N° d'ordre Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ECOLE DOCTORALE BMIC
DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Claude Bernard
(Arrêté ministériel du 5 Juillet 1984 et du 30 Mars 1992)
Spécialité **Biologie**

Soutenue publiquement le 05 mars 2012
Par

Manuarii MANUEL

Etude des distorsions du répertoire immunitaire en tant que facteur pronostique de risque chez les patientes souffrant d'un cancer du sein métastatique en 1ère rechute. Etude de la valeur pronostique de la lymphopénie et de la divpénie.

Devant le jury suivant

Président du jury : Pr. Sylvie NEGRIER
Examinateur : Dr. Sylvia COHEN-KAMINSKI
Rapporteur : Dr. Eric TARTOUR
Rapporteur : Dr. Pedro ROMERO
Directrice de thèse : Dr Christine MENETRIER-CAUX
Co-directeur de thèse : Dr Nicolas PASQUAL

Thèse préparée au sein des structures Société ImmunID Technologies, Grenoble
Equipe 11 "Ciblage thérapeutique de la cellule tumorale et de son environnement immunitaire" (C. Caux/JY Blay), CRCL Inserm U-1052, Centre Léon Bérard, Lyon

Remerciements

Cette thèse fut pour moi une expérience unique à l'interface avec un nombre impressionnant de secteurs d'activité, de personnes et de personnalités. Pendant 4 ans, j'ai eu la chance de côtoyer les domaines cliniques et scientifiques toujours en étroite relation avec les statistiques.

Je ne sais par qui commencer. Tellement de personnes ont pris part à la réalisation de ce projet qu'il est difficile de faire un choix.

Je commencerais par mes directeurs de thèse Christine et Nicolas. Nicolas tout d'abord qui m'a accueilli pour mon stage de master 2 avant de me proposer de me lancer dans la grande aventure qu'est une thèse. Je le remercie doublement pour avoir choisi avec soin mon laboratoire d'accueil et par la même occasion ma directrice de thèse, Christine qui n'a jamais ménagé ses efforts pour que ce projet avance. J'ai toujours trouvé une oreille attentive auprès de chacun d'eux malgré leur emploi du temps de ministre. Et chacun à leur façon à su me conseiller lors des moments de doute. Un grand merci à Christophe qui n'était jamais loin lorsqu'une décision s'imposait et dont les conseils avisés ont dénoué bien des situations.

Qu'aurais-je fait sans le soutien de toute l'équipe d'ImmunID. Tout d'abord, merci à Solène ma comparse, ma complice de toujours et Audrey qui ont dû supporter le thèsard dans leurs pattes, lui rappeler ou était rangé la PK, ou encore par quel bout tenir une pipette ! Anne pour sa mémoire administrative impressionnante (ce qui, me direz-vous, est étrange étant donné sa nature capillaire…) et son oreille attentive ! Merci à Lucie, Orchidée et Audrey n°2 qui n'ont jamais été les dernières pour prendre part à la joyeuse ambiance qui a toujours régné dans l'équipe. Voilà pour la partie féminine de l'équipe qui a longtemps constitué l'écrasante majorité du laboratoire !

Puis sont arrivés les hommes, quelques-uns du moins… Jean-François qui a toujours été un excellent interlocuteur « technologique » et qui m'a beaucoup aidé dans ce domaine. Et puis Gilles, « l'informaticien »… Je ne sais toujours pas ce qu'il fait dans la société, à part prendre sa pause-café à côté de mon bureau… Il a malgré tout toujours été d'un grand soutien et de très bon conseil que ce soit au travail ou en dehors !

Je n'oublie pas l'équipe marketing, Nadia, Delphine et notre petite Bretonne Isabelle.

Merci à Sébastien et Marina qui doivent avoir de nouveaux cheveux blancs depuis la création de mes contrats de travail…

Les petits derniers mais pas pour autant les moins important, Anaïs, Marlène et Bertrand qui ont su s'intégrer dans une équipe avec beaucoup d'aisance. Un grand merci à Anaïs qui, à peine arrivée, a dû faire face aux milliers d'analyses statistiques que je lui demandais pour boucler mes études et qui l'a toujours fait avec le sourire !

Je voudrais également remercier ceux qui ont été de passage chez nous et qui ont apporté leur pierre à l'édifice, merci à Julie, Patrick, Benjamin et Tioka.

Merci à toute l'équipe du CLB dans le désordre : Nadège, Mickael, Vanja, Isabelle, Estelle, Isabelle, Flo, Marine, Kathy, Zaza, Dom et tant d'autres !… Qui m'ont toujours accueilli à bras ouvert malgré mes origines tahitiano-grenobloise. Merci à Juju, maitre incontesté du cytomètre pour tout le temps que tu as pu me consacrer et à Nathalie que j'avais au téléphone presqu'aussi souvent que ma directrice de thèse et qui me donnait des nouvelles du labo en ces occasions !

