIR imaging is non-toxic and cheap, its limited spatial resolution and poor penetration through tissue complicate its use in clinical imaging.

Indirect methods: labeled antibodies and tracers

Labeled antibodies may be used to detect cells in vivo by SPECT, PET or NIR fluorescence. They have mainly been used for tumor diagnosis, staging or tumor response monitoring (54). It has been reported that labeled antibodies allow the tracking of T cells in vivo (55).

The first step is to choose the target antigen. Ideally, this antigen should be exclusively expressed on target cells, but most of the time other tissue also express it. For T lymphocytes, many targets have been tested, e.g. CD3, CD8, CD2 and CD7 (56–58).

Once the target is chosen, the antibody must be radiolabeled. Ideally, the radionuclide has a half-life compatible with the biological half-life of the antibody. In human, ⁸⁹Zr and ⁶⁴Cu, with half-lives of 78.4 and 12.7 hours respectively, have been used for PET imaging. The radiolabeling method also has an important impact on the quality of the images, since free radionuclide can lead to enhanced background noise, or worse, false positive signal in normal organs, where the target antigen is not expressed. For instance, ⁸⁹Zr shows a natural tropism to the bone (59) that can impede the tracking of bone marrow cells.

Multistep labeling techniques using antibodies have been developed to improve target to normal tissues ratio. Among these pretargeting approaches, the affinity enhancement system (AES) has been shown to be an excellent method for in vivo tumor imaging by SPECT and PET (60). Recently, new pretargeting approaches have been developed. One is based on the in vivo formation of an oligonucleotide duplex. A first oligonucleotide analogue (e.g. peptide nucleic acid or PNA) is coupled to an antibody or a small binding protein (e.g. an anti-HER2 Affibody) for pretargeting of a radiolabeled complementary oligonucleotide analogue (61). Another approach is based on bio-orthogonal chemistry (62). The CC49 antibody recognizing the tag72 antigen derivatized with trans-cyclooctene (TCO) was used for pretargeting ^{111}In -labeled DOTA-dipyridyltetrazine, demonstrating fast and high tumor activity uptake and high tumor to muscle ratio in a mouse model. Using small binding proteins such as diabodies or affibodies instead of intact IgG antibodies improves the pretargeting performances for PET (62,63). Pretargeting may also be applied to NIR fluorescence imaging (63).

The feasibility of detecting cells in vivo using MRI and contrast agents targeted using antibodies or antibody fragments has been tested. Magnetic iron oxide nanoparticles were coated with ethylene oxide polymers and coupled to a ScFv targeting the epidermal growth factor receptor. The product showed a long blood circulation time and low accumulation in liver and spleen. Although in vitro binding and internalization was specific, 24 hours after administration to mice bearing EGFR-positive breast cancer 4T1 mouse mammary tumors, MRI signal reduction resulting from uptake of the reagents in the tumor was observed but this signal reduction was equivalent for the targeted and the control products (64). More recently, the same approach was improved by site-selective scFv conjugation to SPION PEG nanoparticles. In vivo, the decrease of MR signals in HER2⁺ xenograft tumor was about 30% at 24 h after the injection, while non-targeted SPION PEG nanoparticles showed no effect (65).

Bi(multi)modal imaging

Multimodality approaches deserve specific attention, even if they are generally limited to preclinical studies. Not only can they combine various imaging modalities, such as radioactive, MRI or optical imaging, but also ex vivo and in vivo labeling as well as post-mortem studies. Thus, bimodal systems have emerged that combine magnetic resonance imaging (MRI) or PET with fluorescence or bioluminescence.

Genetically engineered dendritic cells (DC) have been developed for MRI. Proteins which have an affinity for iron compounds may be used as MRI reporters. In a recent study, DC were engineered to express human ferritin heavy chain (FTH), which chelates iron and acts as an endogenous MRI contrast agent, and GFP genes to allow both fluorescence and MRI cell tracking (40). Reporter genes can also be an enzyme like the *Drosophila melanogaster* 2'-deoxynucleoside kinase (Dm-dNK) that phosphorylates native deoxynucleosides and a wide range of synthetic nucleoside analogs, including fluorescent nucleosides (66). In this study, the fluorescent nucleoside analog, 2'-deoxycytidine (pyrrolo-dC), generated highly specific CEST MRI signal and fluorescence for bimodal imaging (67).

DC can be loaded by phagocytosis of an antigen labeled with an MRI contrast agent (68). It is possible to effectively load DC with multifunctional polymeric nanoparticles. Nanoparticles composed of iron oxide bearing the OVA antigen coupled to a NIR fluorophore (MNP-OVA) allowed the monitoring of the migration of DCs to lymph nodes in DC adoptive transfer immunotherapy using NIR fluorescence imaging and MRI (69).

PET tracking of genetically engineered DC in combination with bioluminescence has also been developed. In a study, DC were made to express both human NIS and effluc genes. DC migration is then made possible by using ^{18}F -tetrafluoroborate (TFB), a substrate for the NIS reporter gene. Bioluminescence imaging is performed to confirm PET results (32). A combination of PET and Cerenkov luminescence has also been described (70).

Non-phagocytic regulatory T cells (Tregs) have been imaged in vivo after transduction by human NIS and the fluorescent protein mCherry. NIS expressing Tregs were labeled in vitro with technetium-99m pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) and imaged in vivo in C57BL/6 mice by SPECT/CT. After 24 hours, Tregs were detected in the spleen and the bimodal labeling confirmed their localization by organ biodistribution studies and flow cytometry (71). In a similar way, bone marrow stem cells were labeled with gadodiamide (Omniscan), a non-ionic complex of gadolinium, using the fluorescent Arrest-In transfection reagent (72).

Nanoparticle systems can integrate therapeutic and imaging agents in a single formulation. They may be particularly useful as multimodal imaging agents. They have been used to deliver these agents through passive or active targeting to cells in vitro and in vivo. The different kinds of such nanoparticles, which include polymeric nanoparticles, micelles, liposomes and dendrimers and their potential applications in cancer immunotherapy, and immune cell tracking have been reviewed in detail (73).

Cell tracking achievements: what happened in cell tracking over the last ten years?

New methods have been developed, but has in vivo cell tracking advanced (cancer) immunotherapy? In vivo imaging has the potential to contribute as a drug development tool to improve the understanding of complex mechanisms of action, as a tool to improve efficacy, for example, by stratifying patients as possible responders or non-responders, and as a non-invasive treatment response biomarker to guide immunotherapy and recognize early signs of loss of efficacy. In cell therapy, a series of questions are asked about the delivery of the cells, their viability, differentiation of proliferation, as well as about the immune responses they may trigger. At this point, preclinical studies have been numerous, but transfer to the clinic remains quite limited (74). This part of the review aims at providing a non-exhaustive survey of achievements in cell tracking using the current tracking methods summarized in Table 1.

Investigating the tumor and its microenvironment

The evaluation of tumor volume and demonstration of tumor shrinkage remains the basis for tumor response assessment with the so-called RECIST criteria. It can be easily performed by CT-scans or MRI when the lesions are measurable, which is by far not always the case. In addition, tumor shrinkage may be delayed and some effective treatments (e.g. some kinase inhibitors) do not result in prominent tumor volume changes. Alternative response criteria, PERCIST, have been proposed (75). In addition, new imaging technologies offer possibilities to look at tumor lesions not as a non-descript mass of tumor cells, but as a complex body of interacting cells of different origins.

Imaging tumor cellular composition

Measuring the relative number of tumor cells in the tumor lesion before and after treatment, may be useful in response assessment. Highly specific markers are needed. For instance, compounds that target melanin biosynthesis (benzamides) (76) and metallopeptides (77) binding to melanocortin type 1 receptor (labeled MSH analogues) have been used in melanoma, but many other labeled molecules, including antibodies, labeled for SPECT and PET, have shown high imaging performances in terms of sensitivity and specificity (78,79).

Imaging TILs

Monitoring the phenotype and function of tumor infiltrating lymphocytes has long been recognized to be important in adoptive tumor cell therapy (80). This was achieved, in animals as well as in human, by the administration of radiolabeled tracers, usually antibodies or analogues, and SPECT or PET. For example, ^{64}Cu -labeled diabody specific for CD8 was used to assess CD8 T cell density in tumors in mice and treatment related changes (81). Whole antibodies, labeled with zirconium-89

afford similar results (56). Many target antigens have been tested in animal models (56,58) and CD7 seems so far to be the best candidate to target T lymphocytes, with the lowest toxicity (56).

Surprisingly, in patients, immuno-PET has not been used to detect lymphocytes in tumors, other than through their expression of immune checkpoints, as discussed below. However, labeled IL-2 has been used to visualize lymphocyte infiltrating tumors (82,83). In a pilot study, patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab (IPI) or pembrolizumab (PEMBRO) were subjected to SPECT/CT imaging with ^{99m}Tc -labeled interleukin-2 in an attempt to detect TILs. In 5 patients (2 treated with IPI and 3 with PEMBRO), metastatic lesions could be visualized with a positive correlation between size and ^{99m}Tc -HYNIC-IL2 uptake, both before and after 12 weeks of therapy (82).

Texture analysis and radiomics may also, without administration of tracer, provide molecular information about infiltration of lymphocytes in tumors. In cancer patients, evidence of for the presence of CD3 T cells in tumors have been obtained by MRI texture analysis (84) and for the presence of CD8 T cells by CT radiomics and Artificial Intelligence analysis (85).

Macrophages

Macrophages are tissue-resident cells of the innate immune systems that perform a variety of functions in host tissue repair and maintenance of homeostasis. Macrophages are associated with auto-immune and inflammatory diseases and, in oncology, one of the tumor escape factors is the presence of pro-tumor macrophage, tumor-associated macrophages (TAM) that support tumor growth (86). In vivo studies have analyzed the biological role and migration of macrophages using different imaging methods such as fluorescent imaging (87), PET, MRI and multimodal imaging. Macrophages migration to the inflammatory site after an induction of inflammation was analyzed by in vitro labeling with radioactive iodide-embedded gold nanoparticles (RIe-AuNPs) and PET imaging (88). During inflammatory disease such as arthritis, atherosclerotic plaques, in vivo staining of the macrophage with ^{111}In - or ^{64}Cu -labeled antibodies allowed imaging follow-up, evaluation of therapeutic efficacy and therapy adaption(89,90). For acute or chronic obstructive pulmonary disease, the recruitment of macrophages was monitored by labeling with amine-modified PEGylated dextran-coated SPIO and MRI (91).

In oncology, macrophages are an important part of the tumor microenvironment and thus a therapeutic target. Indeed, the presence of TAM favors tumor escape. In order to assess their presence in tumors and to analyze the efficacy of therapy, these cells were tracked by immuno-SPECT using ^{111}In -labeled anti F4/80 (92) antibody, by MRI using the contrast agents MPIO (93) and ultra-small iron oxide nanoparticles (USPIO) (94), by BLI in transgenic luciferase mice (95) or by multimodal imaging combining MRI and BLI (96). PET imaging using labeled ligands targeting receptors overexpressed in macrophages, such as the Translocator protein (peripheral benzodiazepine receptor), has also been proposed (97).

Imaging tumor metabolic activity

^{18}F -FDG is the most commonly used radiopharmaceutical for imaging tumor metabolism in clinical practice. Its use is based on the increased glycolytic rate in tumors compared to physiologic cells, known as the Warburg effect. However, inflammatory and other metabolically active effector immune cells may contribute to activity uptake in tumor lesions (98). By contrast, lesions with high numbers of proliferative tumor cells are ^{18}F -FDG avid, whereas low ^{18}F -FDG avid lesions have been shown by immunohistology to be infiltrated by activated immune cells. As a result, ^{18}F -FDG is not considered as a marker of immune response and new markers such as amino acids, nucleotides, choline, and receptor ligands have been studied. In hematolymphoid tissues, however, increased levels of deoxycytidine kinase (DCK) expression is found; DCK is the rate-limiting step in the deoxycytidine salvage pathway. The tissue-specific expression of this enzyme allows more specific targeting by, for example, ^{18}F -2-fluoro-D-(arabinofuranosyl)cytosine (^{18}F -FAC), which has been shown to accumulate preferentially in CD8⁺ T cells and in innate immune cells in mice (99).

¹⁸F-labeled 3-fluoro-3-deoxythymidine (¹⁸F-FLT) is trapped intracellularly after phosphorylation by thymidine kinase 1 (TK-1) but is not incorporated into DNA since ¹⁸F-FLT-monophosphate is a very poor substrate of thymidylate kinase (TMPK). Imaging with ¹⁸F-FLT has been evaluated to show proliferation more specifically (18), but effector immune cells that infiltrate tumors are mostly of a differentiated phenotype and do not proliferate. Thus ¹⁸F-FLT uptake in the lymph nodes of vaccinated patients only increased in the presence of antigen-loaded DC, providing the first clinical demonstration that immune responses induced by antigen-specific therapy can be imaged in vivo (98).

In bladder cancer, and presumably in other cancers, correlations have been observed between tumor ¹⁸F-FDG uptake and expression of PD-1/PD-L1 (100). Such a correlation may be useful for the selection of appropriate therapeutic strategies.

Immune checkpoint inhibitors: assessment of immune status in tumor lesions

Immunotherapy agents do not directly attack tumors but re-activate the immune system by targeting adaptive or innate immunity. Immuno-oncology has been revolutionized by the introduction of immune checkpoint inhibitors (ICI) and the approval of ipilimumab in 2011. ICI are monoclonal antibodies targeting immuno-regulatory molecules on the surface of T cells, antigen-presenting cells, and neoplastic cell populations. Clinical success of reagents blocking the CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CD152) and PD-1/PD-L1 checkpoints (programmed cell death protein 1, CD279; programmed death-ligand 1, CD274) has driven rapid regulatory approval for treatment of patients with both solid and hematologic malignancies (101). Patients treated with immune checkpoint inhibitors (ICI) have objective response rates of 20 to 40% for solid tumors, lymphomas and malignant melanomas. Thus, 60% of patients do not respond to treatment. It may of course be expected that patients with tumors presenting a higher load of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) are more likely to respond to anti-PD-1/PD-L1 check point inhibitors (102).

A detailed understanding of the tumor microenvironment, including the identification and quantification of different immune cell subsets, their spatial context, and the expression of these immune checkpoint markers is obviously required to go further with these new therapies (109). Changes in immune cell infiltration and biomarker expression before and after therapeutic intervention are critical parameters for clinical development (103). Thus, assessment of PD-L1 expression by IHC has emerged as an important predictive biomarker for patients with various cancers including non-small cell lung cancer (NSCLC) and renal cell cancer (104).

Immuno-detection using antibodies labeled with zirconium-89 or copper-64 for PET, as well as indium-111 for SPECT, has been used to assess the CTLA-4 and PD-1 status of TIL in vivo and the expression of PD-L1 by tumor cells in order to predict the therapeutic efficacy of the administration of immune checkpoint inhibitors in mice and in human (105–108). This approach was also proposed in the context of anti CTLA-4 therapy (109). Based on tumor biopsies, it appears that some patients with PD-L1-negative tumors show clinical benefit of anti-PD-L1 treatment. Thus, a zirconium-89-labeled anti-PD-L1 antibody (atezolizumab), was used to image 22 cancer patients before atezolizumab therapy. High PET signal was observed in lymphoid tissues and inflammation sites. In tumors, high but heterogeneous and variable across tumors uptake was observed and clinical responses could be better correlated with PET than with immunohistochemistry or other biomarkers (110).

In mice, the presence of CD8+ T-cells was monitored using ⁸⁹Zr-labeled an anti-CD8 single domain antibody after treatment of B16 melanoma with an anti-CTLA-4, showing that response correlated with the homogeneity of the distribution of CD8+ T-cells through the tumors (111). In mice with B6-F10 syngeneic melanoma, an anti-mouse PD-1 antibody labeled with copper-64 showed tumor uptake (105).

Monitoring the activation and expansion of immune effector cells

Activation and expansion of the immune system may be monitored by imaging changes in the expression of various receptors to cytokines and growth factors as well as changes in the amounts of interstitial water resulting from inflammation. Immune cell trafficking is another aspect of immune system activation.

Imaging immune cell activation

Several examples may be found in preclinical and clinical studies. In mice, an antibody against the cytokine IFN γ , which becomes sequestered at the surface of tumor cells after its production by T lymphocytes, was shown to reflect the activation status of cytotoxic T cells (112).

Reactive lymph nodes also express and secrete chemokines that induce immune cells relocation. Among others, the CCR7 chemokine and chemotactic agents, which play a key role in directing cell trafficking, are suitable imaging targets. For example, CXCL12 is a key chemotaxis factor for lymphocytes with expression of the CXCR4 receptor on their cell membrane (113). PET tracers targeting CXCR4 were thus used in cardiovascular disease and infections. Interestingly, Radiolabeled CXCR4 ligands are also very effective for cancer cell imaging (e.g. ^{68}Ga -labeled pentixafor) and CXCR4-trafegating therapeutics labeled with ^{177}Lu are currently under clinical development (113).

Activation of the immune system also results in VEGF release and, subsequently, in significant lymph node volume increase. Lymph node volume can be measured using various techniques including MRI, CT, and ultrasound. Ultrasound imaging using targeted microbubbles improves the evaluation of the microvasculature (114). Dynamic contrast-enhanced (DCE)-MRI using gadolinium (Gd) or USPIO-based contrast agents may also be used to monitor angiogenesis: expansion of lymph node size, total blood flow and blood volume, permeability of perfused capillaries, and total surface of perfused capillaries. MRI measures of vascularity using iron-based contrast agents have been validated against histology, the gold standard in angiogenesis assessment. Diffusion-weighted (DW)-MRI detects metastatic lymph nodes (115) and may be able to image reactive LNs in immune responses.

Imaging the expression of VEGF receptor may also be a way to monitor the activation of endothelial cells in LN resulting from immunotherapy. This was achieved in preclinical models by using anti-VEGFR (bevacizumab) labeled with indium-111 for SPECT (116) or by using RGD peptides labeled with various radionuclides for SPECT and PET imaging (117,118). These approaches have shown potential in mice, for instance, to image inflammation-induced expansion and regression of lymphatic networks by PET, they have not yet been translated into human.

Changes that occur in the tumor due to an increased immune response can also be imaged using MRI, for example through changes in relaxation times, contrast, or apparent diffusion coefficient (119). These changes have been shown to correlate with conventional histological measures in mice after treatment by transferred cytotoxic T cells that expressed a modified TCR specific for a tumor antigen.

Imaging trafficking of immune effector cells

Antigen presenting cells (APC) are cells of the immune system that present pathogen peptides linked to class I or class II major histocompatibility complex (MHC) molecules to T lymphocytes (TL) to initiate adaptive immune responses. They are dendritic cells (DC), macrophages and B lymphocytes. Analyzing antigen capture, migration to the lymph nodes and antigen presentation by APC started with fluorescently labeled cells using in vivo intravital optical imaging (120,121). Regardless of the microscope type used, this system remains an invasive process, limited in depth penetration and restricted to a specific area of the body. Thus, APC trafficking has been monitored mostly by MRI and, more recently, tracking methods using PET have been reported. Either the cells or mice are genetically engineered, or labeled antigens are loaded in vivo or ex vivo into APC thanks to their phagocytic capacity. DC may be loaded ex vivo with pathogen peptides or irradiated tumor cells and reinjected to the patient. As an alternative, vaccination using labeled irradiated tumor cells or

inactivated pathogens have been used to quantify antigen capture and delivery to lymph nodes by MRI (122).

Imaging lymphocyte trafficking is most easily achieved with ex vivo labeled cells. Transfused cells often traffic initially to the lungs, bone marrow, liver, and spleen. In mice, labeling Th1 cells with ^{64}Cu -PTSM was shown to permit their detection in single LNs and to monitor T-cell homing in vivo over 48 h (116). Changes in cell trafficking resulting from treatments with cyclophosphamide or IL-12 may be monitored by in vivo imaging. A similar method, using zirconium-89, was used to monitor $\gamma\delta$ T-cells homing into tumor lesions in mice (123). IL13R α 2-CAR T cells delivered intravenously were detectable by PET for at least 6 days throughout the central nervous system and within intracranial tumors. When intravenously administered, PSCA-CAR T cells also showed tumor tropism, with a 9-fold greater tumor-to-muscle ratio than for CAR-negative T cells. Bone marrow uptake of ^{89}Zr -labeled hematopoietic stem cells could also be monitored in mice (124) and bone marrow cell uptake in acute fractures in mice could be inhibited, rather than accelerated, by a CXCR4 antagonist, plerixafor (125).

The use of reporter gene expression is another way to study cell trafficking, because imaging is independent of factors lifetime and distribution of the tracer and an enzymatic reporter allows for amplification of a weak signal. Antigen-specific T-cells were made to express a viral Tk gene could be tracked in mice, over a period of 3 weeks, using an ^{18}F -tagged probe specific to this variant of Tk. Detection of 10^4 T cells was claimed (67).

Lymphocytes may also be imaged by targeting cell surface markers. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled IL-2 was used to detect tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma patients (82,83). Non-depleting ^{111}In -labeled anti-CD4 antibodies have been used to track CD4 $^+$ T cells by SPECT in mice with good correlation with pathologic measures (126). In vivo ^{19}F MRI was also used to track homing to draining lymph nodes of T cells that were intracellularly labeled ex vivo with a perfluoropolyether (PFPE) nanoemulsion (127). Time-lapse ^{19}F MRI was used to calculate the number of T-cells in lymph nodes over 21 days and correlated with in vitro fluorescence measurements to compensate for in vivo T-cell division. MRI also allowed visualization of CD8 $^+$ cytotoxic T cells, regulatory T cells, and myeloid-derived suppressor cells loaded with to monitor the effect of vaccination. Increased recruitment of cytotoxic T cells and decreased recruitment of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells to the tumor was observed (128).

Cell-based therapies

Earlier results in cell-based therapy

So far, most clinical studies have used $^{99\text{m}}\text{Tc}$ or ^{111}In or superparamagnetic iron oxide to label therapeutic cells for in vivo cell tracking using SPECT or MRI, as reviewed by Srinivas and coworkers (129). Adoptive T-cell therapy (ACT) using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor antigen-specific T cell expanded from peripheral blood are complex but powerful immunotherapies. Clinical trials that included cell tracking have compared various routes of administration, the effect of the number of injected cells or host pretreatment with cyclophosphamide and compared various therapeutic cell preparation and encapsulation methods.

Tracking antigen-presenting cells in vivo

DC are the most effective professional antigen presenting cells for the priming of naïve T cells in vitro and in vivo. These properties are the consequence of constitutive expression of MHC molecules class I and II and co-stimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) and of their ability to secrete regulatory cytokines such as interleukin 12 upon recognition by the T cell receptor. In the immature stage, DC have the ability to capture the antigen by phagocytosis or endocytosis, migrate to the lymph nodes where they become mature and prime T lymphocytes inducing the adaptive immunity. This is the reason why, in recent years, immunotherapy targeting dendritic cells has developed.

Imaging demonstrated the ability of intradermally or subcutaneously administered therapeutic DC to migrate from the sites of injection into lymph nodes with about 4 % of DC reaching draining lymph nodes (130). Actual contact of the DC with T-cells cannot be demonstrated by in vivo imaging, but ex vivo only after lymph node resection. By contrast, intravenously injected mature DC are trapped in the lungs and redistribute to the liver, spleen, and bone marrow. No lymph node localization has been detected so far, which does not mean that DC completely fail to reach the lymph nodes. The techniques may not be sufficiently sensitive to detect the small numbers of cells that do reach the lymph nodes. Direct intranodal administration of therapeutic DC is also common in clinical studies. Then in vivo imaging has been used to study the migration of DC from the primary injected node to secondary nodes. The large variability in the fraction of injected cells (from 0% to 84 %) that was shown to migrate cast doubts on the accuracy of intranodal injections. Labeling the antigen to monitor its fate after DC delivery has been proposed in preclinical in vivo models. When DTPA was conjugated to the epsilon NH₂ group of the Lys154 residue, MHC binding of the peptide was preserved and could still be recognized by cytotoxic T cells. These studies allowed the noninvasive determination of the behavior of MHC–peptide complexes expressed by DC in cell vaccination (131) but has not yet been reproduced in the clinic.

CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cell therapy

CAR T-cell therapy is a fast-growing research field with various therapeutic indications in autoimmunity, allotransplantation, infection and cancer. Enhancing the functionality and the safety of the injected cells is an important aspect of the clinical development of this very potent therapy. Therefore, there is a real need to develop in vivo molecular imaging to better visualize, predict and improve the efficiency of this type of immunotherapy (5). However, so far, clinical studies of CAR T-cell tracking have only established proofs of concept of its feasibility (74).

SPECT and PET imaging are two possible modalities for tracking the fate of T-cells injected for therapeutic use. Labeling T-cells has been extensively investigated and radiolabeling is possible with little impact on cell function or migration ability (13). However, the radionuclide half-life is a limitation to track the cells more than for a few days after injection.

A variety of solutions to this limitation have been proposed (132). While multimodal imaging has been shown possible (133), CAR T-cell tracking in animals has demonstrated homing and persistence in the tumors and spleen by ex vivo MRI of tissue samples after CAR T-cell labelling with perfluorocarbon (134) and in whole animals by immuno-PET (135). Although the context of CAR T-cell therapy would be appropriate to develop genetic modification of the T-cells to express reporter genes as discussed above, the outcome of therapy remains monitored mostly by functional imaging and especially by MRI (136).

Other adoptive T-cell transfer therapies

Although BLI is most of the time used to follow tumor and stem cells, T cells could also be monitored thanks to the luciferase gene; for instance, the migration of CD8 T cells towards tumor site was evaluated in a xenograft mouse model (137), and the migration of tumor associated macrophages has been visualized in a transgenic mouse model of ovarian cancer (95). Also, by optical imaging, but using a fluorophore targeted to NIS-transfected cells, tracking of ex vivo-expanded NK cells has been performed in vitro and in vivo showing fast NK cell accumulation in tumors in triple-negative in breast cancer xenografts (138).

⁸⁹Zr-oxinate labelling was used to track V_{γ9}V_{δ2} T cells in vivo by PET. In a mouse xenograft model of human breast cancer, the V_{γ9}V_{δ2} T cells could be tracked over 1 week and it was shown that injection of PEGylated liposomal alendronate increased homing of the T cells to the tumors, which was confirmed by histology (123).

Stem cell therapies

Mesenchymal stem cells (MSC) have been proposed for cardiac regeneration after myocardial infarction (MI). Mesenchymal stem cells derived from rat fetal heart have the potential to differentiate into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. These cells were labeled with technetium-99m for in vivo tracking that revealed a focal uptake of cells in the anterior mid-ventricular region of the heart in line with subsequent ventricular functional recovery (139). Cardiac stem cells were also loaded with ^{18}F -FDG and imaged by PET to quantify their biodistribution and assess the retention of implanted cells in a model of chronic myocardial infarction in pigs. Acute cell retention was shown not to correlate with cell engraftment, which is improved by IM injection (17).

Stem cells have been tracked in various models with BLI, for instance in acute liver injury or acute kidney injury, to study the migration and persistence of human bone-marrow derived stem cells to the liver and kidney (45,140). Luciferase-transfected adipose-derived stem cells could be transplanted in liver and brain and monitored in vivo by bioluminescence for several days. Ex vivo, immunofluorescence detected the continued expression of luciferase for 4 months, demonstrating that the transplanted cells do not die, even if the bioluminescence signal is lost (46).

In a tumor graft model, the migration of mesenchymal stem cells toward the subcutaneous tumor could also be observed (141). This study took advantage of a different type of luciferase that metabolizes different substrate, allowing them to follow the migration of stem cells with the Firefly Luciferase, and the tumor progression with the Renilla Luciferase.

BLI imaging has allowed to investigate the impact of stem cells injection modalities, showing that the intravenous route often leads to sequestration in the lung (142) preventing the migration of stem cells to other organs, while the intracardiac route seems to prevent this phenomenon.

Discussion

Cell tracking has a long history of routine clinical use in Nuclear Medicine and it serves a purpose in infectious and inflammatory diseases despite its limitations (143). Imaging has an increasing role in the context of personalized medicine, which becomes the approach to take, at least in developed countries. CT-scan, MRI and ultrasonography are now inescapable and Nuclear Medicine modalities have gained larger recognition, particularly in cancer. However, the number of tracers of frequent, routine use remains quite limited. In addition to bone and thyroid scans, ^{18}F -FDG is certainly the tracer that has the biggest impact in cancer management, with a few other PET tracers for those cancers in which ^{18}F -FDG does not perform so well, such as prostate cancer. In view of the incredible number of preclinical and early clinical studies about cancer imaging, this seems not much. There are many obvious reasons, the major one being the difficulty of demonstrating that a new imaging technique has its place in medicine as compared to all existing ones. If the imaging technique needs an injectable tracer, such as a radiopharmaceutical, the situation is worse, because of the cost of developing a product that has the regulatory status of a drug and by far not the sales and price of a therapeutic compound.

Will immunotherapy change this situation? Most of the very large number of original publications and reviews that deal with immunotherapy advocate for more imaging, especially more specific imaging of receptors, antigens and other biomarkers that characterize the function of cells in vivo. With the progress of cellular therapies, whether regenerative or cancer-oriented, many papers call for cell tracking in vivo as a way to understand their behavior and mechanisms of action and, by the way, to design improved therapies. Indeed, if not all novel immunotherapies are cell therapies, they all bear upon complex cellular interactions at the tumor sites and in immunologic tissues and better knowledge of the nature of cancer and non-cancer cells residing in tumors, their activation, proliferation and migration in living animals and, of course, in humans, must be a way of progress in therapy.

This realization triggered a lot of developments that made possible better cell labeling, mostly to make them visible by MRI and PET, for longer times after re-injection, as well as improved tracers to target specific biomarkers in vivo, using SPECT and PET, but also MRI, not only on tumor cells but on those cells that make the tumor microenvironment, e.g. endothelial cells, infiltrating antigen-presenting cells, lymphocytes, macrophages and other cells of the immune system. New techniques have been developed and the use of reporter genes to make cells detectable any time after their inoculation using specific tracers is a particularly elegant and powerful one. This review has rapidly depicted these approaches and it is expected that it convinces the reader that they are feasible and effective.

There is no best technique, though. It depends on the objective and, obviously, the most powerful one, for instance the use of reporter genes, are associated with complex manipulations, cost and regulatory hurdles. Interestingly, radioactive (SPECT, PET) and non-radioactive (MRI, optical imaging, ultrasonography) methods have been proposed, which all have advantages and drawbacks. Of course, bimodal and even multimodal agents have been developed. Multimodal imaging is clearly the way to go, with SPECT and PET now always associated with CT and PET-MRI systems developing. It is also clear that multimodal imaging experiments in animals that allowed for in vivo imaging and ex-vivo in-depth investigation of the fate of injected cells and confirmation of in vivo imaging results are most convincing. However, such studies do not necessarily need bifunctional tracers, which sometimes look more like "tours de force" than candidates for further development.

One question here is: have these developments and studies been useful for the development of immunotherapy? The answer is not obvious. Such studies have pointed out to some problems and they have been mostly confirmatory, when they have not merely been proofs of concept for feasibility. This review has attempted at presenting clinical results in cell tracking and, while it may have missed some, it is in line with other recent reviews on the subject to conclude that the number of clinical studies is quite small. It may be considered that this is only the beginning of a new story and that groundbreaking discoveries in immunotherapy will be made thanks to imaging and that at least some of the approaches reported here will find their application. Very few cell tracking techniques will become routine. The introduction of reporter genes in therapeutic cells is probably the technique with the highest sensitivity for long term monitoring of cell trafficking, proliferation and persistence. For cell therapies in which the cells are genetically modified, namely CAR-T cells, the addition of a second gene and cell tracking may be considered in the context of clinical trials. Whether this approach will be used in routine clinical practice is not likely. Conversely, tracers for in vivo imaging, particularly PET imaging, designed to detect and quantify specific cell populations are being developed and some will find a routine use. It is always difficult to make predictions, but it seems logical that expensive therapies or therapies that may be efficacious but associated with serious side-effects will not be given to patients who have no chance to benefit from them. The imaging of tumor microenvironment may give answers to how the patients will respond to such therapies, especially immunotherapy. Expression of immune checkpoints, like anti-PD-1, is already assessed from biopsies prior to immunotherapy, but the use of PET-imaging or MRI could allow a non-invasive assessment of the immune state of the tumor. This could provide new insights into the prediction of the response to treatment in patients. This is the theragnostic approach, which is not a reality today, but most probably be one in the future. It is also quite probable that future research in immunotherapy will take advantage of all these technological advances, certainly for preclinical studies, but also in the clinic. Indeed, it is time to combine the novel therapeutic approaches, which afford impressive remissions but not yet to all patients and this will call for precise, specific understanding of what is really going on in the living organism.

Figure legend

Figure 1 : Schematic representation of the different labeling methods (*Ex vivo* labeling, *In vivo* labeling and bimodal)

Table 1 : Current tracking cell methods in pre-clinic, depending on the type of labeling (direct, indirect and transgene) and the modality of imaging (TEP/SPECT, MRI, BLI/fluorescence and multimodal imaging)

References

1. Baicus A. History of polio vaccination. *World J Virol* (2012) **1**:108. doi:10.5501/wjv.v1.i4.108
2. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2016) **13**:273–290. doi:10.1038/nrclinonc.2016.25
3. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov* (2016) **15**:235–47. doi:10.1038/nrd.2015.35
4. Maldini CR, Ellis GI, Riley JL. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol* (2018) **18**:605–616. doi:10.1038/s41577-018-0042-2
5. Fruhwirth GO, Kneilling M, de Vries IJM, Weigelin B, Srinivas M, Aarntzen EHJG. The Potential of In Vivo Imaging for Optimization of Molecular and Cellular Anti-cancer Immunotherapies. *Mol Imaging Biol* (2018) **20**:696–704. doi:10.1007/s11307-018-1254-3
6. van Dongen GAMS, Visser GWM, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* (2007) **12**:1379–89. doi:10.1634/theoncologist.12-12-1379
7. Roca M, de Vries EFJ, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with ¹¹¹In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2010) **37**:835–41. doi:10.1007/s00259-010-1393-5
8. Kircher MF, Gambhir SS, Grimm J. Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol* (2011) **8**:677–688. doi:10.1038/nrclinonc.2011.141
9. McAfee JG, Subramanian G, Gagne G. Technique of leukocyte harvesting and labeling: Problems and perspectives. *Semin Nucl Med* (1984) **14**:83–106. doi:10.1016/S0001-2998(84)80023-9
10. Phelps ME, Walsh J, McCarthy T, Adonai N, Iyer M, Toyokuni T, Gambhir SS, McCarthy DW, Nguyen KN. Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci* (2002) **99**:3030–3035. doi:10.1073/pnas.052709599
11. Charoenphun P, Meszaros LK, Chuamsaamarkkee K, Sharif-Paghaleh E, Ballinger JR, Ferris TJ, Went MJ, Mullen GED, Blower PJ. [⁸⁹Zr]Oxinate₄ for long-term in vivo cell tracking by positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2014) **42**:278–287. doi:10.1007/s00259-014-2945-x
12. Sato N, Wu H, Asiedu KO, Szajek LP, Griffiths GL, Choyke PL. ⁸⁹Zr-Oxine Complex PET Cell Imaging in Monitoring Cell-based Therapies. *Radiology* (2015) **275**:490–500. doi:10.1148/radiol.15142849
13. Weist MR, Starr R, Aguilar B, Chea J, Miles JK, Poku E, Gerdtts E, Yang X, Priceman SJ, Forman SJ, et al. PET of Adoptively Transferred Chimeric Antigen Receptor T Cells with ⁸⁹Zr-Oxine. *J Nucl Med* (2018) **59**:1531–1537. doi:10.2967/jnumed.117.206714
14. Brown G, Ellis B, Locatelli P, Jones AKP, Fairclough M, Prenant C, Boutin H, McMahon A. A new technique for the radiolabelling of mixed leukocytes with zirconium-89 for inflammation imaging with positron emission tomography. *J Label Compd Radiopharm* (2016) **59**:270–276.