Merci aux cliniciens, Jean-Yves, Thomas et Isabelle pour leur disponibilité et leur investissement dans un projet auquel, je pense, ils croient de tout cœur. Un merci tout particulier à Olivier qui a toujours su trouver un moment pour nous éclairer dans notre quête de compréhension du monde clinique.

Je voulais remercier les membres de mon jury d'avoir consacré une partie de leur temps précieux à juger de la qualité de mon travail de thèse.

Je souhaite remercier ma famille qui a toujours été présente malgré les 18 000 km qui nous sépare même si je soupçonne ces 18 000 km d'être à l'origine de leur enthousiasme. Merci à mes parents (qui selon les dires de certains auraient eu l'idée saugrenue de me donner naissance) et mon grand-père qui ont su m'encourager, me réconforter, me conseiller.

Loin de chez moi et de ma famille, j'ai trouvé dans les équipes du CLB et d'ImmunID des personnes avec qui j'ai pris du plaisir à travailler, partager, discuter, et rire.

Je dois beaucoup à la personne sans qui tout cela n'aurait jamais été possible, sans qui ces quelques années n'auraient pas eu la même saveur, la personne qui a toujours été là pour m'épauler lors des moments difficiles, mon équilibre, merci à ma moitié, Kim-Lee.

Pour finir je souhaiterai dédier ce travail à ma grand-mère qui nous a quittée peu de temps avant le début de cette aventure, pour tout ce qu'elle représentait pour moi.

Préambule

Ma thèse présente la particularité d'avoir été à l'interface de nombreux secteurs d'activité. J'ai beaucoup appris, depuis la biologie cellulaire jusqu'à la gestion de projet en passant par la mise en place d'études cliniques qui, et je l'ai appris à mes dépends, ne se mettent pas en place en 1 mois !

Dans le domaine de la cancérologie, l'immunologie est toujours considérée comme une science complexe "réservée à une élite". Ce sentiment est souvent lié à une information insuffisante des praticiens de "terrain" bien que mon environnement immédiat ait été particulièrement instruit sur la question.

Mon travail de thèse est un travail translationnel qui tente de réconcilier pratiques cliniques de routine et innovation technologique en immunologie avec pour objectif d'apporter aux cliniciens un outil simple d'application qui puisse leur apporter des solutions concrètes pour une meilleure prise en charge des patientes.

Liste des abréviations

A

AcM : Anticorps monoclonal
ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
Ag : Antigène
AICD : Activation Induced Cell death
ALD : Affection de longue dure

B

BCR : B cell receptor
BRCA : BReast CAncer

C

CDR1, 2, 3 : complementarity determining regions 1, 2, 3
CEA Carcinoma Embryonic Ag
CEC Cellules endothéliales circulantes
CK : Cytokératine
CMHI: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I
CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CPAg : Cellule Présentatrice d'Antigène
CTC : cellules tumorales circulantes
CTC classification : Common Toxicity Criteria
CTL : Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

D

DC : cellules dendritiques
Divpénie : La divpénie est caractérisée par une faible diversité immunitaire des cellules lymphocytaires dans un échantillon sanguin indépendamment de la numération lymphocytaire.
DN : double négatif
DP : double positif

F

FISH : Fluorescent In Situ Hybridation

G

G-CSF : Growth Colony Stimulating Factors

H

HBV : hepatitis B virus
HCV : hepatitis C virus
HGF : facteur de croissance hépatique
HIV : Human immunodeficiency virus
HMG : High mobility group
HMS : Hypermutation somatique

I

IFN : interféron
Ig : Immunoglobuline
IHC : Immuno histochimie
IL-7 : Interleukin 7

L

LB: Lymphocyte B
LIP : Lymphopenia induced proliferation
LT: Lymphocyte T
Lympho-Divpénie: la lympho-divpénie est caractérisée par un faible taux de lymphocytes (lymphopénie) et une faible diversité des lymphocytes (divpénie).

M

MCA : méthylcholanthrène
mDC : DC myéloides

N

NCCN : National Comprehensive Cancer Network
NDL : Numération et Diversité Lymphocytaire

NFS: Numération Formulation Sanguine
NK : cellules Natural killer
NKT : cellules T Natural killer

P

PCR : Polymerase Chain Reaction
pDC : DC plasmacytoides
PD-1 : Programmed Death 1
PDL-1 : Programmed Death 1 ligand 1
PgR : Récepteur à la Progestérone
PNN : polynucléaires neutrophiles

R

RAG : Recombination activating gene
RE : Récepteur EstrogènesRH : recepteurs hormonaux
RH: Récepteurs Hormonaux
RSS : séquence signal de recombinaison
RTE : Recent Thymic Emigrant
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction

S

SG : Survie globale
SI : Système Immunitaire
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
SSP : Survie sans progression