doi:10.1002/jlcr.3392

15. Gennari A, Boutin H, Alzabin S, Jones AKP, Prenant C, McMahon A, Ellis B, Fairclough M. Development of a method for the preparation of zirconium-89 radiolabelled chitosan nanoparticles as an application for leukocyte trafficking with positron emission tomography. *Appl Radiat Isot* (2017) **130**:7–12. doi:10.1016/j.apradiso.2017.09.004
16. Bansal A, Pandey MK, Demirhan YE, Nesbitt JJ, Crespo-Diaz RJ, Terzic A, Behfar A, DeGrado TR. Novel ⁸⁹Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies. *EJNMMI Res* (2015) **5**:19. doi:10.1186/s13550-015-0098-y
17. Collantes M, Pelacho B, García-Velloso MJ, Gavira JJ, Abizanda G, Palacios I, Rodriguez-Borlado L, Álvarez V, Prieto E, Ecay M, et al. Non-invasive in vivo imaging of cardiac stem/progenitor cell biodistribution and retention after intracoronary and intramyocardial delivery in a swine model of chronic ischemia reperfusion injury. *J Transl Med* (2017) **15**:1–11. doi:10.1186/s12967-017-1157-0
18. MacAskill MG, Tavares AS, Wu J, Lucatelli C, Mountford JC, Baker AH, Newby DE, Hadoke PWF. PET Cell Tracking Using 18F-FLT is Not Limited by Local Reuptake of Free Radiotracer. *Sci Rep* (2017) **7**:44233. doi:10.1038/srep44233
19. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem Rev* (1999) **99**:2293–352. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749483> [Accessed March 4, 2019]
20. YANG ZX, CHENG X, JIA Y, GENG K, WU R, YI M, YAN G, HUANG D. Tracking of mesenchymal stem cells labeled with gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid by 7T magnetic resonance imaging in a model of cerebral ischemia. *Mol Med Rep* (2014) **11**:954–960. doi:10.3892/mmr.2014.2805
21. Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* **7**:258–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039625> [Accessed March 4, 2019]
22. Sipe JC, Filippi M, Martino G, Furlan R, Rocca MA, Rovaris M, Bergami A, Zyroff J, Scotti G, Comi G. Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging* (1999) **17**:1521–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10610001> [Accessed March 4, 2019]
23. Foley LM, Hitchens TK, Ho C, Janesko-Feldman KL, Melick JA, Bayir H, Kochanek PM. Magnetic resonance imaging assessment of macrophage accumulation in mouse brain after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* (2009) **26**:1509–19. doi:10.1089/neu.2008.0747
24. Smirnov P. Cellular magnetic resonance imaging using superparamagnetic anionic iron oxide nanoparticles: applications to in vivo trafficking of lymphocytes and cell-based anticancer therapy. *Methods Mol Biol* (2009) **512**:333–53. doi:10.1007/978-1-60327-530-9_19
25. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST). *J Magn Reson* (2000) **143**:79–87. doi:10.1006/jmre.1999.1956
26. Winter PM. Magnetic resonance chemical exchange saturation transfer imaging and nanotechnology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* (2012) **4**:389–398. doi:10.1002/wnan.1167
27. Bouchlaka MN, Ludwig KD, Gordon JW, Kutz MP, Bednarz BP, Fain SB, Capitini CM. ¹⁹F-MRI for monitoring human NK cells in vivo. *Oncoimmunology* (2016) **5**:1–12. doi:10.1080/2162402X.2016.1143996

28. R. Penheiter A, J. Russell S, K. Carlson S. The Sodium Iodide Symporter (NIS) as an Imaging Reporter for Gene, Viral, and Cell-based Therapies. *Curr Gene Ther* (2012) **12**:33–47. doi:10.2174/156652312799789235
29. Jauregui-Osoro M, Sunassee K, Weeks AJ, Berry DJ, Paul RL, Cleij M, Banga JP, O'Doherty MJ, Marsden PK, Clarke SEM, et al. Synthesis and biological evaluation of [¹⁸F]tetrafluoroborate: a PET imaging agent for thyroid disease and reporter gene imaging of the sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2010) **37**:2108–16. doi:10.1007/s00259-010-1523-0
30. Youn H, Jeong JM, Chung J-K. A new PET probe, (18)F-tetrafluoroborate, for the sodium/iodide symporter: possible impacts on nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2010) **37**:2105–7. doi:10.1007/s00259-010-1601-3
31. Diocou S, Volpe A, Jauregui-Osoro M, Boudjemeline M, Chuamsaamarkkee K, Man F, Blower PJ, Ng T, Mullen GED, Fruhwirth GO. [¹⁸F]tetrafluoroborate-PET/CT enables sensitive tumor and metastasis in vivo imaging in a sodium iodide symporter-expressing tumor model. *Sci Rep* (2017) **7**:946. doi:10.1038/s41598-017-01044-4
32. Lee SB, Lee HW, Lee H, Jeon YH, Lee S-W, Ahn B-C, Lee J, Jeong SY. Tracking dendritic cell migration into lymph nodes by using a novel PET probe ¹⁸F-tetrafluoroborate for sodium/iodide symporter. *EJNMMI Res* (2017) **7**:32. doi:10.1186/s13550-017-0280-5
33. Collins SA, Hiraoka K, Inagaki A, Kasahara N, Tangney M. PET Imaging for Gene and Cell Therapy. *Curr Gene Ther* (2012) **12**:20–32. doi:10.2174/156652312799789271
34. Thunemann M, Schörg BF, Feil S, Lin Y, Voelkl J, Golla M, Vachaviolos A, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Olbrich M, et al. Cre/lox-assisted non-invasive in vivo tracking of specific cell populations by positron emission tomography. *Nat Commun* (2017) **8**:444. doi:10.1038/s41467-017-00482-y
35. Pan Y, Lv J, Pan D, Xu Y, Yang M, Ju H, Zhou J, Zhu L, Zhao Q, Zhang Y. Evaluating the utility of human glucagon-like peptide 1 receptor gene as a novel radionuclide reporter gene: a promising molecular imaging tool. *Appl Microbiol Biotechnol* (2019) **103**:1311–1324. doi:10.1007/s00253-018-9562-8
36. Wu Z, Todorov I, Li L, Bading JR, Li Z, Nair I, Ishiyama K, Colcher D, Conti PE, Fraser SE, et al. In Vivo Imaging of Transplanted Islets with ⁶⁴Cu-DO3A-VS-Cys 40 -Exendin-4 by Targeting GLP-1 Receptor. *Bioconjug Chem* (2011) **22**:1587–1594. doi:10.1021/bc200132t
37. Haralampieva D, Betzel T, Dinulovic I, Salemi S, Stoelting M, Kramer SD, Schibli R, Sulser T, Handschin C, Eberli D, et al. Noninvasive PET Imaging and Tracking of Engineered Human Muscle Precursor Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering. *J Nucl Med* (2016) **57**:1467–1473. doi:10.2967/jnumed.115.170548
38. Schonitzer V, Haasters F, Kasbauer S, Ulrich V, Mille E, Gildehaus FJ, Carlsen J, Pape M, Beck R, Delker A, et al. In Vivo Mesenchymal Stem Cell Tracking with PET Using the Dopamine Type 2 Receptor and ¹⁸F-Fallypride. *J Nucl Med* (2014) **55**:1342–1347. doi:10.2967/jnumed.113.134775
39. Guo R, Li Q, Yang F, Hu X, Jiao J, Guo Y, Wang J, Zhang Y. In Vivo MR Imaging of Dual MRI Reporter Genes and Deltex-1 Gene-modified Human Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Closed Penile Fracture. *Mol Imaging Biol* (2018) **20**:417–427. doi:10.1007/s11307-017-1128-0
40. Kim HS, Woo J, Lee JH, Joo HJ, Choi YS, Kim H, Moon WK, Kim SJ. In vivo tracking of dendritic cell using MRI reporter gene, ferritin. *PLoS One* (2015) **10**:1–13. doi:10.1371/journal.pone.0125291
41. He X, Cai J, Liu B, Zhong Y, Qin Y. Cellular magnetic resonance imaging contrast generated by

- the ferritin heavy chain genetic reporter under the control of a Tet-On switch. *Stem Cell Res Ther* (2015) **6**:207. doi:10.1186/s13287-015-0205-z
42. Bartelle BB, Mana MD, Suero-Abreu GA, Rodriguez JJ, Turnbull DH. Engineering an effective Mn-binding MRI reporter protein by subcellular targeting. *Magn Reson Med* (2015) **74**:1750–7. doi:10.1002/mrm.25566
 43. Lewis CM, Graves SA, Hernandez R, Valdovinos HF, Barnhart TE, Cai W, Meyerand ME, Nickles RJ, Suzuki M. ⁵²Mn Production for PET/MRI Tracking Of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Theranostics* (2015) **5**:227–239. doi:10.7150/thno.10185
 44. Kim JE, Kalimuthu S, Ahn B-C. In Vivo Cell Tracking with Bioluminescence Imaging. *Nucl Med Mol Imaging (2010)* (2015) **49**:3–10. doi:10.1007/s13139-014-0309-x
 45. Xie P, Hu X, Li D, Xie S, Zhou Z, Meng X, Shan H. Bioluminescence Imaging of Transplanted Mesenchymal Stem Cells by Overexpression of Hepatocyte Nuclear Factor4 α : Tracking Biodistribution and Survival. *Mol Imaging Biol* (2019) **21**:44–53. doi:10.1007/s11307-018-1204-0
 46. Muñoz MF, Argüelles S, Guzman-Chozas M, Guillén-Sanz R, Franco JM, Pintor-Toro JA, Cano M, Ayala A. Cell tracking, survival, and differentiation capacity of adipose-derived stem cells after engraftment in rat tissue. *J Cell Physiol* (2018) **233**:6317–6328. doi:10.1002/jcp.26439
 47. Qin C, Cheng K, Chen K, Hu X, Liu Y, Lan X, Zhang Y, Liu H, Xu Y, Bu L, et al. Tyrosinase as a multifunctional reporter gene for Photoacoustic/MRI/PET triple modality molecular imaging. *Sci Rep* (2013) **3**:1490. doi:10.1038/srep01490
 48. Sanches PG, Peters S, Rossin R, Kaijzel EL, Que I, Löwik CWGM, Grull H. Bone metastasis imaging with SPECT/CT/MRI: A preclinical toolbox for therapy studies. *Bone* (2015) **75**:62–71. doi:10.1016/j.bone.2015.02.002
 49. Kocher B, Piwnica-Worms D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters in vivo. *Cancer Discov* (2013) **3**:616–629. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0503
 50. Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FHW, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep* (2015) **4**:6030. doi:10.1038/srep06030
 51. Kang S-W, Lee S, Na JH, Yoon HI, Lee D-E, Koo H, Cho YW, Kim SH, Jeong SY, Kwon IC, et al. Cell Labeling and Tracking Method without Distorted Signals by Phagocytosis of Macrophages. *Theranostics* (2014) **4**:420–431. doi:10.7150/thno.7265
 52. Lee SY, Lee S, Lee J, Yhee JY, Yoon HI, Park S-J, Koo H, Moon S-H, Lee H, Cho YW, et al. Non-invasive stem cell tracking in hindlimb ischemia animal model using bio-orthogonal copper-free click chemistry. *Biochem Biophys Res Commun* (2016) **479**:779–786.
 53. Lee S, Yoon HI, Na JH, Jeon S, Lim S, Koo H, Han SS, Kang SW, Park SJ, Moon SH, et al. In vivo stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface. *Biomaterials* (2017) **139**:12–29. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.05.050
 54. Bailly C, Gouard S, Lacombe M, Saëc P, Chalopin B, Bourgeois M, Chouin N, Tripier R, Halime Z, Haddad F, et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with ⁶⁴CuCl₂ and ¹⁸F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma. *Oncotarget* (2018) **9**:9061–9072. doi:10.18632/oncotarget.23886
 55. McCracken MN, Tavaré R, Witte ON, Wu AM. Advances in PET Detection of the Antitumor T Cell Response. *Adv Immunol* (2016) **131**:187–231. doi:10.1016/bs.ai.2016.02.004

56. Beckford Vera DR, Smith CC, Bixby LM, Glatt DM, Dunn SS, Saito R, Kim WY, Serody JS, Vincent BG, Parrott MC. Immuno-PET imaging of tumor-infiltrating lymphocytes using zirconium-89 radiolabeled anti-CD3 antibody in immune-competent mice bearing syngeneic tumors. *PLoS One* (2018) **13**:e0193832.
57. Mayer KE, Mall S, Yusufi N, Gosmann D, Steiger K, Russelli L, Bianchi H de O, Audehm S, Wagner R, Bräunlein E, et al. T-cell functionality testing is highly relevant to developing novel immuno-tracers monitoring T cells in the context of immunotherapies and revealed CD7 as an attractive target. *Theranostics* (2018) **8**:6070–6087. doi:10.7150/thno.27275
58. Rashidian M, Ingram JR, Dougan M, Dongre A, Whang KA, LeGall C, Cragolini JJ, Bierie B, Gostissa M, Gorman J, et al. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *J Exp Med* (2017) **214**:2243–2255. doi:10.1084/jem.20161950
59. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice. HHS Public Access. *Nucl Med Biol* (2011) **3812**:675–681. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011
60. Bailly C, Bodet-Milin C, Rousseau C, Faivre-Chauvet A, Kraeber-Bodéré F, Barbet J. Pretargeting for imaging and therapy in oncological nuclear medicine. *EJNMMI Radiopharm Chem* (2017) **2**:6. doi:10.1186/s41181-017-0026-8
61. Honarvar H, Westerlund K, Altai M, Sandström M, Orlova A, Tolmachev V, Karlström AE. Feasibility of Affibody Molecule-Based PNA-Mediated Radionuclide Pretargeting of Malignant Tumors. *Theranostics* (2016) **6**:93–103. doi:10.7150/thno.12766
62. Rossin R, Renart Verkerk P, van den Bosch SM, Vuldere RCM, Verel I, Lub J, Robillard MS. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angew Chemie Int Ed* (2010) **49**:3375–3378. doi:10.1002/anie.200906294
63. Zhang X, Wang B, Zhao N, Tian Z, Dai Y, Nie Y, Tian J, Wang Z, Chen X. Improved tumor targeting and longer retention time of NIR fluorescent probes using bioorthogonal chemistry. *Theranostics* (2017) **7**:20912. doi:10.7150/thno.20912
64. Chen H, Wang L, Yu Q, Qian W, Tiwari D, Yi H, Wang AY, Huang J, Yang L, Mao H. Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer. *Int J Nanomedicine* (2013) **8**:3781–3794. doi:10.2147/IJN.S49069
65. Alric C, Hervé-Aubert K, Aubrey N, Melouk S, Lajoie L, Mème W, Mème S, Courbebaisse Y, Ignatova AA, Feofanov A V., et al. Targeting HER2-breast tumors with scFv-decorated bimodal nanoprobe. *J Nanobiotechnology* (2018) **16**:18. doi:10.1186/s12951-018-0341-6
66. Li Y, Soni PB, Liu L, Zhang X, Liotta DC, Lutz S. Synthesis of fluorescent nucleoside analogs as probes for 2'-deoxyribonucleoside kinases. *Bioorg Med Chem Lett* (2010) **20**:841–843. doi:10.1016/j.bmcl.2009.12.097
67. Bar-Shir A, Alon L, Korrer MJ, Lim HS, Yadav NN, Kato Y, Pathak AP, Bulte JWM, Gilad AA. Quantification and tracking of genetically engineered dendritic cells for studying immunotherapy. *Magn Reson Med* (2018) **79**:1010–1019. doi:10.1002/mrm.26708
68. van Krieken JH, Oyen WJG, de Vries IJM, Verdijk P, Figdor CG, Barentsz JO, Boezeman JB, Lesterhuis WJ, Heerschap A, Scheenen TWJ, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* (2005) **23**:1407–1413. doi:10.1038/nbt1154
69. Noh YW, Jang YS, Ahn KJ, Lim YT, Chung BH. Simultaneous in vivo tracking of dendritic cells and priming of an antigen-specific immune response. *Biomaterials* (2011) **32**:6254–6263. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.013

70. Ahn B-C, Jeong SY, Lee J, Jeong H-J, Ahn SB, Lee SB, Jeon YH, Lim D-K, Ghilsuk Y, Kim E-M, et al. Radionuclide-embedded gold nanoparticles for enhanced dendritic cell-based cancer immunotherapy, sensitive and quantitative tracking of dendritic cells with PET and Cerenkov luminescence. *NPG Asia Mater* (2016) **8**:e281–e281. doi:10.1038/am.2016.80
71. Sharif-Paghaleh E, Ratnasothy K, Sunassee K, Tavaré R, Alhabbab R, Mullen GE, Lechler RI, Blower PJ, Smyth LA, Lombardi G, et al. In Vivo SPECT Reporter Gene Imaging of Regulatory T Cells. *PLoS One* (2011) **6**:e25857. doi:10.1371/journal.pone.0025857
72. Li YQ, Tang Y, Fu R, Meng QH, Zhou X, Ling ZM, Cheng X, Tian SW, Wang GJ, Liu XG, et al. Efficient labeling in vitro with non-ionic gadolinium magnetic resonance imaging contrast agent and fluorescent transfection agent in bone marrow stromal cells of neonatal rats. *Mol Med Rep* (2015) **12**:913–920. doi:10.3892/mmr.2015.3532
73. Connot J, Gaspar R, Silva LC, Florindo HF, Silva JM, Fernandes JG, Brocchini S, Barata TS. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem* (2014) **2**:1–27. doi:10.3389/fchem.2014.00105
74. Bulte JWM, Daldrup-Link HE. Clinical Tracking of Cell Transfer and Cell Transplantation: Trials and Tribulations. *Radiology* (2018) **289**:604–615. doi:10.1148/radiol.2018180449
75. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* (2009) **50 Suppl 1**:122S–50S. doi:10.2967/jnumed.108.057307
76. Cammilleri S, Labeille B, Kelly A, Isnardi V, D’Incan M, Tychyj C, Baulieu F, Lacour JP, Grange JD, Miot-Noirault E, et al. 123I-BZA2 as a Melanin-Targeted Radiotracer for the Identification of Melanoma Metastases: Results and Perspectives of a Multicenter Phase III Clinical Trial. *J Nucl Med* (2013) **55**:15–22. doi:10.2967/jnumed.113.123554
77. Ren G, Liu Z, Miao Z, Liu H, Subbarayan M, Chin FT, Zhang L, Gambhir SS, Cheng Z. PET of malignant melanoma using 18F-labeled metallopeptides. *J Nucl Med* (2009) **50**:1865–72. doi:10.2967/jnumed.109.062877
78. Lee ST, Burvenich I, Scott AM. Novel Target Selection for Nuclear Medicine Studies. *Semin Nucl Med* (2019) **49**:357–368. doi:10.1053/j.semnuclmed.2019.06.004
79. Verhoeff SR, van den Heuvel MM, van Herpen CML, Piet B, Aarntzen EHJG, Heskamp S. Programmed Cell Death-1/Ligand-1 PET Imaging. *PET Clin* (2019) **15**:35–43. doi:10.1016/j.cpet.2019.08.008
80. Hinrichs CS, Turcotte S, Wunderlich JR, Dudley ME, Hogan K, Gros A, Tran E, Rosenberg SA. Phenotype and Function of T Cells Infiltrating Visceral Metastases from Gastrointestinal Cancers and Melanoma: Implications for Adoptive Cell Transfer Therapy. *J Immunol* (2013) **191**:2217–2225. doi:10.4049/jimmunol.1300538
81. Seo JW, Tavaré R, Mahakian LM, Silvestrini MT, Tam S, Ingham ES, Salazar FB, Borowsky AD, Wu AM, Ferrara KW. CD8+ T-cell density imaging with 64Cu-labeled cys-diabody informs immunotherapy protocols. *Clin Cancer Res* (2018) **24**:4976–4987. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0261
82. Markovic S, Galli F, Suman VJ, Nevala WK, Paulsen AM, Hung JC, Gansen DN, Erickson LA, Marchetti P, Wiseman GA, et al. Non-invasive clinical visualization of tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma undergoing immune checkpoint inhibitor therapy: A pilot study. *J Clin Oncol* (2017) **35**:3034–3034. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.3034
83. Signore A, Annovazzi A, Barone R, Bonanno E, D’Alessandria C, Chianelli M, Mather SJ, Bottoni U, Panetta C, Innocenzi D, et al. 99mTc-interleukin-2 scintigraphy as a potential tool for