T

TAA : Tumor Associated Ag
TAM : macrophages infiltrant les tumeurs
TCR : T Cell Receptor
TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase
TEC : cellules épithéliales Thymiques
TEP-scan ou PET SCAN : tomographie par émission de positrons
TIL : tumor infiltrating lymphocytes
TIM-3 : Ig mucin 3 des cellules T
TLR : Toll like receptor
TN : triple negatives
Treg : Lymhocytes T régulateurs

SOMMAIRE

Remerciements 2
Préambule 4
Liste des abréviations 5
SOMMAIRE 7
INTRODUCTION 9
1. Partie I : la diversité du répertoire immunitaire 14
1.1. La diversité des TCR 14
1.2. Développement et sélection des LT 19
1.3. La diversité : un atout dans la lutte contre les infections et le cancer 22
2. Partie II : le cancer du sein, clinique et biologie 24
2.1. Le cancer du sein 24
2.1.1. Epidémiologie 24
2.1.2. Les types de cancer du sein 26
2.1.3. Les différents stades de cancer du sein 27
2.1.4. Les facteurs de risque 29
2.2. Le diagnostic 29
2.2.1. Dépistage 29
2.2.2. Diagnostic 29
2.2.3. Suivi des patientes 30
2.3. Prise en charge thérapeutique 31
2.3.1. Les traitements du cancer du sein primaire 31
2.3.2. Prise en charge des patientes métastatiques 32
2.4. Diagnostics moléculaires émergeants et théranostic 33
2.4.1. Marqueurs spécifiques permettant le ciblage thérapeutique 34
2.4.2. Bio-marqueurs d'agressivité 34
2.4.3. Bio-marqueurs associés à l'Hôte 36
2.4.4. Les bio-marqueurs permettent-ils de faire des économies de coût de santé ? 36
3. Partie III : Immunité et cancer 37
3.1. Le concept d'Imuno-editing tumoral 37
3.1.1. Evidence de l'immuno-surveillance 37
3.1.2. Evidence de l'échappement à l'immuno-surveillance 40
3.2. Lymphopénies et immuno-reconstitution 42
3.2.1. Les populations lymphocytaires circulantes 42
3.2.2. Lymphopénies 43
3.2.3. La reconstitution du système immunitaire 43
3.2.4. Immunothérapies 44
Objectif des travaux de thèse 49
RESULTATS 50
4. La technologie d'étude du répertoire immunitaire et de dépistage de la Divpénie. 50
4.1. La technologie d'étude du répertoire développée par ImmunID 50
4.2. Contrôles qualité 52
4.3. Reproductibilité 54
4.4. Le score NDL 55
4.5. Les biais de diversité associés à la pathologie et représentation NDL 56
5. Développement d'une approche de séquençage à haut débit pour la caractérisation du répertoire immunitaire. 58
5.1. Introduction 58
5.2. Création d'une banque d'ADN 58

5.3. Discussion 61
6. Article n°1 63
7. Article n°2 65
8. Article n°3 67
Discussion et perspectives 69
9. Impact pronostic des différents paramètres immunitaires 69
9.1. Impact de la lymphopénie dans la survie des patientes en situation métastatique 69
9.2. La Diversité : un nouveau niveau d'analyse dans le cancer du sein 69
9.3. Une lymphopénie de la sous population CD4+ a un impact délétère très important quel que soit le stade d'évolution métastatique 72
9.4. Le NDL un nouveau paramètre composite permettant d'appréhender de façon plus large les perturbations du SI en périphérie 72
9.5. Importance de la combinaison des extrêmes pour mieux sélectionner les patientes à risque et Importance de la notion de forte diversité comparable aux donneurs sains 75
10. Validation de nouvelles stratégies thérapeutiques : Exemple d'importance de diversité <33% dans la mise en évidence de patientes qui ne bénéficient pas du traitement avec un inhibiteur de l'angiogénèse (Avastin) 77
11. Origine des déficiences en lymphocytes ou en diversité 78
12. Comment prendre en compte le score NDL pour adapter le traitement de cette population à risque ? 81
12.1. L'adaptation thérapeutique 81
12.2. L'immuno-reconstitution 82
12.3. Les thérapies ciblant les molécules immunosuppressives/ modulatrices 83
13. Utilisation des paramètres immunitaires dans les pratiques cliniques 85
13.1. Eléments immunitaires analysés en clinique : absence de corrélation entre taux de PNN et taux de lymphocytes 85
13.2. Etude médico économique 86
14. Conclusion générale 88
BIBLIOGRAPHIE 89

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système immunitaire

La fonction première du système immunitaire (SI) est d'assurer l'intégrité du SOI et sa mise en jeu vise à éliminer ou neutraliser tout élément reconnu comme potentiellement pathogène. Il est probable que le développement du SI des vertébrés supérieurs ait évolué à la fois dans un but de défense contre les micro-organismes de leur environnement et de maintenance de l'intégrité de leurs tissus, c'est-à-dire la surveillance à l'égard de cellules anormales, sénescentes, endommagées ou tumorales.

Le SI est composé d'une première ligne de défense appelée immunité innée dont la fonction première est l'élimination des éléments pathogènes et qui a aussi pour fonction de favoriser la mise en place d'une deuxième ligne de défense appelée immunité adaptative *via* la présentation, aux lymphocytes T (LT) et B (LB), d'antigènes (Ag) associés à ces pathogènes. Bien que cette 2ème ligne de défense soit plus longue à mettre en place (~20 jours), elle présente la particularité d'être beaucoup plus efficace et rapide contre les infections déjà rencontrées.

La première ligne de défense immédiate comprend la barrière épithéliale et le mucus qui constituent une barrière physique et d'un certain nombre d'enzymes antimicrobiennes comme les lysozymes sécrétées dans les larmes et la salive, de peptides antimicrobiens comme les défensines sécrétées par certaines cellules épithéliales de l'intestin ou encore le système du complément dans le sang. La deuxième ligne de défense innée est composée entre autres de cellules phagocytaires, de cellules NK, de LTγδ et des cellules dendritiques (DC). Ces lignes de défense innée permettent de répondre rapidement aux premiers signes d'infection, en reconnaissant *via* des récepteurs spécialisés, plusieurs types de structure conservées exprimées par différentes classes d'agents infectieux (lipopolysaccharide, peptidoglycane, glycoprotéines d'enveloppe bactérienne, acides nucléiques...).

L'immunité adaptative permet une surveillance efficace contre les infections déjà rencontrées en reconnaissant spécifiquement un Ag donné grâce à sa capacité de mémorisation qui constitue la base de la vaccination. L'immunité adaptative (ou spécifique) est principalement assurée par des LT et LB issus, comme toutes les autres cellules immunitaires, de progéniteurs hématopoïétiques. Les LB sont à l'origine de la réponse humorale (production d'anticorps (Ac encore appelées immunoglobulines (Ig)) et les LT de la réponse cellulaire.

Afin de reconnaître la multitude d'Ag exprimés par les agents pathogènes, le SI a mis en place des mécanismes lui permettant de générer une grande diversité de son répertoire. Cette diversité qui s'exprime *via* les récepteurs BCR et TCR est générée spontanément en l'absence de toute stimulation antigénique, par recombinaisons d'un nombre limité de segments d'ADN V, (D), J situés sur 3 loci géniques distincts pour chaque type de récepteur (des LB BCR : IgH, κ, λ et des LT TCR : ensemble α−δ, β, γ). Cette diversité structurale conjugue une diversité combinatoire par association stochastique de segments d'ADN distincts et la

formation d'hétéro-dimères (TCR αβ ou γδ ; chaîne lourde avec chaîne légère des BCR) et une diversité jonctionnelle par addition de nucléotides par la machinerie de réparation de l'ADN. Au total le répertoire potentiel initial des LT ou LB se situe aux environs de 10^7 récepteurs différents (Arstila *et al.*, 1999).

Les LB se différencient de façon Ag indépendante dans la moelle osseuse avant d'être opérationnels et d'accomplir leur fonction à la périphérie et dans la rate. Chaque LB exprime à sa surface un récepteur spécifique d'un Ag particulier (BCR) nommé Ac une fois sécrété. Le pool de LB doit donc être composé d'une gamme variée de LB susceptibles de reconnaître l'ensemble des Ag rencontrés. Les LB sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires après avoir reconnu spécifiquement leur Ag *via* le BCR et se différencient alors en plasmocytes qui sécrètent des Ac dirigés contre une cible extracellulaire. Les Ac sont des hétérodimères de protéines capables de reconnaitre et de se fixer spécifiquement sur l'Ag pour lequel ils sont spécifiques. Une fois le pathogène recouvert par les Ac, plusieurs mécanismes d'élimination peuvent se mettre en place : la phagocytose par les cellules spécialisées telles que les macrophages et les neutrophiles (opsonisation), l'intervention du système protéolytique du complément, ou encore l'ADCC (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac) qui fait intervenir les cellules NK, les neutrophiles ou les éosinophiles. Cette réponse humorale permet, *via* les Ac présents dans la circulation sanguine et lymphatique de neutraliser l'infection à des phases précoces.

Avant d'être opérationnels, les précurseurs thymiques des LT migrent de la moelle osseuse vers le thymus, où ils vont se différencier et subir la sélection thymique qui permet la sélection de LT exprimant un TCR fonctionnel et l'élimination des LT auto-réactifs ayant une forte affinité pour les Ag du SOI. Ils rejoignent alors la périphérie dans les différents organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques et la rate. C'est principalement dans ces organes lymphoïdes secondaires que les LT matures rencontrent pour la première fois leur cible antigénique. Contrairement à leurs homologues B qui reconnaissent des Ag natifs, les LTαβ ne peuvent reconnaître un peptide antigénique que lorsque celui-ci est présenté par une cellule présentatrice de l'Ag (CPAg). Pour ce faire, les LT expriment à leur surface un TCR capable de discerner les cellules saines des cellules infectées ou étrangères à l'organisme. Les LT contribuent d'une part à la réponse immunitaire à médiation cellulaire, d'autre part ils permettent l'activation de la réponse humorale et contribuent à la fonction mémoire qui permet une mise en œuvre beaucoup plus rapide et efficace de l'immunité adaptative lors d'une rencontre ultérieure avec le même pathogène.