- evaluating tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma lesions: a validation study. *J Nucl Med* (2004) **45**:1647–1652. doi:45/10/1647 [pii]
84. Narang S, Kim D, Aithala S, Heimberger AB, Ahmed S, Rao D, Rao G, Rao A. Tumor image-derived texture features are associated with CD3 T-cell infiltration status in glioblastoma. *Oncotarget* (2017) **8**:101244–101254. doi:10.18632/oncotarget.20643
 85. Sun R, Limkin EJ, Vakalopoulou M, Dercle L, Champiat S, Han SR, Verlingue L, Brandao D, Lancia A, Ammari S, et al. A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study. *Lancet Oncol* (2018) **19**:1180–1191. doi:10.1016/S1470-2045(18)30413-3
 86. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) **14**:399–416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217
 87. Eisenblatter M, Ehrchen J, Varga G, Sunderkotter C, Heindel W, Roth J, Bremer C, Wall A. In Vivo Optical Imaging of Cellular Inflammatory Response in Granuloma Formation Using Fluorescence-Labeled Macrophages. *J Nucl Med* (2009) **50**:1676–1682. doi:10.2967/jnumed.108.060707
 88. Lee SB, Lee HW, Singh TD, Li Y, Kim SK, Cho SJ, Lee S-W, Jeong SY, Ahn B-C, Choi S, et al. Visualization of Macrophage Recruitment to Inflammation Lesions using Highly Sensitive and Stable Radionuclide-Embedded Gold Nanoparticles as a Nuclear Bio-Imaging Platform. *Theranostics* (2017) **7**:926–934. doi:10.7150/thno.17131
 89. Terry SYA, Nayak TK, Oyen WJ, Klein C, Laverman P, Koenders MI, Franssen GM, Freimoser-Grundschober A, Boerman OC. Monitoring Therapy Response of Experimental Arthritis with Radiolabeled Tracers Targeting Fibroblasts, Macrophages, or Integrin α v β 3. *J Nucl Med* (2015) **57**:467–472. doi:10.2967/jnumed.115.162628
 90. Nahrendorf M, Zhang H, Hembrador S, Panizzi P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Swirski FK, Weissleder R. Nanoparticle PET-CT Imaging of Macrophages in Inflammatory Atherosclerosis. *Circulation* (2008) **117**:379–387. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741181
 91. Al Faraj A, Sultana Shaik A, Pureza MA, Alnafeha M, Halwani R. Preferential macrophage recruitment and polarization in LPS-induced animal model for COPD: noninvasive tracking using MRI. *PLoS One* (2014) **9**:e90829. doi:10.1371/journal.pone.0090829
 92. Terry SYA, Boerman OC, Gerrits D, Franssen GM, Metselaar JM, Lehmann S, Oyen WJG, Gerdes CA, Abiraj K. ^{111}In -anti-F4/80-A3-1 antibody: a novel tracer to image macrophages. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2015) **42**:1430–1438. doi:10.1007/s00259-015-3084-8
 93. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, Petit E, Rémy C. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage* (2008) **40**:973–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441552>
 94. Yang R, Sarkar S, Korchinski DJ, Wu Y, Yong VW, Dunn JF. MRI monitoring of monocytes to detect immune stimulating treatment response in brain tumor. *Neuro Oncol* (2016) **19**:now180. doi:10.1093/neuonc/now180
 95. He H, Kanada M, Contag CH, Krishnan V, Schaar BT, Dorigo O, Chiu AC. Imaging of Tumor-Associated Macrophages in a Transgenic Mouse Model of Orthotopic Ovarian Cancer. *Mol Imaging Biol* (2017) **19**:694–702. doi:10.1007/s11307-017-1061-2
 96. Yang R, Sarkar S, Yong VW, Dunn JF. In Vivo MR Imaging of Tumor-Associated Macrophages: The Next Frontier in Cancer Imaging. *Magn Reson Insights* (2018) **11**:1178623X1877197. doi:10.1177/1178623X18771974

97. Lanfranca MP, Lazarus J, Shao X, Nathan H, Di Magliano MP, Zou W, Piert M, Frankel TL. Tracking macrophage infiltration in a mouse model of pancreatic cancer with the positron emission tomography tracer [¹¹C]PBR28. *J Surg Res* (2018) **232**:570–577. doi:10.1016/j.jss.2018.07.015
98. Aarntzen EHJG, Srinivas M, Radu CG, Punt CJA, Boerman OC, Figdor CG, Oyen WJG, de Vries IJM. In vivo imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans. *Cell Mol Life Sci* (2013) **70**:2237–2257. doi:10.1007/s00018-012-1159-2
99. Radu CG, Shu CJ, Nair-Gill E, Shelly SM, Barrio JR, Satyamurthy N, Phelps ME, Witte ON. Molecular imaging of lymphoid organs and immune activation by positron emission tomography with a new [¹⁸F]-labeled 2'-deoxycytidine analog. *Nat Med* (2008) **14**:783–8. doi:10.1038/nm1724
100. Chen R, Zhou X, Liu J, Huang G. Relationship between the expression of PD-1/PD-L1 and 18F-FDG uptake in bladder cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2019) doi:10.1007/s00259-018-4208-8
101. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* (2012) **12**:252–264. doi:10.1038/nrc3239
102. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, Jarnagin W, Fong Y, Blumgart L, D'Angelica M, et al. T cell infiltrate predicts long-term survival following resection of colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol* (2009) **16**:2524–30. doi:10.1245/s10434-009-0585-3
103. Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Front Immunol* (2018) **9**:1474. doi:10.3389/fimmu.2018.01474
104. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* (2015) **14**:847–856. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0983
105. Natarajan A, Mayer AT, Xu L, Reeves RE, Gano J, Gambhir SS. Novel Radiotracer for ImmunoPET Imaging of PD-1 Checkpoint Expression on Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Bioconjug Chem* (2015) **26**:2062–2069. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00318
106. Kikuchi M, Clump DA, Srivastava RM, Sun L, Zeng D, Diaz-Perez JA, Anderson CJ, Edwards WB, Ferris RL. Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma. *Oncoimmunology* (2017) **6**:1–13. doi:10.1080/2162402X.2017.1329071
107. Broos K, Lecocq Q, Raes G, Devoogdt N, Keyaerts M, Breckpot K. Noninvasive imaging of the PD-1: PD-L1 immune checkpoint: Embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy. *Theranostics* (2018) **8**:3559–3570. doi:10.7150/thno.24762
108. Faure M, Rochigneux P, Olive D, Taix S, Brenot-Rossi I, Gilabert M. Hyperprogressive disease in anorectal melanoma treated by PD-1 inhibitors. *Front Immunol* (2018) **9**:1–6. doi:10.3389/fimmu.2018.00797
109. Ehlerding EB, England CG, Majewski RL, Valdovinos HF, Jiang D, Liu G, McNeel DG, Nickles RJ, Cai W. ImmunoPET Imaging of CTLA-4 Expression in Mouse Models of Non-small Cell Lung Cancer. *Mol Pharm* (2017) **14**:1782–1789. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00056
110. Bensch F, van der Veen EL, Lub-de Hooge MN, Jorritsma-Smit A, Boellaard R, Kok IC, Oosting SF, Schröder CP, Hiltermann TJN, van der Wekken AJ, et al. ⁸⁹Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med* (2018) **24**:1852–1858. doi:10.1038/s41591-018-0255-8

111. Rashidian M, Dougan M, Weinberg RA, Whang KA, LeGall C, Ingram JR, Ploegh HL, Gorman J, Cragnolini JJ, Bhan A, et al. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *J Exp Med* (2017) **214**:2243–2255. doi:10.1084/jem.20161950
112. Gibson HM, McKnight BN, Malysa A, Dyson G, Wiesend WN, McCarthy CE, Reyes J, Wei WZ, Viola-Villegas NT. IFN γ PET imaging as a predictive tool for monitoring response to tumor immunotherapy. *Cancer Res* (2018) **78**:5706–5717. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0253
113. Kircher M, Herhaus P, Schottelius M, Buck AK, Werner RA, Wester H-J, Keller U, Lapa C. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Ann Nucl Med* (2018) **32**:503–511. doi:10.1007/s12149-018-1290-8
114. Streeter JE, Gessner RC, Tsuruta J, Feingold S, Dayton PA. Assessment of molecular imaging of angiogenesis with three-dimensional ultrasonography. *Mol Imaging* (2011) **10**:460–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201537> [Accessed March 4, 2019]
115. Sui WF, Chen X, Peng ZK, Ye J, Wu JT. The Diagnosis of Metastatic Axillary Lymph Nodes of Breast Cancer By Diffusion Weighted Imaging: a meta-analysis and systematic review. *World J Surg Oncol* (2016) **14**:155. doi:10.1186/s12957-016-0906-5
116. Griessinger CM, Kehlbach R, Bukala D, Wiehr S, Bantleon R, Cay F, Schmid A, Braumuller H, Fehrenbacher B, Schaller M, et al. In Vivo Tracking of Th1 Cells by PET Reveals Quantitative and Temporal Distribution and Specific Homing in Lymphatic Tissue. *J Nucl Med* (2014) **55**:301–307. doi:10.2967/jnumed.113.126318
117. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez J-P. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha v\beta 3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2007) **34**:2037–2047. doi:10.1007/s00259-007-0497-z
118. Jin Z-H, Furukawa T, Claron M, Boturyn D, Coll J-L, Fukumura T, Fujibayashi Y, Dumy P, Saga T. Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-) $_4$. *Angiogenesis* (2012) **15**:569–580. doi:10.1007/s10456-012-9281-1
119. Galbán CJ, Hoff BA, Chenevert TL, Ross BD. Diffusion MRI in early cancer therapeutic response assessment. *NMR Biomed* (2017) **30**:e3458. doi:10.1002/nbm.3458
120. Pham W, Xie J, Gore JC. Tracking the Migration of Dendritic Cells By In Vivo Optical Imaging. *Neoplasia* (2007) **9**:1130–1137. doi:10.1593/neo.07586
121. Muccioli M, Pate M, Omosebi O, Benencia F. Generation and Labeling of Murine Bone Marrow-derived Dendritic Cells with Qdot Nanocrystals for Tracking Studies. *J Vis Exp* (2011)6–11. doi:10.3791/2785
122. Long CM, van Laarhoven HWM, Bulte JWM, Levitsky HI. Magnetovaccination as a novel method to assess and quantify dendritic cell tumor antigen capture and delivery to lymph nodes. *Cancer Res* (2009) **69**:3180–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3691
123. Man F, Lim L, Volpe A, Gabizon A, Shmeeda H, Draper B, Parente-Pereira AC, Maher J, Blower PJ, Fruhwirth GO, et al. In Vivo PET Tracking of ^{89}Zr -Labeled V γ 9V δ 2 T Cells to Mouse Xenograft Breast Tumors Activated with Liposomal Alendronate. *Mol Ther* (2019) **27**:219–229. doi:10.1016/j.ymthe.2018.10.006
124. Asiedu KO, Koyasu S, Szajek LP, Choyke PL, Sato N. Bone Marrow Cell Trafficking Analyzed by ^{89}Zr -oxine Positron Emission Tomography in a Murine Transplantation Model. *Clin Cancer Res* (2017) **23**:2759–2768. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1561

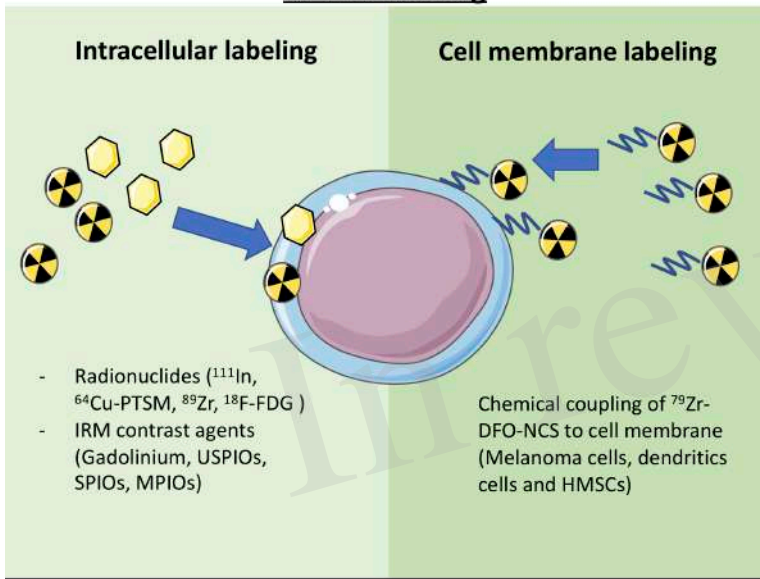
125. Asiedu KO, Ferdousi M, Ton PT, Adler SS, Choyke PL, Sato N. Bone marrow cell homing to sites of acute tibial fracture: 89Zr-oxine cell labeling with positron emission tomographic imaging in a mouse model. *EJNMMI Res* (2018) **8**:109. doi:10.1186/s13550-018-0463-8
126. Kanwar B, Gao DW, Hwang AB, Grenert JP, Williams SP, Franc B, McCune JM. In vivo imaging of mucosal CD4+ T cells using single photon emission computed tomography in a murine model of colitis. *J Immunol Methods* (2008) **329**:21–30. doi:10.1016/j.jim.2007.09.008
127. Srinivas M, Turner MS, Janjic JM, Morel PA, Laidlaw DH, Ahrens ET. In vivo cytometry of antigen-specific T cells using ¹⁹F MRI. *Magn Reson Med* (2009) **62**:747–53. doi:10.1002/mrm.22063
128. Tremblay M-L, Davis C, Bowen C V., Stanley O, Parsons C, Weir G, Karkada M, Stanford MM, Brewer KD. Using MRI cell tracking to monitor immune cell recruitment in response to a peptide-based cancer vaccine. *Magn Reson Med* (2018) **80**:304–316. doi:10.1002/mrm.27018
129. Srinivas M, Aarntzen EHJG, Bulte JWM, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJM, Figdor CG. Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev* (2010) **62**:1080–1093. doi:10.1016/j.addr.2010.08.009
130. Verdijk P, Aarntzen EHJG, Lesterhuis WJ, Boullart ACI, Kok E, van Rossum MM, Strijk S, Eijckeler F, Bonenkamp JJ, Jacobs JFM, et al. Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res* (2009) **15**:2531–40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2729
131. Laverman P, de Vries IJM, Scharenborg NM, de Boer A, Broekema M, Oyen WJG, Figdor CG, Adema GJ, Boerman OC. Development of ¹¹¹In-labeled tumor-associated antigen peptides for monitoring dendritic-cell-based vaccination. *Nucl Med Biol* (2006) **33**:453–458. doi:10.1016/j.nucmedbio.2006.02.005
132. Emami-Shahri N, Papa S. Dynamic imaging for CAR-T-cell therapy. *Biochem Soc Trans* (2016) **44**:386–390.
133. Bhatnagar P, Alauddin M, Bankson JA, Kirui D, Seifi P, Huls H, Lee DA, Babakhani A, Ferrari M, Li KC, et al. Tumor lysing genetically engineered T cells loaded with multi-modal imaging agents. *Sci Rep* (2014) **4**:4502. doi:10.1038/srep04502
134. Chapelin F, Gao S, Okada H, Weber TG, Messer K, Ahrens ET. Fluorine-19 nuclear magnetic resonance of chimeric antigen receptor T cell biodistribution in murine cancer model. *Sci Rep* (2017) **7**:17748. doi:10.1038/s41598-017-17669-4
135. Mall S, Yusufi N, Wagner R, Klar R, Bianchi H, Steiger K, Straub M, Audehm S, Laitinen I, Aichler M, et al. Immuno-PET imaging of engineered human T cells in tumors. *Cancer Res* (2016) **76**:4113–4123. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2784
136. Wang S, O'Rourke DM, Chawla S, Verma G, Nasrallah MP, Morrissette JJD, Plesa G, June CH, Brem S, Maloney E, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging in the assessment of anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor T cell therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Br J Cancer* (2019) **120**:54–56. doi:10.1038/s41416-018-0342-0
137. Perez C, Jukica A, Listopad JJ, Anders K, Kühl AA, Loddenkemper C, Blankenstein T, Charo J. Permissive expansion and homing of adoptively transferred T cells in tumor-bearing hosts. *Int J Cancer* (2015) **137**:359–371. doi:10.1002/ijc.29401
138. Uong TNT, Lee KH, Ahn SJ, Kim KW, Min JJ, Hyun H, Yoon MS. Real-time tracking of ex vivo-expanded natural killer cells toward human triple-negative breast cancers. *Front Immunol* (2018) **9**:1–14. doi:10.3389/fimmu.2018.00825
139. Garikipati VNS, Jadhav S, Pal L, Prakash P, Dikshit M, Nityanand S. Mesenchymal stem cells

- from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: An in vivo serial pinhole gated SPECT-CT study in rats. *PLoS One* (2014) **9**:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0100982
140. Schubert R, Sann J, Frueh JT, Ullrich E, Geiger H, Baer PC. Tracking of adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in a model of cisplatin-induced acute kidney injury: Comparison of bioluminescence imaging versus qRT-PCR. *Int J Mol Sci* (2018) **19**:1–12. doi:10.3390/ijms19092564
141. Kalimuthu S, Zhu L, Oh JM, Gangadaran P, Lee HW, Baek SH, Rajendran RL, Gopal A, Jeong SY, Lee SW, et al. Migration of mesenchymal stem cells to tumor xenograft models and in vitro drug delivery by doxorubicin. *Int J Med Sci* (2018) **15**:1051–1061. doi:10.7150/ijms.25760
142. Scarfe L, Taylor A, Sharkey J, Harwood R, Barrow M, Comenge J, Beeken L, Astley C, Santeramo I, Hutchinson C, et al. Non-invasive imaging reveals conditions that impact distribution and persistence of cells after in vivo administration. *bioRxiv* (2018)202101. doi:10.1101/202101
143. Palestro CJ, Love C, Bhargava KK. Labeled leukocyte imaging: current status and future directions. *Q J Nucl Med Mol Imaging* (2009) **53**:105–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182734> [Accessed March 4, 2019]

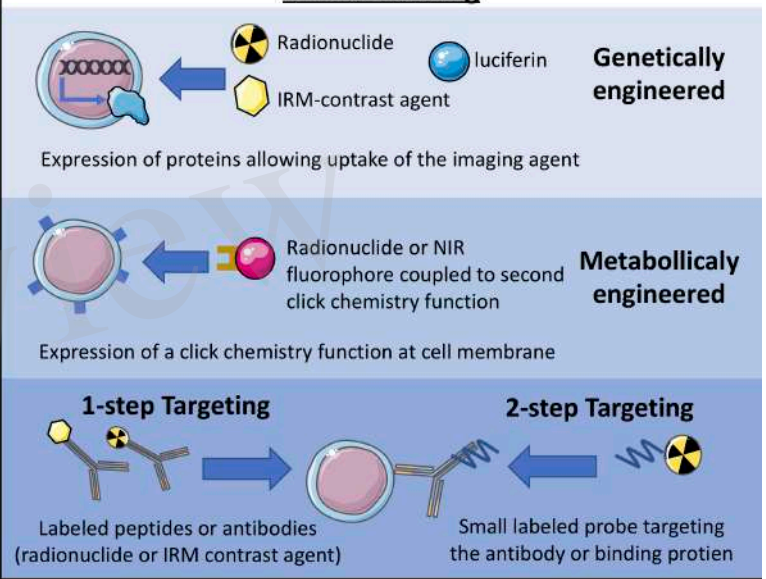
In review

Figure 1.JPEG

Ex vivo labeling



In vivo labeling



Bimodal labeling

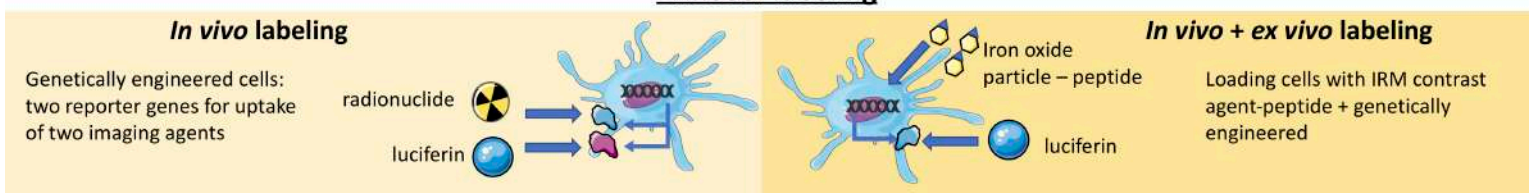


Figure 2.JPEG

	Direct labeling			Indirect labeling				Transgene			
	radioactive/ contrast agent	cell type	reference	radioactive/ contrast agent	targeting molecule	cell type	reference	transgene	radioactive/ contrast agent	cell type	reference
TEP/SPECT	Zirconium 89	dendritic cells T cells	(12) (12, 14, 15, 16, 123)	Copper-64 and Zirconium-89	Radiolabeled antibody anti CD6, CD7, PD1, CD3	Tumor-infiltrated lymphocytes	(82, 56, 104, 106)	Transporter NIS	¹⁸ F-tetrafluoroborate	dendritic cells and tumor cells	(21, 32)
	Indium-111	leukocytes	(9)					GLP-1R	Copper-64 labelled peptide	pancreatic cells	(36)
	Cuivre-64 18-F-DG	glioma cells cardiac stem cells	(10) (17)	Indium-111	anti HER2 antibody rituximab	tumor cells	(61) (62)	D2R80A	¹⁸ F-Fallypride	stem cells	(17,38)
	18-F-FLT Re-AuNPs	HUVECs macrophages	(18) (89)	Lutetium-177 Carbon-11	anti TAG72 diabody siolabeled antibody anti F4 ₂	macrophages	(63) (97)	HSV1-tk	Fluor-18	T cells and cardiomyocytes	(34)
MRI	SPIO	dendritic cells macrophages T cells	(22) (91) (24)	iron nanoparticles	click chemistry	stem cells	(53)	transferrin receptor	SPIO particles	Human Mesenchymal Stem Cells	(39)
	Gadolinium-DTPA MPIO, USPIO Fluorine-19	MSC macrophages NK cells	(20) (23, 88, 93) (27)					ferritin	Iron uptake	dendritic cells	(40,41)
BLI/ Fluorescence				ManNas and DBCO	click chemistry	stem cells tumor cells	(52,53) (63)	luciferase		stem cells T cells macrophage dendritic cells	(46, 94) (137) (95,96) (50)
								Kikume green-red			
multimodal	Fluorescence + MRI	dendritic cells ex vivo labeling tumor peptide	(69)					Fluorescence-MRI: DMAPK protein	CEST MRI	genetically engineered DC	(68,87) (22, 70)
								PET+BLI: NIS	¹⁸ tetrafluoroborate	Human stem cells	(43)
								TEP/IRM: transporteur DMT1	Manganese-52	regulatory T cells	(71)
								PET + fluorescence: NIS and mcherry gene	^{99m} TcO ₄ ⁻		

Abréviations

18F- FDG	18F-2-fluoro-2-desoxy-Dglucose
7AAD :	7-aminoactinomycine D
α-MSH :	α -melanocyte stimulating hormone
A2aR :	adenosine 2A receptor
ABCDE :	asymétrie, bordure, couleur, diamètre, évolution
ACE :	antigène carcino-embryonnaire
AcM :	anticorps monoclonal
ACT :	adoptive cell transfer ou transfert adoptif de cellules
ADN :	acide désoxyribonucléique
Ag :	antigène
AJCC :	american joint committee on cancer
AKT :	protéine kinase B
ALAT :	alanine amino transferase
AMM :	autorisation de mise sur le marché
AMS :	atypical mole syndrome
APAFIS :	autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques
APC :	allophycocyanin
ARF :	ADP-ribosylation factors
ARN :	acide ribonucléique
ASAT :	aspartate amino transférase
B-RAFi :	B-RAF inhibiteur
B7RP1 :	B7-related protein 1
BAD :	BCL-2 Antagonist of cell Death
BATF :	basic leucine zipper transcription factor ATF-like
BCL-2 :	B-cell lymphoma 2
BCR :	B cell receptor
BSA :	albumine de sérum de bœuf
BTLA :	B- and T-lymphocyte attenuator
c-MET :	c-mesenchymal to epithelial transition
CAR-T cells :	chimeric antigen receptor engineered T cells
CBC :	carcinome baso-cellulaire
CCND1 :	cell-cycle regulator cyclin D1
CD :	cluster de différenciation
CDK 2/4 :	cyclin-dependent kinase 2/4
CDKN2A :	cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A gene
CEC :	carcinome épidermoïque cutané
CIRC :	centre international de recherche sur le cancer
CLHP :	chromatographie en phase liquide à haute performance
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	cellules présentatrices d'antigènes
CRCINA :	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers
CT :	computerized tomography
CTL :	cytotoxic T lymphocyte ou lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4 :	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL10 :	chimiokine 10 à motif C-X-C
DAMP :	damaged associated molecular pattern
DBS :	double strand break ou cassure double brin
DC :	dendritic cells ou cellule dendritique
DFO :	desferrioxamine
DLT :	dose limitante toxique
DMT :	dose maximale tolérée
DNP :	2,4-dinitrophenyl
EDTA :	éthylènediaminetétraacétique
EGF-R :	epidermal growth factor receptor
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK :	extracellular signal-regulated kinases
FDA :	food drug administration
FKHR :	forkhead transcription factors
FLT3-Ligand :	fms-like tyrosine kinase 3 ligand
GD2 :	disialoganglioside
GM-CSF :	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gp100 :	glycoprotéine 100
GSK3 β :	glycogen synthase kinase 3 beta.
GTPases :	guanosine triphosphate phosphatase
H&E :	hémalum-éosine
haTcRT :	high affinity TcR-engineered T-cell
HGF :	Hepatocyte growth factor
HIF :	hypoxia inducible factor
HIV :	human immunodeficiency virus
HMGB1 :	high-mobility group protein B1
HSP60/70 :	heat shock protein 60/70
HSV-1 :	virus herpes simplex de type 1
HVEM :	herpes virus entry mediator
IC :	immune checkpoint
ICI :	immune checkpoint inhibitor
ICOS :	inducible T-cell COstimulator
ID/g :	dose injectée par gramme
IDO :	inodoleamine 2,3-dioxygenase
IFN :	interferon
IFNAR1/R2 :	IFN- α/β receptor subunit 1/2
IHC :	immunohistochimie
IL :	interleukine
INCA :	institut national du cancer
INK4A :	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a
IRF :	interferon regulatory factor
IRM :	imagerie par résonance magnétique
IRS-UN :	Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes
ITIM :	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITLC-SG :	instant thin layer chromatography medium
ITSM :	immunoreceptor tyrosine-based switch motif

JAK1/2 :	janus kinase ou just another kinase
KIR :	killer cell immunoglobulin-like receptors
KO :	knock out
LAG3 :	lymphocyte-activation gene 3
LCK :	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LDH :	lactate deshydrogénase
LNH :	lymphome non hodgkinien
LPS :	lipopolysaccharide
LT :	lymphocyte T
LTreg :	lymphocyte T régulateur
MAA :	melanoma-associated antigens
MAGE-A3 :	melanoma associated antigen-A3
MAL :	mélanome acro-lentigineux
MAP3K8 :	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MART-1 :	melanoma antigen recognized by T cells 1
MC1R :	melanocortin 1 receptor
MCSP :	melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan
MDSC :	myeloid derived suppressor cells
MEC :	matrice extracellulaire
MEK :	mitogen-activated protein kinase kinase
Melan-A :	melanocyte antigen A
MELOE-1 :	melanoma-overexpressed antigen 1
MITF :	microphthalmia-associated transcription factor
MN :	mélanome nodulaire
mTOR :	mammalian target of rapamycin
MYD88 :	myeloid differentiation primary response 88
NF-kB :	nuclear factor-kappa B
NF1 :	neurofibromin 1
NFATc1 :	nuclear factor of activated T-cells
NG2 :	neural/glial antigen 2
NK :	natural killer
NMA :	nævi mélanocytaires acquis
NMC :	nævi mélanocytaires congénitaux
NMS :	non-melanoma skin
NSG :	NOD scid gamma mouse
OVA :	ovalbumine
PBS :	phosphate-buffered saline
PD-1 :	programmed cell death 1
PD-L1/2 :	programmed cell death ligand 1/2
PDGFR :	platelet derived growth factor receptor
PDK1 :	pyruvate dehydrogenase kinase 1
PE :	phycoérythrine
PFA :	paraformaldéhyde
PI :	iodure de propidium
PI3K :	phosphatidylinositol 3-OH kinase

PIP3 :	phosphatidylinositol triphosphate
PKCθ :	protein kinase C-theta
PLCγ :	phospholipase C gamma
Pmel17 :	premelanosome protein
PP2A :	protein phosphatase 2
pRAIT :	pretargeted radioimmunotherapy
PSA :	prostate-specific antigen
PSMA :	prostate specific membrane antigen
pT.N.M :	p.tumor.node.metastasis
PTEN :	phosphatase and tensin homolog
RAF :	rat fibrosarcoma virus
RAG2 :	recombination activating gene 2 protein
RAS :	rat sarcoma virus
RIV :	radiothérapie interne vectorisée
RTK :	recepteur tyrosine kinase
S6K1 :	S6 kinase 1
SCF :	stem cell factor
Sck :	serum creatine kinase
SCN-CHX-A''-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepenta-acetic acid	
SHP 1/2:	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2
SPECT :	single photon emission computed tomography
SSM :	superficial spreading melanoma
STAT1 :	signal transducer and activator of transcription 1
T-VEC :	Talimogène laherparepvec
TCR :	T cell receptor
TDM :	tomodensitométrie
TEL :	transfert d'énergie linéique
TEP :	tomographie par émission de positrons
TERT :	telomerase reverse transcriptase
TGF-β :	transforming growth factor-beta
TIGIT :	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL :	tumor infiltrating lymphocytes
TIM-3 :	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TKR :	tyrosine kinase receptor
TLR4 :	toll like receptor 4
TNFR1 :	tumor necrosis factor receptor 1
TNFα :	tumor necrosis factor α
TP53 :	tumor protein P53
TPL2 :	tumor progression locus 2
TRAF6 :	TNF Receptor Associated Factor 6
TRP1/2 :	tyrosinase-related protein 1/2
TSC2 :	tuberous scléoriss compex 2
TUNEL :	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
UICC :	union internationale contre le cancer
UTE :	unité thérapeutique expérimentale

UTR : untranslated transcribed region
UV : ultra-violets
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
VLA-4 : very late antigen-4
VPD450 : violet proliferation dye 450
WT : wild type
ZAP70 : zeta-chain-associated protein kinase 70

Bibliographie

A

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* *8*, 765–772.

Ahmadzadeh M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen – specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* *114*, 1537–1544.

Aide, N., Hicks, R.J., Tourneau, C., Lheureux, S., Fanti, S., and Lopci, E. (2019). FDG PET/CT for assessing tumour response to immunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* *46*, 238–250.

Allen, B.J., Raja, C., Rizvi, S., Li, Y., Tsui, W., Graham, P., Thompson, J., Reisfeld, R., Kearsley, J., Morgenstern, A(2005). Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther.* *4*, 1318–1324.

Allen, K.J.H., Jiao, R., Malo, M.E., Frank, C., Fisher, D.R., Rickles, D., and Dadachova, E. (2019). Comparative Radioimmunotherapy of Experimental Melanoma with Novel Humanized Antibody to Melanin Labeled with ²¹³Bismuth and ¹⁷⁷Lutetium. *Pharmaceutics.* *11*, 1–11.

Allen BJ, Singla AA, Rizvi SM, Graham P, Bruchertseifer F, Apostolidis C, M.A. (2011). Analysis of patient survival in a Phase I trial of systemic targeted alpha-therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy.* *3*, 1041–1050.

Andersson H, Cederkrantz E, Bäck T, Divgi C, Elgqvist J, Himmelman J, Horvath G, Jacobsson L, Jensen H, Lindegren S, Palm S, H.R. (2009). Intraperitoneal α -Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of ²¹¹At-MX35 F(ab')₂—A Phase I Study. *J Nucl Med.* *50*, 1153–1161.

Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* *33*, 2780–2788.

Apetoh, L., Tesniere, A., Ortiz, C., Mira, J., Andr, F., Tursz, T., and Zitvogel, L. (2007). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and

radiotherapy. *Immunol Rev.* 220, 47–59.

Aris, M., Rodri, M., Colombo, M., Marti, J., Bianchini, M., Alperovich, M., and Bravo, A.I. (2012). MART-1- and gp100-Expressing and -Non-Expressing Melanoma Cells Are Equally Proliferative in Tumors and Clonogenic In Vitro. *J Invest Dermatol.* 132, 365–374.

Arkenau, H., Kefford, R., and Long, G. V (2011). Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br. J. Cancer* 104, 392–398.

Ascierto, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F.M., and Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J. Transl. Med.* 10, 1–9.

Ascierto, P.A., Capone, M., Urba, W.J., Bifulco, C.B., Botti, G., Lugli, A., Marincola, F.M., Ciliberto, G., Galon, J., and Fox, B.A. (2013). The additional facet of immunoscore : immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *J. Transl. Med.* 11, 1.

Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJ, Robert L, Foulad D, Cerniglia M, Titz B, Chodon T, Graeber TG, Comin-Anduix B, R.A. (2014). Effects of MAPK and PI3K Pathways on PD-L1 Expression in Melanoma. *Clin Cancer Res.* 20, 3446–3457.

Austin, J.W., Lu, P., Majumder, P., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2014). STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF regulate PD-1 through multiple novel regulatory regions in murine T cells. *J Immunol.* 192, 4876–4886.

Avril M.F., S. Aamdal, J.J. Grob, A. Hauschild, P. Mohr, J.J. Bonerandi, M. Weichenthal, K. Neuber, T. Bieber, K. Gilde, V. Guillem Porta, J. Fra, J. Bonneterre, P. Sai'ag, D. Kamanabrou, H. Pehamberger, J. Sufliarsky, J.L. Gonzalez Larriba, A. Scherrer, and Y.M. (2019). Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma : A Phase III Study. *J. Clin. Oncol.* 22, 1118-1125.

B

Baidoo KE, Yong K, B.M. (2013). Molecular Pathways : Targeted α -Particle Radiation Therapy. *Clin Cancer Res.* 19, 530–537.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Jr, M.C.M., Morton, D.L., Ross, M.I., Sober, A.J., and Sondak, V.K. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* 27, 6199–6206.

Banchereau, J., Palucka, A.K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K.M., Bhardwaj, N., et al. (2001). Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34+ Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. *Cancer Res.* *61*, 6451–6458.

Barach, Y.S., Lee, J.S., and Zang, X. (2011). T cell coinhibition in prostate cancer : new immune evasion pathways and emerging therapeutics. *Trends Mol. Med.* *17*, 47–55.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.

Bardhan K, A.T. and B.V. (2016). The PD1 : PD-L1 / 2 Pathway from Discovery to Clinical implementation. *Front Immunol.* *7*.

Barsoum, I.B., Smallwood, C.A., Siemens, D.R., and Graham, C.H. (2014). A Mechanism of Hypoxia-Mediated Escape from Adaptive Immunity in Cancer Cells. *Cancer Res.* *74*, 665–674.

Bartkova, J., Lukas, J., Guldborg, P., Aisner, J., Kirkin, A.F., Zeuthen, J., and Bartek, J. (1996). The p16-cyclin D / Cdk4-pRb Pathway as a Functional Unit Frequently Altered in Melanoma Pathogenesis. *Cancer Res.* *56*, 5475–5483.

Bastiaannet, E., Oyen, W.J.G., Meijer, S., Hoekstra, O.S., Wobbles, T., Jager, P.L., and Hoekstra, H.J. (2006). Impact of [18 F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography on surgical management of melanoma patients. *Br J Surg.* *93*, 243–249.

Bauman, G., Charette, M., Reid, R., Sathya, J., Ontario, C., and Care, E. (2005). Radiopharmaceuticals for the palliation of painful bone metastases- a systematic review. *Radiother Oncol.* *75*, 258–270.

Beaino, W., Nedrow, J.R., Anderson, C.J., and States, U. (2015). Evaluation of 68 Ga- and 177 Lu-DOTA-PEG4 -LLP2A for VLA-4- Targeted PET Imaging and Treatment of Metastatic Melanoma. *Mol Pharm.* *12*, 1929–1938.

Bei, R., Marzocchella, L., and Turriziani, M. (2010). The Use of Temozolomide for the Treatment of Malignant Tumors : Clinical Evidence and Molecular Mechanisms of Action. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* *5*, 172–187.

Benlalam, H., Vignard, V., Khammari, A., Bonnin, A., Godet, Y., W, M.P., Jotereau, F., Dreno, B., and Labarrière, N. (2007). Infusion of Melan-A/Mart-1 speciWc tumor-inWltrating lymphocytes

enhanced relapse-free survival of melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 56, 515–526.

Bennani-Lahlou M , Mateus C, Escudier B, Massard C, Soria J.C, Spatz A, R.C. (2008). Nævus éruptifs sous sorafénib - Eruptive naevi associated with sorafenib treatment. *Ann Dermatol Venereol.* 135, 672–674.

Bertolotto et al. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes. *Nature* 480, 94–98.

Bertrand, F., Montfort, A., Marcheteau, E., Imbert, C., Gilhodes, J., Filleron, T., Rochaix, P., Andrieu-abadie, N., Levade, T., Meyer, N., et al. (2017). TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat. Commun.* 8, 2256.

Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., and Tsao, H. (2003). Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Arch. Dermatol.* 139, 1620–1624.

Boerman OC, O.W. (2011). Immuno-PET of Cancer: A Revival of Antibody Imaging. *J Nucl Med.* 52, 1171–1173.

Bonnet-duquennoy, M., Papon, J., Mishellany, F., and Labarre, P. (2009). Targeted radionuclide therapy of melanoma : Anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int J Cancer.* 125, 708–716.

Bonnet, M., Mishellany, F., Papon, J., Cayre, A., and Madelmont, J.C. (2010). Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, e1-11.

Borrie, A.E., and Vareki, S.M. (2018). T Lymphocyte e Based Cancer Immunotherapeutics (Elsevier Ltd).

Bradish, J.R., Montironi, R., Lopez-beltran, A., Post, K.M., Maclennan, G.T., and Cheng, L. (2013). Towards personalized therapy for patients with malignant melanoma: molecular insights into the biology of BRAF mutations. *Futur. Oncol.* 9, 245–253.

Bramhall, R.J., Mahady, K., and Peach, A.H.S. (2014). Spontaneous regression of metastatic melanoma - Clinical evidence of the abscopal effect. *Eur. J. Surg. Oncol.* 40, 34–41.

Brash, D.E. (2015). UV Signature Mutations. *Photochem Photobiol* 91, 15–26.

Bright, R., Coventry, B.J., Eardley-harris, N., and Briggs, N. (2017). Clinical Response Rates From

Interleukin-2 Therapy for Metastatic Melanoma Over 30 Years ' Experience : A Meta-Analysis of 3312 Patients. *J. Immunother.* 40, 21–30.

Bruyn, M. De, Rybczynska, A.A., Wei, Y., Schwenkert, M., Fey, G.H., Dierckx, R.A.J.O., Waarde, A. Van, Helfrich, W., and Bremer, E. (2010). Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP) -targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer* 9, 301.

Bumol, T.F. and R.R. (1982). Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 1245–1249.

Burger, J.A., and Bu, A. (2007). The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia : a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *Br J Haematol.* 137, 288–296.

Burnette, B., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y., and Auh, S.L. (2012). The Efficacy of Radiotherapy Relies Upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Res.* 71, 2488–2496.

Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Freeman, G.J., and Sharpe, H. (2007). PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. 27, 111–122.

C

Cadet, J., and Douki, T. (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1005–1007.

Cantley LC, N.B. (1999). New insights into tumor suppression : PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase–AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240–4245.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., and Green, S. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 3666–3670.

Champiat, S., Lambotte, O., Barreau, E., Belkhir, R., Berdelou, A., and Carbonnel, F. (2016). Management of Immune Checkpoint Blockade Dysimmune Toxicities : a collaborative position paper. *Ann Oncol.* 27, 559–574.

Chang, A.E., Redman, B.G., Whitfield, J.R., Nickoloff, B.J., Braun, T.M., Lee, P.P., Geiger, J.D., and Mule, J.J. (2002). A Phase I Trial of Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells in the Treatment of Advanced Cancer 1. *Clin Cancer Res.* 8, 1021–1032.

Chanut, R., and Petrilli, V. (2019). Détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING. *Médecine/Science* 35, 527–534.

Chapman Paul B. Chapman, M.D., Axel Hauschild, M.D., Caroline Robert, M.D., Ph.D., John B. Haanen, M.D., Paolo Ascierto, M.D., James Larkin, M.D., Reinhard Dummer, M.D., Claus Garbe, M.D., Alessandro Testori, M.D., Michele Maio, M.D., David Hogg, M.D., Pa, and B.-3 S.G. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 364, 2507–2516.

Chapon M, Randriamampita C, Maubec E, Badoual C, Fouquet S, Wang SF, Marinho E, Farhi D, Garcette M, Jacobelli S, Rouquette A, Carlotti A, Girod A, Prévost-Blondel A, Trautmann A, Avril MF, B.N. (2011). Progressive Upregulation of PD-1 in Primary and Metastatic Melanomas Associated with Blunted TCR Signaling in Infiltrating T Lymphocytes. *J Invest Dermatol.* 131, 1300–1307.

Chatal JF, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Vuillez JP, Charbonnel B, Rohmer V, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM, B.J.F.E.T.G. (2006). Survival Improvement in Patients With Medullary Thyroid Carcinoma Who Undergo Pretargeted Anti – Carcinoembryonic- Antigen Radioimmunotherapy : A Collaborative Study With the French Endocrine Tumor Group. *J Clin Oncol.* 24, 1705–1711.

Chauvin, J., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J.M., Chen, T.T., Maurer, M., Korman, A.J., et al. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen – specific CD8 + T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 125, 2046–2058.

Chemnitz, J.M., Parry, R. V, Nichols, K.E., June, H., Riley, J.L., Chemnitz, J.M., Parry, R. V, Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J Immunol.* 173, 945–954.

Chen, X., Bäumel, M., Männel, D.N., Zack, O.M., Oppenheim, J.J., Chen, X., Ba, M., and Ma, D.N. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4 + CD25 + T Regulatory Cells. *J Immunol.* 179, 154–161.

Chen L, F.D. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 13, 227–242.

Cherel, M., Gouard, S., Gaschet, J., Sai-Maurel, C., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Bourgeois, M., Gestin, J.-F., Bodere, F.K., Barbet, J., et al. (2013). 213Bi Radioimmunotherapy with an Anti-

mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *J. Nucl. Med.* *54*, 1597–1604.

Cheung, Mitchell, Sharma A, Madhunapantula SV, R.G. (2008). Akt3 and Mutant V600E B-Raf Cooperate to Promote Early Melanoma Development. *Cancer Res.* *68*, 3429–3439.

Chezal, J., Papon, J., Labarre, P., Lartigue, C., Galmier, M., Decombat, C., Chavignon, O., Maublant, J., Teulade, J., Madelmont, J., et al. (2008). Evaluation of Radiolabeled (Hetero)Aromatic Analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for Imaging and Targeted Radionuclide Therapy of Melanoma. *J Med Chem.* *51*, 3133–3144.

Chikuma, S., Terawaki, S., Hayashi, T., Nabeshima, R., Yoshida, T., Shibayama, S., Okazaki, T., Honjo, T., and Alerts, E. (2009). PD-1-Mediated Suppression of IL-2 Production Induces CD8 + T Cell Anergy In Vivo. *J Immunol.* *182*, 6682–6689.

Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma : lessons from mouse and man. *Nat. Rev.* *3*, 559–570.

Choi, J., Beaino, W., Fecek, R.J., Fabian, K.P.L., Laymon, C.M., Kurland, B.F., Storkus, W.J., and Anderson, C.J. (2018). Combined VLA-4–Targeted Radionuclide Therapy and Immunotherapy in a Mouse Model of Melanoma. *J Nucl Med.* *59*, 1843–1849.

Chuang, E., Fisher, T.S., Morgan, R.W., Robbins, M.D., Duerr, J.M., Heiden, M.G. Vander, Gardner, J.P., Hambor, J.E., Neveu, M.J., Thompson, C.B., et al. (2000). The CD28 and CTLA-4 Receptors Associate with the Serine / Threonine Phosphatase PP2A. *Immunity* *13*, 313–322.

Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tyimińska, A. (2013). Skin melanocytes : biology and development. *Postep. Dermatol Alergol* *30*, 30–41.

Cintolo, J.A., Datta, J., Mathew, S.J., and Czerniecki, B.J. (2012). Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Futur. Oncol.* *8*, 1273–1299.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., P, F.A., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes in the Vertical Growth Phase of Primary Cutaneous Melanoma. *Cancer* *77*, 1303–1310.

Conry, R.M., Westbrook, B., Mckee, S., and Graham, T. (2018). Talimogene laherparepvec : First in class oncolytic virotherapy. *Hum. Vaccin. Immunother.* *14*, 839–846.

Conti, M., and Eriksson, L. (2016). Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review

and a discussion. *EJNMMI Phys.* 3, 8.

Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N., and Altman, A. (2000). NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 3394-9.

Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, C.A. (2006). Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin. Proc.* 81, 500–507.

Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands in fi ltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 4275–4280.

Curti, B.D., and Urba, W.J. (2012). Integrating New Therapies in the Treatment of Advanced Melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 13, 327–339.

Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 4340–4346.

D

Dadachova, E., Nosanchuk, J.D., Shi, L., Schweitzer, A.D., Frenkel, A., Nosanchuk, J.S., and Casadevall, A. (2004). Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 14865–14870.

Danielsen, M., Kjaer, A., Wu, M., Martineau, L., Nosrati, M., Leong, S.P.L., Sagebiel, W., Iii, J.R.M., and Kashani-sabet, M. (2016). Prediction of positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) positivity in patients with high-risk primary melanoma. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 6, 277–285.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91, 231–241.

Davies, A.J. (2007). Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma : Y 90 ibritumomab tiuxetan and I 131 tositumomab. *Oncogene.* 26, 3614–3628.

Davies MA, S.Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545–5555.

Degoul F, Borel M, Jacquemot N, Besse S, Communal Y, Mishellany F, Papon J, Penault-Llorca F, Donnarieix D, Doly M, Maigne L, Miot-Noirault E, Cayre A, Cluzel J, Moins N, Chezal JM, B.M. (2013). In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy with a ¹³¹I-labelled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. *Int J Cancer* 133, 1042–1053.

Dhomen, N., Reis-filho, J.S., Dias, R., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Article Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* 15, 294–303.

Dillman, R., Oldham, R.K., Barth, N.M., Cohen, R.J., Minor, D.R., Birch, R., Yannelli, J.R., Maleckar, J.R., Sferruzza, A., Arnold, J., et al. (1991). Continuous Interleukin-2 and Tumor- Infiltrating Lymphocytes as Treatment of Advanced Melanoma. *Cancer*. 68, 1–8.

Disis, M.L. (2010). Immune Regulation of Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 4531–4538.

Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., and Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* 7, 35–49.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, C.L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 8, 793–800.

Dréno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Billaudel S, Labarrière N, J.F. (2002). Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 51, 539–546.

Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA / MART1 and SILV / PMEL17 / GP100 Are Transcriptionally Regulated by MITF in Melanocytes and Melanoma. *Am. J. OfPathology* 163, 333–343.

Dudley, M.E., Wunderlich, J., Nishimura, M.I., Yu, D., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Sherry, R., et al. (2001). Adoptive Transfer of Cloned Melanoma-Reactive T Lymphocytes for the Treatment of Patients with Metastatic Melanoma. *J Immunother.* 24, 363–373.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Hwu, P., Douglas, J., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Marincola, F.M., Leitman, S.F., Seipp, C.A., et al. (2002). A Phase I Study of Nonmyeloablative Chemotherapy and Adoptive Transfer of Autologous Tumor Antigen-Specific T Lymphocytes in Patients With Metastatic Melanoma. *J Immunother.* 25, 243–251.

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., et al. (2008). Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma : Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *J. Clin. Oncol.* 26, 5233–5239.

Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., Louis, S., Burnet, F.M., and Thomas, L. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.

E

Eggermont, A M M ; Suci, S ; Santinami, M ; Testori, A ; Kruit, W H J ; Marsden, J ; Punt, C J A ; Salès, F ; Gore, M ; Mackie, R ; Kusic, Z ; Dummer, R ; Hauschild, A ; Musat, E ; Spatz, A ; Keilholz, U. (2008). Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma : final results of EORTC 18991 , a randomised phase III trial. *Lancet* 372, 117–126.

Eggermont, A.M.M., Spatz, A., Robert, C., and Cancer, G.R. (2014). Cutaneous melanoma. *Lancet* 6736, 1–12.

Elder, D.E. (2006). Precursors to melanoma and their mimics : nevi of special sites. *Mod. Pathol.* 19, 4–20.

Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, L.J. (2002). Expression and Regulation of the PD-L1 Immunoinhibitory Molecule on Microvascular Endothelial Cells. *Microcirculation* 9, 133–145.

Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, S.C.J. (2013). Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor Infiltrating Immune Cells are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanom. *Cancer Res.* 72, 1070–1080.

Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., et al. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 3, 1–13.

F

Fecher, L.A., Amaravadi, R.K., and Flaherty, K.T. (2008). The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 20, 183–189.

Fife, B.T., Pauken, K.E., Eagar, T.N., Obu, T., Wu, J., Azuma, M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2009). Interactions between programmed death-1 and programmed death ligand-1 promote tolerance by blocking the T cell receptor- induced stop signal. *Nat Immunol.* *10*, 1185–1192.

Fitzpatrick (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* *124*, 869–871.

Flaherty Keith T., Caroline Robert, Peter Hersey, Paul Nathan, Claus Garbe, Mohammed Milhem, Lev V. Demidov, Jessica C. Hassel, Piotr Rutkowski, Peter Mohr, Reinhard D, Mark R. Middleton, Jürgen C. Becker, Michelle Casey, Laurie J. Sherman, R.N., Frank S. Wu, Daniele Ouellet, Anne-Marie Martin, Kiran Patel, Dirk Schadendorf, and the M.S.G. (2012). Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* *367*, 107–114.

Flaherty Keith T. , Igor Puzanov, Kevin B. Kim, Antoni Ribas, Grant A. McArthur, Jeffrey A. Sosman, Peter J. O’Dwyer, Richard J. Lee, Joseph F. Grippo, Keith Nolop, and Paul (2010). Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* *363*, 809–819.

Formenti, S.C., and Demaria, S. (2013). Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy : A Paradigm Shift. *J Natl Cancer Inst.* *105*, 256–265.

Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen – specific CD8 + T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med.* *207*, 2175–2186.

Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Sharpe, A.H. (2009). PD-L1 regulates the development , maintenance , and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* *206*, 3015–3029.

Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R. V, Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity* *16*, 769–777.

Freeman, B.G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* *192*, 1027-34.

G

Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007). Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* *20*, 161–172.

Galon, J., Fox, B.A., Bifulco, C.B., Masucci, G., Rau, T., Botti, G., Marincola, F.M., Ciliberto, G., and Pages, F. (2016). Immunoscore and Immunoprofiling in cancer : an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J. Transl. Med.* *14*, 1–6.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova , P.F. (2014). Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* *232*, 199–209.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Bastholt, L., Grob, J., and Malvehy, J. (2016). Diagnosis and treatment of melanoma . European consensus-based interdisciplinary guideline e Update 2016. *Eur. J. Cancer* *63*, 201–217.

Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, K.J. (2011). Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. *Oncologist* *16*, 5–24.

García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, J.-C.C. (2015). MC1R, the cAMP pathway and the response to solar UV: Extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* *27*, 699–720.

Garcia-diaz, A., Shin, D.S., Moreno, B.H., Saco, J., Escuin-ordinas, H., Rodriguez, G.A., Zaretsky, J.M., Sun, L., Wang, X., Parisi, G., et al. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* *19*, 1189–1201.

Garg, P.K., Nazih, R., Wu, Y., Grinevich, V.P., and Garg, S. (2017). Selective targeting of melanoma using N- (2-diethylaminoethyl) 4-[18F]fluoroethoxy benzamide (4-[18F]FEBZA): a novel PET imaging probe. *EJNMMI Res.* *61*, 1–11.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., et al. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117–122.

Gaustad, J.V., Simonsen, T.G., Andersen, L.M.K., and Rofstad, E.K. (2017). Vascular abnormalities and development of hypoxia in microscopic melanoma xenografts. *J. Transl. Med.* *15*, 1–10.

Gebremeskel, S., and Johnston, B. (2015). Concepts and mechanisms underlying chemotherapy

induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget*. 6, 41600–41619.

Gelderblom, M., Sobey, C.G., Kleinschnitz, C., and Magnus, T. (2015). Danger signals in stroke. *Ageing Res. Rev.* 24, 77–82.

Gershenwald, J.E., Scolyer, R.A., Hess, K.R., Faries, M.B., Kirkwood, J.M., and Mcarthur, G.A. (2017). Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 67, 472–492.

Ghosh P, C.L. (2010). Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol* 4, 1–21.

Godet, Y., Moreau-aubry, A., Guilloux, Y., Vignard, V., Khammari, A., Dreno, B., Jotereau, F., and Labarriere, N. (2008). MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med.* 205, 2673–2682.

Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma : signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14, 1712–1728.

Goff, S.L., Dudley, M.E., Citrin, D.E., Somerville, R.P., Wunderlich, J.R., Danforth, D.N., Zlott, D.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., et al. (2016). Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 34, 2389–2397.

Goldsmith, B.K., Chen, W., Johnson, D.C., and Hendricks, R.L. (1998). Infected Cell Protein (ICP)47 Enhances Herpes Simplex Virus Neurovirulence by Blocking the CD8+ T Cell Response. *J Exp Med.* 187, 341–348.

Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Hayward, N.K., Demenais, F., Timothy, D., Azizi, E., Bergman, W., Bianchi-scarra, G., Bruno, W., et al. (2007). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 44, 99–106.

Gomes, F., Serra-bellver, P., and Lorigan, P. (2018). The role of nivolumab in melanoma. *Futur. Oncol.* 14, 1241–1252.

Gorin, J.-B., Gouard, S., Ménager, J., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Faivre-Chauvet, A., Guilloux, Y., Chérel, M., Davodeau, F., and Gaschet, J. (2015). Alpha Particles Induce Autophagy in Multiple Myeloma Cells. *Front. Med.* 2, 1–11.

Gorin, J.B., Ménager, J., Gouard, S., Maurel, C., Guilloux, Y., Faivre-Chauvet, A., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Chérel, M., Davodeau, F., et al. (2014). Antitumor immunity induced after α irradiation. *Neoplasia (United States)* 16, 319–328.

Gowrishankar, K., Gunatilake, D., Gallagher, S.J., and Tiffen, J. (2015). Inducible but Not Constitutive Expression of PD-L1 in Human Melanoma Cells Is Dependent on Activation of NF- κ B. *PLoS One* 10, 1–19.

Graf F, Fahrer J, Maus S, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Venkatachalam S, Fottner C, Weber MM, Huelsenbeck J, Schreckenberger M, Kaina B, M.M. (2014). DNA Double Strand Breaks as Predictor of Efficacy of the Alpha-Particle Emitter Ac-225 and the Electron Emitter Lu-177 for Somatostatin Receptor Targeted Radiotherapy. *PLoS One*. 9, e88239.

Gray-schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–870.

Gros, A., Robbins, P.F., Yao, X., Li, Y.F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J.R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M.E., et al. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest*. 124, 2246–2259.

Grzywa, T.M., and Paskal, W. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol*. 10, 956–975.

Gupta, N., Devgan, A., Bansal, I., Olsavsky, T.D., Li, S., Abdelbaki, A., and Kumar, Y. (2017). Usefulness of radium-223 in patients with bone metastases. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 30, 424–426.

H

Hagemann, T., Balkwill, F., and Lawrence, T. (2007). Inflammation and Cancer: A Double-Edged Sword Thorsten. *Cancer Cell*. 12, 300–301.