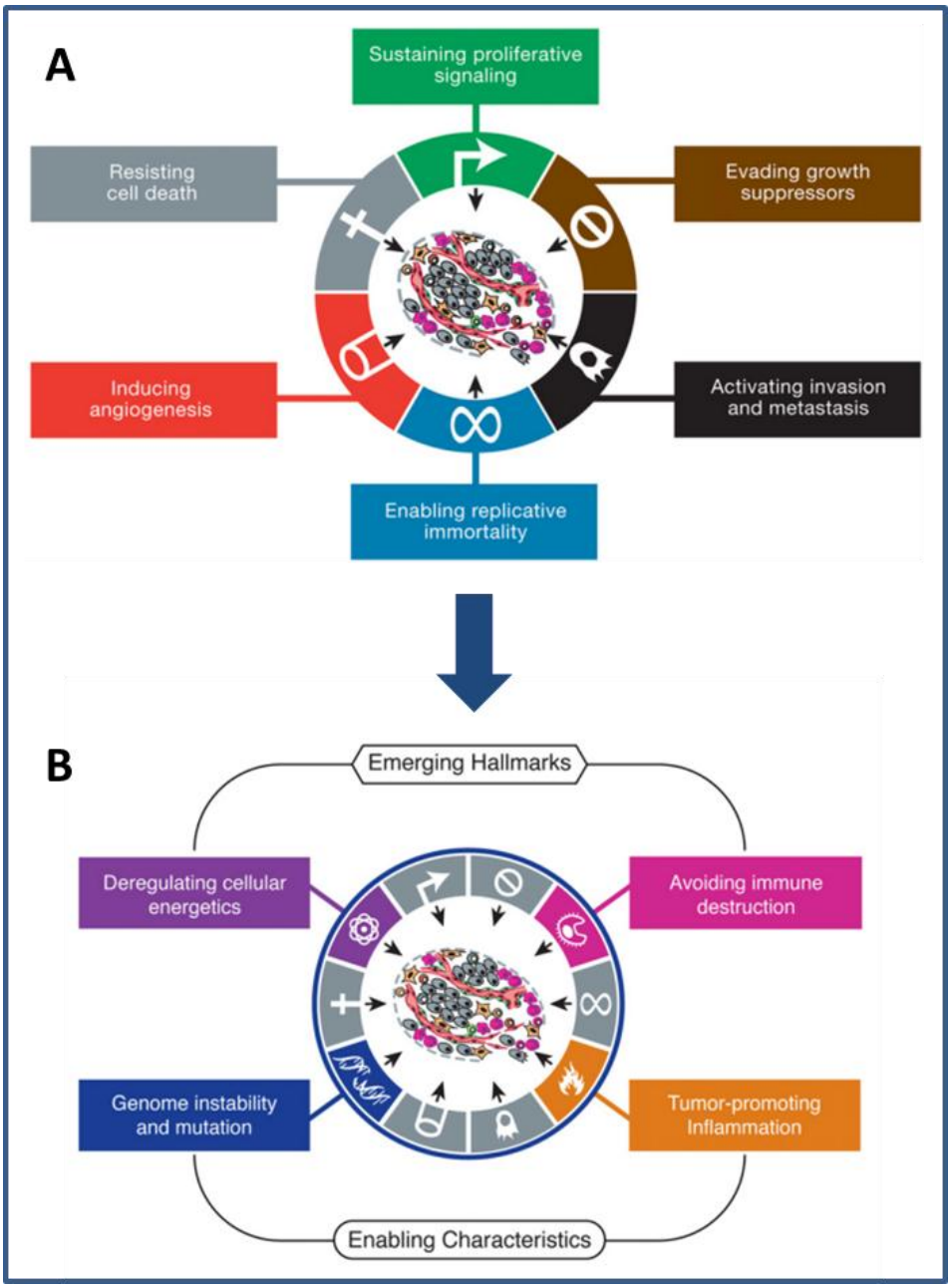
Les cellules de l'organisme (à l'exception des hématies) possèdent à leur surface une « carte d'identité » présentée au SI pour démontrer leur intégrité. Ces marqueurs d'intégrité appartiennent au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I ou II : ils ont la capacité de présenter un peptide antigénique du « SOI » lorsque les cellules sont saines. Les cellules de l'organisme, qui présentent un CMH de type I, peuvent informer les LT $CD8^+$ cytotoxiques. De son côté, le CMH de type II n'est exprimé que par les cellules immunitaires telles que les macrophages, les DC, les LB et par les LT après activation. Les LT comportent des cellules à fonction directement cytotoxiques (CTL), surtout de phénotype $CD8^+$, d'autres