Halaban, R., Zhang, W., Bacchiocchi, A., Cheng, E., Parisi, F., Krauthammer, M., Mccusker, J.P., Kluger, Y., and Sznol, M. (2010). PLX4032, a selective BRAF V600E kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF WT melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 23, 190–200.

Hallqvist, A., Bergmark, K., Bäck, T., Andersson, H., and Dahm-kähler, P. (2019). Intraperitoneal alpha-emitting radio immunotherapy with Astatine-211 in relapsed ovarian cancer; long-term follow-up with individual absorbed dose estimations Andreas. *J Nucl Med*. 60, 1073-1079.

Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Elassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, R.A. (2013). Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med.* 369, 134–144.

Hauschild, A., Grob, J., Demidov, L. V, Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Jr, W.H.M., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF -mutated metastatic melanoma : a multicentre , open-label , phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380, 358–365.

He S., Cheng, J., Sun, L., Wang, Y., Wang, C., Liu, X., Zhang, Z., Zhao, M., Luo, Y., Tian, L., et al. (2018). HMGB1 released by irradiated tumor cells promotes living tumor cell proliferation via paracrine effect. *Cell Death Dis.* 9, 1–13.

Heck, M.M., Retz, M., Alessandria, C.D., Rauscher, I., Scheidhauer, K., Maurer, T., Storz, E., Janssen, F., Wester, H., Gschwend, J.E., et al. (2016). Systemic radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Urol.* 196, 382–391.

Hepel, J.T., and Wazer, D.E. (2012). A comparison of brachytherapy techniques for partial breast irradiation. *Brachytherapy* 11, 163–175.

Herrmann, K., Schottelius, M., Lapa, C., Osl, T., Poschenrieder, A., Heribert, H., Katharina, L., Schreder, M., Bluemel, C., Knott, M., et al. (2016). First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *J Nucl Med.* 57, 248–252.

Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., and Nakamura, M. (2010). Tumor Cell Expression of Programmed Cell Death-1 Ligand 1 Is a Prognostic Factor for Malignant Melanoma. *Cancer.* 116, 1757–1766.

Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1993). Mutations at the Mouse Microphthalmia Locus Are Associated with Defects in a Gene Encoding a Novel Basic-Helix-Loop-Helix-Zipper Protein. *Cell* 74, 395–404.

Hodi, F.S., Day, S.J.O., Mcdermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Ph, D., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 363, 711–723.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky

N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Ch, C.L. (2013). A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150, 251–263.

Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., and Giessen, W.J. Van Der (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med.* 7, 165–172.

Huber, R., Meier, B., Otsuka, A., Fenini, G., Satoh, T., Gehrke, S., Widmer, D., Levesque, M.P., Mangana, J., Kerl, K., et al. (2016). Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-1 and M2-like macrophages. *Sci Rep.* 6, 1–14.

I

Inamdar GS, Madhunapantula SV, R.G. (2010). Targeting the MAPK Pathway in Melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol* 80, 624–637.

Inozume, T., Hanada, K., Wang, Q.J., Ahmadzadeh, M., John, R., Rosenberg, S.A., and Yang, J.C. (2010). Selection of CD8+ PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T-cells. *J Immunother.* 33, 956–964.

Irvine, M., Stewart, A., Pedersen, B., Boyd, S., Kefford, R., and Rizos, H. (2018). Oncogenic PI3K / AKT promotes the step- wise evolution of combination BRAF / MEK inhibitor resistance in melanoma. *Oncogenesis* 7.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1 , a novel member of the immunoglobulin gene superfamily , upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895.

J

Jacques, Y., Mortier, E., Jacques, Y., and Mortier, E. (2016). Le renouveau de l'interleukine 2 : Modèle revisité et nouvelles applications thérapeutiques. *Médecine/Science* 32, 612–618.

Jandl, T., Revskaya, E., Jiang, Z., Harris, M., Dorokhova, O., Tsukrov, D., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2013). Melanoma stem cells in experimental melanoma are killed by radioimmunotherapy. *Nucl. Med. Biol.* 40, 177–181.

Jantzen, H., Spindler, P., and Merrer, J. (2009). Sorafenib-induced multiple eruptive keratoacanthomas. *Ann Dermatol Venereol.* 136, 894–897.

Jilaveanu, L.B., Aziz, S.A., and Kluger, H.M. (2009). Chemotherapy and biologic therapies for

melanoma : do they work ? Clin. Dermatol. 27, 614–625.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Cogdill, P., Barretina, J., Caponigro, G., Hieronymus, H., Ryan, R., Yang, X., et al. (2010). COT/MAP3K8 drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968–972.

Joyal, J.L., Barrett, J.A., Marquis, J.C., Chen, J., Hillier, S.M., Maresca, P., Boyd, M., Gage, K., Nimmagadda, S., Kronauge, J.F., et al. (2010). Preclinical Evaluation of an I-131 Labeled Benzamide for Targeted Radiotherapy of Metastatic Melanoma. *Cancer Res.* 70, 4045–4053.

Jurcic, J.G., Larson, S.M., Sgouros, G., Mcdevitt, M.R., Finn, R.D., Divgi, C.R., Ballangrud, Å.M., Hamacher, K.A., Ma, D., Humm, J.L., et al. (2002). Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 100, 1233–1239.

K

Kalialis, L.V., Drzewiecki, K.T., and Klyver, H. (2009). Spontaneous regression of metastases from melanoma : review of the literature. *Melanoma Res.* 19, 275–282.

Kaminski, M.S., Radford, J.A., Gregory, S.A., Leonard, J.P., Knox, S.J., Kroll, S., and Wahl, R.L. (2005). Re-Treatment With I-131 Tositumomab in Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma Who Had Previously Responded to I-131 Tositumomab. *J Clin Oncol.* 23, 7985–7994.

Kassis, A.I., and Adelstein, S.J. (2005). Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. 46, 4–13.

Kassis AI (2008). Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Semin Nucl Med.* 38, 358–366.

Keilholz, B.U., Conradt, C., Legha, S.S., Khayat, D., Scheibenbogen, C., Thatcher, N., Goey, S.H., Gore, M., Dorval, T., Hancock, B., et al. (1998). Results of Interleukin-2-Based Treatment in Advanced Melanoma: A Case Record-Based Analysis of 631 Patients. *J. Clin. Oncol.* 16, 2921–2929.

Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., and Sharpe, A.H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 203, 883–895.

Khan MK, Khan N, Almasan A, M.R. (2011). Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer , more effective biological agents. *Onco. Targets. Ther.* 4, 137–148.

Kikuchi, M., Clump, D.A., Srivastava, R.M., Sun, L., Zeng, D., and Diaz-perez, J.A. (2017). Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma. *Oncoimmunology* 6, 1–13.

Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., Shea, M.A.O., and Fauci, A.S. (2008). The Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *J Immunol.* 181, 6738–6746.

Klein, M., Lotem, M., Peretz, T., Zwas, S.T., Mizrachi, S., Liberman, Y., Chisin, R., Schachter, J., Ron, I.G., Iosilevsky, G., et al. (2013b). Safety and Efficacy of 188-Rhenium-Labeled Antibody to Melanin in Patients with Metastatic Melanoma. *J. Skin Cancer* 2013, 1–8.

Knowles, S.M., and Wu, A.M. (2012). Advances in immuno-positron emission tomography: Antibodies for molecular imaging in oncology. *J. Clin. Oncol.* 30, 3884–3892.

Kozar, I., Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C., and Kreis, S. (2019). Many ways to resistance : How melanoma cells evade targeted therapies. *BBA - Rev. Cancer* 1871, 313–322.

Kratochwil, C., Bruchertseifer, F., Giesel, F.L., Weis, M., Verburg, F.A., Mottaghy, F., Kopka, K., Apostolidis, C., Haberkorn, U., and Morgenstern, A. (2016). 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted alpha-Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 57, 1941–1944.

Krieg, C., Létourneau, S., Pantaleo, G., and Boyman, O. (2010). Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11906–11911.

Kuehn, H.S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E.K., Julie, E., Avery, D.T., Schickel, J., Tran, D.Q., Stoddard, J., Frucht, D.M., et al. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. [10.1126/Science.1255904](https://doi.org/10.1126/Science.1255904) *Science* 345, 1623–1627.

L

Labarrière N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dréno B, J.F. (2002). Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 51, 532–538.

Langley, S., Ahmed, H.U., Al-qaisieh, B., Bostwick, D., Dickinson, L., Veiga, F.G., Grimm, P., Machtens, S., Guedea, F., and Emberton, M. (2012). Report of a consensus meeting on focal low

dose rate brachytherapy for prostate cancer. *BJU Int.* 109, 7–16.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, W.J. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 373, 23–34.

Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2, 261–268.

Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Sh, G.G. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer genes. *Nature* 499, 214–218.

Lázár-Molnár E, Yan Q, Cao E, Ramagopal U, Nathenson SG, A.S. (2008). Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10483–10488.

Lee, S., Jang, B., Lee, S., Yang, Y., Suh, S., Park, Y., Oh, S., Shin, J., Yao, S., Chen, L., et al. (2006). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-c-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.* 580, 755–762.

Less, J.R., Skalak, T.C., Sevick, E.M., and Jain, R.K. (1991). Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma : Branching Patterns and Vessel Dimensions. *Cancer Res.* 51, 265-73.

Li, D., Li, X., Zhou, W., Huang, Y., Liang, X., Jiang, L., Yang, X., Sun, J., Li, Z., and Han, W. (2019). Genetically engineered T cells for cancer immunotherapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4.

Linette, G.P., Stadtmauer, E.A., Maus, M. V, Rapoport, A.P., Levine, B.L., Emery, L., Litzky, L., Bagg, A., Carreno, B.M., Cimino, P.J., et al. (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122, 863–871.

Liu B.L., Robinson, M., Han, Z., Branston, R.H., English, C., Reay, P., Mcgrath, Y., Thomas, S.K., and Thornton, M. (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic , immune stimulating , and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 10, 292–303.

Liu J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., and Quesnel, B.

(2007). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- gamma and TLR ligands via a MyD88- , TRAF6- , and MEK-dependent pathway. *Blood* 110, 296–304.

Lotem, M., Machlenkin, A., Hamburger, T., Nissan, A., Kadouri, L., Frankenburg, S., Gimmon, Z., Elias, O., David, I. Ben, Kuznetz, A., et al. (2009). Autologous Melanoma Vaccine Induces Antitumor and Self-Reactive Immune Responses That Affect Patient Survival and Depend on MHC Class II Expression on Vaccine Cells. *Clin Cancer Res* 15, 4968–4977.

M

Middleton M.R., J.J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, S. Aamdal, J. Cebon, A. Coates, B. Dreno, M. Henz, D. Schadendorf, A. Kapp, J. Weiss, U. Fraass, P. Statkevich, M. Muller, and N.T. (2000). Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. *J Clin Oncol.* 18, 158–166.

Ma, L., Teruya-feldstein, J., Behrendt, N., Chen, Z., Noda, T., Hino, O., Cordon-cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2005). Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor suppression. *Genes Dev.* 19, 1779–1786.

Mackensen, A., Meidenbauer, N., Vogl, S., Laumer, M., and Berger, J. (2006). Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen- Specific CD8 T Cells for the Treatment of Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 5060–5069.

Marengere, L.E.M., Waterhouse, P., Duncan, G.S., Mittrucker, H., Feng, G., and Mak, P.W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* (80-.). 272, 1170–1173.

Marik, J., and Junutula, J.R. (2011). Emerging Role of ImmunoPET in Receptor Targeted Cancer Therapy. *Curr Drug Deliv.* 8, 70–78.

Marin-acevedo, J.A., Dholaria, B., Soyano, A.E., Knutson, K.L., Chumsri, S., and Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer : new developments and challenges. *J. Hematol. Oncol.* 11, 1–20.

Marzuka-alcalá, A., Gabree, M.J., and Tsao, H. (2014). Melanoma Susceptibility Genes and Risk Assessment. *Methods Mol. Biol.* 1102, 381–393.

Mccabe, K.E., and Wu, A.M. (2010). Positive Progress in ImmunoPET — Not Just a Coincidence. *Cancer Biother Radiopharm* 25, 253–261.

Mcgill, G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H., et al. (2002). Bcl2 Regulation by the Melanocyte Master Regulator Mitf Modulates Lineage Survival and Melanoma Cell Viability. *Cell* 109, 707–718.

Meggyes, M., Miko, E., Szigeti, B., Farkas, N., and Szereday, L. (2019). The importance of the PD-1 / PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth* 19, 1–12.

Ménager, J., Gorin, J.B., Maurel, C., Drujont, L., Gouard, S., Louvet, C., Chérel, M., Faivre-Chauvet, A., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., et al. (2015). Combining α -radioimmunotherapy and adoptive T cell therapy to potentiate tumor destruction. *PLoS One* 10, 1–14.

Meredith, R., Torgue, J., Shen, S., Fisher, D.R., Banaga, E., Morgan, D., Fan, J., and Jr, J.M.S. (2014). Dose Escalation and Dosimetry of First in Human Alpha Radioimmunotherapy with ²¹²Pb-TCMC-trastuzumab. *J Nucl Med.* 55, 1636–1642.

Meredith, R.F., Torgue, J.J., Rozgaja, T.A., Banaga, E.P., Bunch, P.W., Alvarez, R.D., and Lowy, A.M. (2018). Safety and Outcome Measures of First-in-Human Intraperitoneal alpha Radioimmunotherapy With ²¹²Pb-TCMC-Trastuzumab Ruby. *Am J Clin Oncol.* 41, 716–721.

Miao Y & Quinn TP (2008). Peptide-Targeted Radionuclide Therapy for Melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 67, 213–228.

Mier, W., Kratochwil, C., Hassel, J.C., Giesel, F.L., Beijer, B., Babich, J.W., Friebe, M., Eisenhut, M., Enk, A., and Haberkorn, U. (2014). Radiopharmaceutical Therapy of Patients with Metastasized Melanoma with the Melanin-Binding Benzamide ¹³¹I-BA52. *J Nucl Med.* 55, 9–14.

Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355, 51–65.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, and A.G. (2014). PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2, 361–370.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., James, C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, P., et al. (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science (80-)*. 314, 126–129.

Morgan, R.A., Chinnasamy, N., Abate-daga, D.D., Gros, A., Robbins, F., Zheng, Z., Feldman, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Phan, Q., et al. (2013). Cancer regression and neurologic toxicity following anti-MAGE- A3 TCR gene therapy. *J Immunother.* 36, 133–151.

Morgan DA, Ruscetti FW, G.R. (1976). Selective in vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows. *Science* (80-.). *193*, 1007–1008.

Murad Alam, Bs, S.N., Mittal, B.B., Ba, N.A.K., and Yoo, S. (2011). The use of brachytherapy in the treatment of nonmelanoma skin cancer: a review. *J. Am. Dermatology* *65*, 377–388.

N

Nakamura, K., and Okuyama, R. (2016). Immunotherapy for advanced melanoma: Current knowledge and future directions. *J. Dermatol. Sci.* *83*, 87–94.

Natarajan, A., Mayer, A.T., Xu, L., Reeves, R.E., Gano, J., and Gambhir, S.S. (2015). Novel Radiotracer for ImmunoPET Imaging of PD-1 Checkpoint Expression on Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Bioconjug Chem.* *26*, 2062–2069.

Natarajan, A., Mayer, A.T., Reeves, R.E., Nagamine, C.M., Gambhir, S.S., States, U., States, U., States, U., and States, U. (2017). Development of a novel immunoPET tracer to image human PD-1 checkpoint expression on tumor infiltrating lymphocytes in a humanized mouse model. *Mol Imaging Biol.* *19*, 903–914.

Nelson, A.A., and Tsao, H. (2009). Melanoma and genetics. *Clin. Dermatol.* *27*, 46–52.

Nishimura, H., Nose, M., and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* *11*, 141–151.

Nishimura, H., Okazaki, T., and Tanaka, Y. (2001). Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor – Deficient Mice. *Science* (80-.). *291*, 319-323–2.

Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 alpha , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med.* *211*, 781–790.

O

O'Day, S.J.O., Hamid, O., and Urba, W.J. (2007). Targeting Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4). *Cancer* *110*, 2614–2627.

Oestreich, K.J., Yoon, H., Ahmed, R., and Boss, J.M. (2008). NFATc1 Regulates Programmed Death-

1 Expression Upon T Cell Activation. *J Immunol.* *181*, 4832–4839.

Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses : the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Publ. Gr.* *14*, 1212–1218.

Olafsen T, W.A. (2010). Novel Antibody Vectors for Imaging. *Semin Nucl Med.* *40*, 167–181.

Ollila, D.W. (2006). Complete metastasectomy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Lancet Oncol.* *7*, 919–924.

Olsen, C.M., Carroll, H.J., and Whiteman, D.C. (2010). Meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int. J. Cancer* *127*, 2430–2445.

Omholt, Katarina, Ringborg, U., Hansson, J., and Krockel, D. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* *16*, 197–200.

Orazio, J.D., Jarrett, S., Amaro-ortiz, A., and Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* *2013*, *14*, 12222–12248.

P

Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, J.R. (2004). Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* *427*, 695.

Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M.L., Gentilcore, G., Stroncek, D.F., Casula, M., Sini, M.C., Palla, M., Mozzillo, N., and Ascierto, P.A. (2009). Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* *17*, 1–17.

Palucka K, B.J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* *12*, 265–277.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.

Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L.N., Karoly, E.D., Freeman, G.J., Petkova, V., Seth, P., et al. (2015). PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* *6*, 1–13.

Pawelczyk, K., Piotrowska, A., Ciesielska, U., Jablonska, K., Glatzel-plucinska, N., and Grzegorzolka, J. (2019). Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *Int J Mol Sci.* *20*, 1–15.

Peled, A., and Tavor, S. (2013). Role of CXCR4 in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia. *Theranostics*. 3, 34–39.

Platanias, L.C., and Lurie, R.H. (2005). Mechanisms of type-i- and type-ii-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 5, 375–386.

Pol, J., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Paris, C. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, e1115641.

Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Badger CC, Nelp WB, Glenn S, Butchko G, Fisher D, P.B. (1993). Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med*. 329, 1219–1224.

Punt, C.J.A., and Eggermont, A.M.M. (2001). Adjuvant interferon-alpha for melanoma revisited : News from old and new studies. *Ann Oncol* 12, 1663–1666.

Punternvoll, H.E., Yang, X.R., Vetti, H.H., Bachmann, I.M., Avril, M.F., Benfodda, M., Catricalà, C., Dalle, S., Duval-modeste, A.B., Ghiorzo, P., et al. (2013). Melanoma prone families with CDK4 germline mutation : phenotypic profile and associations with MC1R variants. *Cancer Genet*. 50, 264–270.

Q

Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., Russell, K., et al. (2012). Integrative genomic analysis of HIV-specific CD8+ T cells reveals that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med*. 16, 1147–1151.

R

Raedler, B.L.A., and Writer, M. (2015). Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Heal. Drug Benefits*. 8, 180–183.