de phénotype $CD4^+$ à fonctions auxiliaires c'est-à-dire nécessaires à l'activation d'autres cellules de l'immunité (LB, CTL, macrophages). Pour leur activation, les LT dépendent étroitement des CPAg, et particulièrement des DC. Ces LT possèdent une vaste palette de possibilités de différenciation, leur permettant de moduler la nature de la réponse immune. Il existe enfin, à l'état naturel, des LT régulateurs (Treg) à fonction suppressive, les mieux caractérisés étant de phénotype $CD4^+CD25^{high}FoxpP3^+$. Ces Treg préviennent, entre autre, la survenue de lésions auto-immunes.

Cancer et immunité

Le cancer est une pathologie à part puisqu'elle a comme origine des cellules du SOI devenues anormales/malignes. La tumorigénèse découle de la succession et de l'accumulation d'altérations génétiques conduisant à la transformation progressive de cellules normales en cellules malignes. Le développement de la tumeur suit un procédé analogue à celui de l'évolution selon Darwin, chaque mutation génétique conférant un avantage pour la croissance est sélectionnée. Hanahan & Weinberg ont répertorié, en 2000, les signes distinctifs de cette pathologie particulièrement hétérogène (Hanahan et Weinberg, 2000). Ainsi une tumeur est caractérisée par le maintien du signal prolifératif, l'échappement aux suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité réplicative, l'induction de l'angiogenèse, et l'activation de l'invasion et du processus métastatique (Figure 1A). Au-delà du processus d'oncogénèse, les cellules tumorales sont le siège d'un nombre important d'altérations génétiques dues à l'instabilité des cellules tumorales. Des protéines peuvent donc être modifiées (mutation, translocation, changement de cadre de lecture) dans les cellules tumorales, et générer de nouveaux Ag spécifiques des tumeurs (TAA). Au cours des dernières années, deux nouvelles caractéristiques ont émergé : la reprogrammation du métabolisme énergétique et **l'échappement au système immunitaire** (Schreiber *et al.*, 2011) (Figure 1B).

Un nombre croissant de preuves ont été accumulées, d'abord chez les souris immuno-déficientes scid (severe combined immune deficiency) plus sensibles au développement de tumeurs induites (Engel *et al.*, 1996). Chez l'Homme, de nombreuses études recensent le risque accru de cancer chez les patients recevant une greffe (Birkeland *et al.*, 1995; Penn, 1978). Ces patients sont traités avec de fortes doses de chimiothérapie immuno-suppressive suggérant le rôle du système immunitaire dans la surveillance du cancer. Les cancers peuvent être d'origine virale (Birkeland *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 2005) ou non (MacKie *et al.*, 2003). D'autre part, l'apparition de rémissions spontanées, des études épidémiologiques et le rôle pronostique des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) vont dans le sens d'un rôle du SI dans la surveillance et l'élimination du cancer (Dunn *et al.*, 2002; Swann et Smyth, 2007). Une multitude de mécanismes, par lesquels la tumeur peut subvertir la réponse immunitaire et lui échapper, ont été identifiés soulignant ainsi l'importance de l'interaction entre cellules tumorales et cellules immunitaires (pour revue (Zitvogel *et al.*, 2006). D'autres évidences montrent que la tumeur peut détourner la réponse immune et promouvoir la carcinogénèse *via* par exemple une inflammation chronique et une réponse humorale inappropriée (Balkwill *et al.*, 2005; Coussens et Werb, 2002; DeNardo et Coussens, 2007).



<u>Figure 1</u> : Illustration de Hanahan et al. (Hanahan et Weinberg, 2011) présentant les 6 caractéristiques proposées en 2000 (A) ainsi que les 2 caractéristiques émergeantes proposées en 2011 issues des découvertes de la dernière décennie (B). La première caractéristique est la reprogrammation du métabolisme énergétique et la seconde ***l'échappement au SI*** *qui permet aux cellules cancéreuses d'éviter leur destruction.*

Les traitements anti cancéreux conventionnels interagissent avec le SI au travers, entre autres, de l'induction d'une mort cellulaire potentiellement immunogénique (Casares *et al.*, 2005; Demaria *et al.*, 2005; Lake et Robinson, 2005; Zitvogel *et al.*, 2011). Ces résultats indiquent clairement que la relation entre cancers et SI devrait guider la conception de stratégies thérapeutiques.

De nombreuses publications rapportent une perturbation du SI systémique avant tout traitement de la tumeur au stade métastatique. Lors de la détection de la rechute, une diminution des populations lymphocytaires au niveau systémique (sang périphérique) est observée chez 25% des patients atteints de cancers solides (lymphomes non hodgkiniens, myélomes multiples, cancer du sein, sarcomes). Il n'est pas encore clair s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la pathologie mais il a été mis en évidence que la lymphopénie **avant tout traitement** possédait une forte valeur pronostique sur la survie dans le cancer du sein métastatique, le sarcome avancé et le lymphome non Hodgkinien à grandes cellules diffuses (Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)).

D'autre part, des études ont souligné l'importance de la diversité des récepteurs des lymphocytes dans l'efficacité de la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale. La diversité des LB et LT, constitue le répertoire « immunitaire » qui contrôle l'intégrité de l'organisme et conditionne sa capacité à reconnaître et contrôler les agressions infectieuses et le développement des tumeurs. L'étude de la diversité des lymphocytes pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la lymphopénie impacte la survie globale et ainsi affiner la détection des patients les plus à risque pour une meilleure prise en charge.

Malgré ces nombreuses mises en évidence, le statut du SI n'est toujours pas pris en considération dans le suivi des patients souffrant d'un cancer. L'impact pronostique de la diversité du répertoire TCR dans le sang périphérique commence tout juste à être étudié chez des patients souffrant d'un cancer en phase métastatique.

Lors de ce travail de thèse, nous avons donc voulu pousser plus loin l'investigation des distorsions du SI avant traitement afin de savoir si l'étude de la **diversité combinatoire** (*ImmunID Technologies*) dans le cancer du sein métastatique pourrait i) confirmer la valeur pronostique des distorsions du SI sur la survie des patientes, et ii) permettre de proposer aux patientes immunodéprimées des approches thérapeutiques innovantes d'immuno-reconstitution. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse systématique des fréquences des populations du SI et de la diversité combinatoire TCR. Nous avons déterminé la valeur pronostique de chaque marqueur et les avons corrélés à la progression tumorale et à la survie globale afin d'identifier les patientes à risque.

Le versant bibliographique de ma thèse se composera de trois parties dont l'objectif est d'illustrer le caractère translationnel de mon travail. Je commencerai par introduire i) l'importance de la diversité des TCR dont l'étude est le cœur de métier de la société ImmunID, puis ii) les pratiques cliniques associées au cancer du sein, notamment le rôle clé des facteurs pronostiques et prédictifs en tant qu'outils décisionnels pour les médecins traitants. Je finirai cette partie en présentant iii) les liens étroits existant entre immunité et cancer.

1. Partie I : la diversité du répertoire immunitaire

La diversité du TCR est le fruit de mécanismes complexes au niveau génétique, enzymatique et la résultante d'une sélection stricte. D'un point de vue fonctionnel, la diversité des TCR est directement corrélée au nombre d'Ag que peut reconnaitre le SI et joue donc un rôle essentiel dans l'efficacité de la réponse immunitaire.

1.1. La diversité des TCR

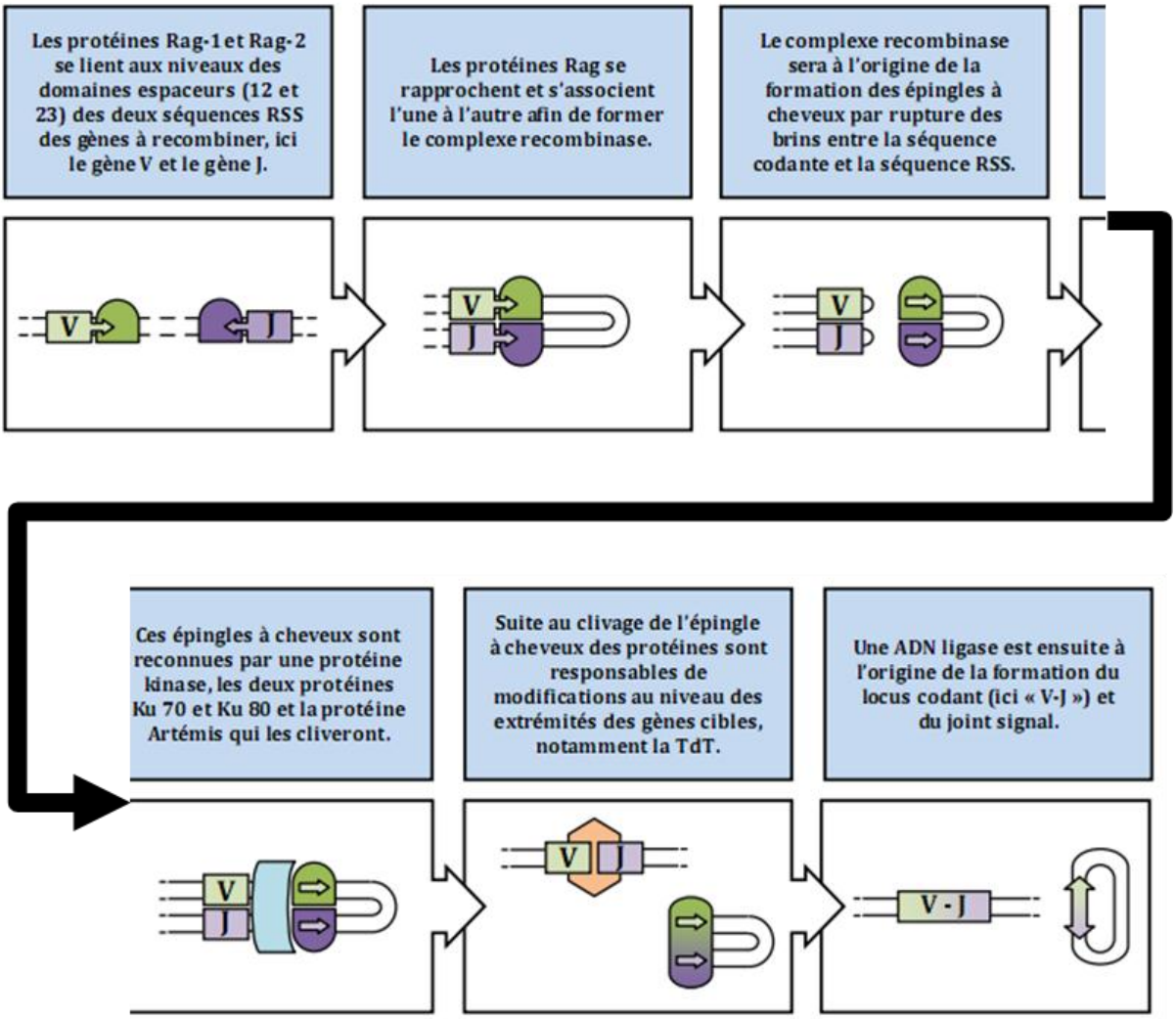
Mécanismes à l'origine de la diversité du répertoire T