Rafique I, Kirkwood JM, T.A. (2015). Immune Checkpoint Blockade and Interferon- α in Melanoma. *Semin Oncol*. 42, 436–447.

Raja, C., Graham, P., Abbas Rizvi, S.M., Song, E., Goldsmith, H., Thompson, J., Bosserhoff, A., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Kearsley, J., et al. (2007). Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther*. 6, 846–852.

Rashidian, M., Ingram, J.R., Dougan, M., Dongre, A., Whang, K.A., Legall, C., Cragolini, J.J., Bierie, B., Gostissa, M., Gorman, J., et al. (2017). Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *J Exp Med.* *214*, 2243–2255.

Rbah-vidal, L., and Vidal, A. (2017). Theranostic Approach for Metastatic Pigmented Melanoma Using ICF15002 , a Multimodal Radiotracer for Both PET Imaging and Targeted Radionuclide Therapy. *Neoplasia* *19*, 17–27.

Revskeya, E., Jongco, A.M., Sellers, R.S., Howell, R.C., Koba, W., Guimaraes, A.J., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2009). Radioimmunotherapy of Experimental Human Metastatic Melanoma with Melanin-Binding Antibodies and in Combination with Dacarbazine. *Clin Cancer Res.* *15*, 2373–2380.

Ribas, A., Kefford, R., Marshall, M.A., Punt, C.J.A., Haanen, J.B., Marmol, M., Garbe, C., Gogas, H., Schachter, J., Linette, G., et al. (2013). Phase III Randomized Clinical Trial Comparing Tremelimumab With Standard-of-Care Chemotherapy in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* *31*, 616–622.

Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., Gansert, J., Hodi, F.S., Long, G. V, Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., Vanderwalde, A., et al. (2017). Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* *170*, 1109-1113.e10.

Robbins, R.J., and Schlumberger, M.J. (2005). The Evolving Role of ¹³¹I for the Treatment of Differentiated Thyroid Carcinoma. *J Nucl Med.* *46*, 28–38.

Robert, C., Schachter, J., Long, G. V, Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2521–2532.

Robert, C., Ribas, A., Schachter, J., Arance, A., Grob, J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C.M., Lotem, M., et al. (2019). Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* *20*, 1239–1251.

Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocho E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalcioiu C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, A.P. (2015). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* *372*, 320–330.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH Jr, Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, W.J. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 364, 2517–2526.

Rofstad, E.K., and Brustad, T. (1985). Tumour growth delay following single dose irradiation of human melanoma xenografts . Correlations with tumour growth parameters , vascular structure and cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 51, 201–210.

Rohaan, M.W., Wilgenhof, S., and Haanen, J.B.A.G. (2019). Adoptive cellular therapies : the current landscape. *Virchows Arch.* 474, 449–461.

Rooseboom, M., Commandeur, J.A.N.N.M., and Vermeulen, N.P.E. (2004). Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs. *Pharmacol Rev* 56, 53–102.

Rose, D.M., Grabovsky, V., Alon, R., and Ginsberg, H. (2001). The affinity of integrin alpha(4)beta(1) governs lymphocyte migration. *J Immunol.* 167, 2824–2830.

Russo, I., Zorzetto, L., Sileni, V.C., and Alaibac, M. (2018). Cutaneous Side Effects of Targeted Therapy and Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Sci.* 2018.

S

Salmon, H., and Donnadieu, E. (2012). La matrice extracellulaire Un obstacle au contact entre lymphocytes T et cellules tumorales. *Médecine/Science* 28, 824–826.

Sato, H., Niimi, A., Yasuhara, T., Bunga, T., Permata, M., Hagiwara, Y., Isono, M., Nuryadi, E., Sekine, R., Oike, T., et al. (2017). DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nat. Commun.* 8, 1751.

Saunders, P.A., Hendrycks, V.R., Lidinsky, W.A., and Woods, M.L. (2005). PD-L2 : PD-1 involvement in T cell proliferation , cytokine production , and integrin-mediated adhesion. *Eur J Immunol.* 35, 3561–3569.

Sauter, E.R., Yeo, U., Stemm, A. Von, Zhu, W., Litwin, S., Tichansky, D.S., Pistritto, G., Nesbit, M., Pinkel, D., Herlyn, M., et al. (2002). Cyclin D1 Is a Candidate Oncogene in Cutaneous Melanoma. *Cancer Res.* 62, 3200–3206.

Schachter, J., Ribas, A., Long, G. V, Arance, A., Grob, J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., Mcneil, C., Lotem, M., et al. (2017). Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma : final

overall survival results of a multicentre , randomised , open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet* 390, 1853–1862.

Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R.G., Rosser, E.C., Kulbe, H., and Nedospasov, S. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 10662–10667.

Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B.H., Rush, C., Brewer, J.M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., and Rudd, C.E. (2006). Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science* (80-.). 313, 1972–1975.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion. *Science* (80-.). 331, 1565–1570.

Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B.C., Chen, L., Hartung, H., Weller, M., and Wiendl, H. (2004). Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 155, 172–182.

Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, H.P. (2011). gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 364, 2119–2127.

Scolyer, R.A., Long, G. V, and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol. Oncol.* 5, 124–136.

Seetharamu N, Ott PA, P.A. (2009). Novel therapeutics for melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 839–849.

Serrone, L., Zeuli, M., Sega, F., and Cognetti, F. (2000). Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: Thirty-year experience overview. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 19, 21–34.

Sgouros, G., Roeske, J.C., Mcdevitt, M.R., Palm, S., Allen, B.J., Fisher, D.R., Brill, A.B., Song, H., Howell, R.W., and Akabani, G. (2010). MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of α -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *J Nucl Med.* 51, 311–328.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat. Publ. Gr.* 16, 345–358.

Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat*

Rev Immunol. 18, 153–167.

Sheppard, K., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., et al. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 574, 37–41.

Shortman, K., and Liu, Y. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2, 151–161.

Simon, Sylvain, Labarrière N (2018). PD-1 expression on tumor-specific T cells : Friend or foe for immunotherapy ? *Oncoimmunology* 7, e1364828.

Simon, B., and Uslu, U. (2018). CAR-T cell therapy in melanoma : A future success story ? *Exp. Dermatol.* 27, 1315–1321.

Simonsen, T.G., Gaustad, J., Leinaas, M.N., and Rofstad, E.K. (2012). Vascular abnormalities associated with acute hypoxia in human melanoma xenografts. *Radiother. Oncol.* 105, 72–78.

Singh, M., Lin, J., Hocker, T.L., and Tsao, H. (2008). Genetics of melanoma tumorigenesis. *Br J Dermatol.* 158, 15–21.

Slominski, A., Carlson, A., Wortsman, J., and Mihm, M.C. (2001). Role of Molecular Biology in Diagnostic Pathology of Melanoma. *Methods Mol. Med.* 61, 123–163.

Song, M., Chen, D., Lu, B., Wang, C., Zhang, J., Huang, L., Wang, X., Timmons, C.L., Hu, J., Liu, B., et al. (2013). PTEN Loss Increases PD-L1 Protein Expression and Affects the Correlation between PD-L1 Expression and Clinical Parameters in Colorectal Cancer. *PLoS One* 8, e65821.

Speer, T.W. (2010). Targeted Radionuclide Therapy (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).

Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, and G.T. (2014). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8 $^{+}$ T Cells. *Sci Transl Med.* 5, 1–21.

Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., and Robertson, G.P. (2003). Loss of PTEN Promotes Tumor Development in Malignant Melanoma 1. *Cancer Res.* 63, 2881–2890.

Stettler A, Fumeaux C, Kamel EM, P.P. (2012). Utilité du 18 F-FDG-PET / CT dans le diagnostic des vasculites des grands vaisseaux. *Rev Med Suisse* 8, 786–790.

Stewart, Alexandra J, V. (2006). Current Controversies in High-Dose-Rate versus Low-Dose-Rate Brachytherapy for Cervical Cancer. *Cancer* 107, 908–915.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-rokni, M., Rong, Z., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Dennie, T., et al. (2012). Tumor microenvironment induces innate RAF-inhibitor resistance through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504.

Strojan, P. (2010). Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiol Oncol.* 44, 1–12.

Strosberg, J., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., Mittra, E., Kunz, P.L., Kulke, M.H., Jacene, H., Bushnell, D., et al. (2017). Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med.* 376, 125–135.

Sun, C., Mezzadra, R., and Schumacher, T.N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 48, 434–452.

Sunshine, J.C., Nguyen, P.L., Kaunitz, G.J., Cottrell, T.R., Berry, S., Esandrio, J., Xu, H., Ogurtsova, A., Bleich, K.B., Cornish, T.C., et al. (2017). PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison. *Clin Cancer Res.* 23, 4938–4944.

T

Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., Mcmiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., and Suzanne, L. (2012). Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med.* 4, 1–22.

Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T., and Alerts, E. (2011). IFN- α Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *J Immunol.* 186, 2772–2779.

Thompson, S., Ballard, B., Jiang, Z., Revskaya, E., Sisay, N., Miller, W.H., Cutler, C.S., Dadachova, E., and Francesconi, L.C. (2014). 166Ho and 90Y labeled 6D2 monoclonal antibody for targeted radiotherapy of melanoma: comparison with 188Re radiolabel. *Nucl Med Biol* 41, 276–281.

Tkachev, V., Goodell, S., Pipari, A.W., Hao, L., Franchi, L., Glick, G.D., Ferrara, J.L.M., Byersdorfer, C.A., Arbor, A., Arbor, A., et al. (2015). Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative metabolism. *J Immunol.* 194, 5789–5800.

Tomblyn, M. (2012). Radioimmunotherapy for B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer Control*. 19, 196–203.

Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., et al. (2014). Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J. Clin. Oncol.* 32, 1020–1030.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, S.M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med.* 366, 2443–2454.

Truillet C, Oh HLJ, Yeo SP, Lee CY, Huynh LT, Wei J, Parker MFL, Blakely C, Sevillano N, Wang YH, Shen YS, Olivas V, Jami KM, Moroz A, Jegu B, Jaumain E, Fong L, Craik CS, Chang AJ, Bivona TG, Wang CI, Evans MJ.(2018). Imaging PD-L1 Expression with ImmunoPET. *Bioconjug Chem.* 29, 96-103

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Emma, J., Taylor, M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568–571.

V

Vanpouille-box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2017). DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* 8, 1–15.

Ven, R. Van De, Lindenberg, J.J., Oosterhoff, D., and Gruijl, T.D. De (2013). Dendritic cell plasticity in tumor-conditioned skin : CD14 + cells at the cross-roads of immune activation and suppression. *Front Immunol.* 4, 1–7.

Vergilis, I.J., Szarek, Ā.M., Ferrone, S., and Ā, S.R.R. (2005). Presence and Prognostic Significance of Melanoma-Associated Antigens CYT-MAA and HMW-MAA in Serum of Patients with Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 125, 526–531.

Vignard, V., Lemerrier, B., Lim, A., Pandolfino, M., Guilloux, Y., Rabu, C., Echasserieau, K., Gougeon, M., Dreno, B., Labbarriere, N., et al. (2005). Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol.* 175, 4797–4805.

Viray H, Bradley WR, Schalper KA, Rimm DL, R.B. (2014). Marginal and joint distributions of S100, HMB45 and Melan-A across a large series of cutaneous melanomas. *Arch Pathol Lab Med* 137, 1063–1073.

W

Walunas, B.T.L., Christina, Y.B., and Bluestone, J.A. (1996). CTLA-4 Ligation Blocks CD28-dependent T Cell Activation. *J Exp Med.* 183, 2541–2550.

Wang, Q., Lin, W., Tang, X., Li, S., Guo, L., and Lin, Y. (2017). The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Int J Mol Sci.* 18, 2540.

Weide, B., Kurt, T., Annette, E., Leiter, U., Meier, F., Bauer, J., Schmidt, D., Radny, P., Pföhler, C., and Garbe, C. (2011). Survival after intratumoral interleukin-2 treatment of 72 melanoma patients and response upon the W rst chemotherapy during follow-up. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60, 487–493.

Wellbrock, C., and Hurlstone, A. (2010). BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem. Pharmacol.* 80, 561–567.

Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., and Brummelkamp, T. (2008). Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF. *PLoS One* 3, e2734.

Wheatley, K., Ives, N., Hancock, B., Gore, M., Eggermont, A., and Suci, S. (2003). Does adjuvant interferon- a for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev.* 29, 241–252.

Wick, M.R. (2016). Cutaneous melanoma : A current overview. *Semin Diagn Pathol* 33, 225–241.

Willmann, J.K., Bruggen, N. Van, and Dinkelborg, L.M. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 7, 591–607.

Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., Ribas, A., et al. (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505–509.

Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (1995). Ras-effector interactions , the problem of specificity. *FEBS Lett.* 369, 52–56.

Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Wagstaff J, Schadendorf D, Ferrucci PF, Smylie M, Dummer R, Hill A, Hogg D, Haanen J, Carlino MS, Bechter O, Maio M, Marquez-Rodas I, Guidoboni M, McArthur G, Lebbé C, Asci, L.J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 377, 1345–1356.

Wolowiec, D., and Ffrench, M. (1996). Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Médecine/Science* 12, 165–173.

Wong, A.N.M., Mcarthur, G.A., Hofman, M.S., and Hicks, R.J. (2017). The Advantages and Challenges of Using FDG PET / CT for Response Assessment in Melanoma in the Era of Targeted Agents and Immunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 44, 67–77.

Wu, Y., Chen, W., Xu, Z.P., and Gu, W. (2019). PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy — Blockade , Knockdown , or Inhibition. *Front Immunol.* 10, 1–15.

Y

Youngblood, B., Oestreich, K.J., Ha, S., Duraiswamy, J., Akondy, R.S., West, E.E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J.W., Riley, L., et al. (2011). Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8+ T cells. *Immunity* 35, 400–412.

Z

Zechmann, C.M., Afshar-orumieh, A., Armor, T., Stubbs, J.B., Mier, W., Hadaschik, B., Joyal, J., Kopka, K., and Debus, J. (2014). Radiation dosimetry and first therapy results with a 124 I / 131 I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 41, 1280–1292.

Zeissig, S., Petersen, B., Tomczak, M., Melum, E., Dougan, S.K., Laerdahl, J.K., Forster, M., Schreiber, S., Weir, D., Leichtner, A.M., et al. (2015). Early-onset Crohn’s disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4. *Gut.* 64, 1889–1897.

Zhang, C., Zhang, Z., Lin, K., Pan, J., Dude, I., Hundal-jabal, N., Colpo, N., and Bénard, F. (2017). Preclinical Melanoma Imaging with 68 Ga-Labeled α -Melanocyte-Stimulating Hormone Derivatives Using PET. *Theranostics* 7, 805–813.

Zhao, S., Kuge, Y., Tsukamoto, E., Mochizuki, T., Kato, T., and Hikosaka, K. (2001). Effects of insulin and glucose loading on FDG uptake in experimental malignant tumours and inflammatory lesions. *Eur J Nucl Med.* 28, 730–735.

Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., et al. (2012). TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest.* 122, 4094–4104.

Zimmer, L., Hillen, U., Livingstone, E., Lacouture, M.E., Busam, K., Carvajal, R.D., Egberts, F., Hauschild, A., Kashani-sabet, M., Goldinger, S.M., et al. (2012). Atypical Melanocytic Proliferations and New Primary Melanomas in Patients With Advanced Melanoma Undergoing Selective BRAF Inhibition. *J. Clin. Oncol.* 30, 2375–2383.

Titre : Radiothérapie interne vectorisée alpha anti-PD-L1 dans le traitement du mélanome.

Mots clés : Radiothérapie interne vectorisée, particules alpha, mélanome, PD-L1, bismuth-213

Résumé : Le mélanome est au premier rang dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Récemment les inhibiteurs de checkpoint immunitaires, en particulier les anticorps anti-PD-1, ont permis d'améliorer la survie de certains patients. Cependant, une fraction significative est réfractaire à ces immunothérapies, ce qui justifie le développement de nouvelles approches thérapeutiques. La radiothérapie interne vectorisée (RIV) utilise des vecteurs radiomarqués, dont des anticorps monoclonaux (AcM) qui ciblent des Ag exprimés par les cellules cancéreuses. La RIV permet de délivrer *in situ* des rayonnements ionisants pour éradiquer les cellules tumorales avec une toxicité limitée sur les tissus sains environnants. Nous avons développé une approche de RIV utilisant un AcM anti-PD-L1 humain couplé à un émetteur de particules α , le bismuth-213, afin d'étudier dans un modèle préclinique de xéno greffe de

mélanome humain, les effets thérapeutiques de la RIV- α . Nous avons ainsi démontré que le traitement avec l'AcM anti-PD-L1 radiomarqué induisait un retard important de la croissance tumorale, associé une augmentation de la survie sans toxicité majeure, chez des souris immunodéficientes greffées avec une lignée de mélanome exprimant PD-L1. Cette étude préclinique souligne la faisabilité et le potentiel thérapeutique de la RIV- α dans le traitement des tumeurs solides tel que le mélanome. Sur la base de ces résultats et afin de potentialiser les effets anti-tumoraux, l'association de la RIV- α avec une immunothérapie basée sur le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques modifiés a été initiée. En parallèle, l'AcM anti-PD-L1 a aussi été utilisé pour développer une d'imagerie phénotypique basée sur la tomographie à émission de positrons (Immuno-TEP) afin d'analyser l'efficacité du traitement *in vivo* en fonction de l'expression de PD-L1 sur la tumeur.

Title : Anti-PD-L1 targeted alpha therapy in melanoma treatment

Keywords : Targeted Alpha Therapy, melanoma, PD-L1, bismuth-213

Abstract : Melanoma is at the forefront of the development of innovative therapies. Recently the immune checkpoint inhibitors, in particular anti-PD-1 antibodies, have greatly improved patient survival. However, a significant fraction fails to respond to these therapies which justifies the development of new therapeutic strategies. Targeted radiotherapy (TRT) uses radiolabeled vectors such as antibodies (mAb) which target Ag expressed by the cancer cells. TRT delivers ionizing radiation *in situ* to eradicate the tumor with limited toxicity to the surrounding healthy tissues. We developed a RIV approach using a human anti-PD-L1 mAb radiolabeled with bismuth-213, an α particle emitter, to investigate in a preclinical xenograft model of human melanoma, the therapeutic effects of targeted alpha radiotherapy (TAT).

We demonstrated that treatment with the radiolabeled anti-PD-L1 mAb induced a significant delay in tumor growth leading to improved survival without major toxicity, in immunodeficient mice grafted with a human melanoma cell line expressing PD-L1. This preclinical study highlights the feasibility and therapeutic potency of TAT in the treatment of solid tumors such as melanoma. Based on these results and to improve anti-tumor efficacy, combination of TAT with an immunotherapy based on adoptive transfer of tumor specific modified T-cells has been initiated. In parallel, the anti-PD-L1 mAb has been also used to develop a phenotypic imaging modality using positron emission tomography (Immuno-PET) to analyze *in vivo* treatment efficacy according to PD-L1 expression on the tumor.