Le TCR est une protéine exprimée à la surface des LT qui permet de détecter la présence d'Ag dans leur environnement. Chaque LT exprime un TCR à sa surface qui reconnaît de façon spécifique un nombre limité de peptides antigéniques différents grâce à une certaine plasticité permettant à un même récepteur de reconnaitre plusieurs Ag de structure proche (pour revue (Sloan-Lancaster et Allen, 1996)). Cette spécificité est déterminée par la structure de son site de liaison à l'Ag. Face à la multitude d'Ag, qu'ils soient viraux, bactériens ou encore tumoraux, l'organisme a été contraint de mettre en place un mécanisme complexe lui permettant de générer ces protéines membranaires hautement variables à partir d'un nombre limité de gènes.

Pour cela, le SI a développé 4 mécanismes majeurs qui contribuent à générer la diversité du répertoire : 1) une **diversité combinatoire** qui correspond à la première étape de réarrangement entre un segment V (un segment D) et un segment J ; 2) une **diversité jonctionnelle**, générée au niveau de la jonction entre les segments de gènes réarrangés ; 3) les hypermutations somatiques (spécifique des LB), 4) une **diversité d'appariement** des hétéro-dimères protéiques TCRα x TCRβ ou TCRγ x TCRδ.

La diversité combinatoire

La première étape de génération de diversité est basée sur le principe du réarrangement des gènes V(D)J. Le mécanisme de réarrangement V(D)J est spécifique des LT et les LB. Les gènes V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) codant pour le TCR sont répartis sur de longues portions germinales au sein des différents loci du TCR. Pour donner une protéine, ces gènes doivent être associés en un exon par un processus de réarrangement des gènes appelé recombinaison V(D)J (Figure 2). Le principe de la recombinaison est basé sur la reconnaissance de séquences séquence signal de recombinaison (RSS) spécifiques des gènes V(D)J et l'excision de la région chromosomique intercalée entre les deux gènes réarrangés. Chaque gène V et J possèdent une RSS à une de leurs extrémités. Quant aux gènes D, ils en possèdent aux deux extrémités. Les RSS sont des séquences reconnues par les enzymes spécifiques de la recombinase, RAG I et RAG II (Recombination activating gene), exprimées spécifiquement dans les lymphocytes. Ces protéines sont les actrices principales du réarrangement. Une fois associées aux protéines HMG (High mobility group), les enzymes RAG reconnaissent le nona-mère du RSS grâce à leur homéo-domaine et induisent une



<u>Figure 2</u> : schéma simplifié représentant les différents mécanismes mis en jeu dans la recombinaison V(D)J (figure extraite du site cours-pharmacie.com).

coupure entre le segment de gène V, D, J et l'hepta-mère, de façon à générer une extrémité codante et une extrémité signal. L'achèvement d'un réarrangement est obtenu après ligation des deux extrémités codantes V et J. Cette étape est précédée par l'action de l'enzyme TdT et d'une nucléase au niveau de la jonction V-J. Une fois réarrangé, le gène néoformé est transcrit puis épissé en ARNm avant d'être traduit en protéine membranaire (Figure 3).

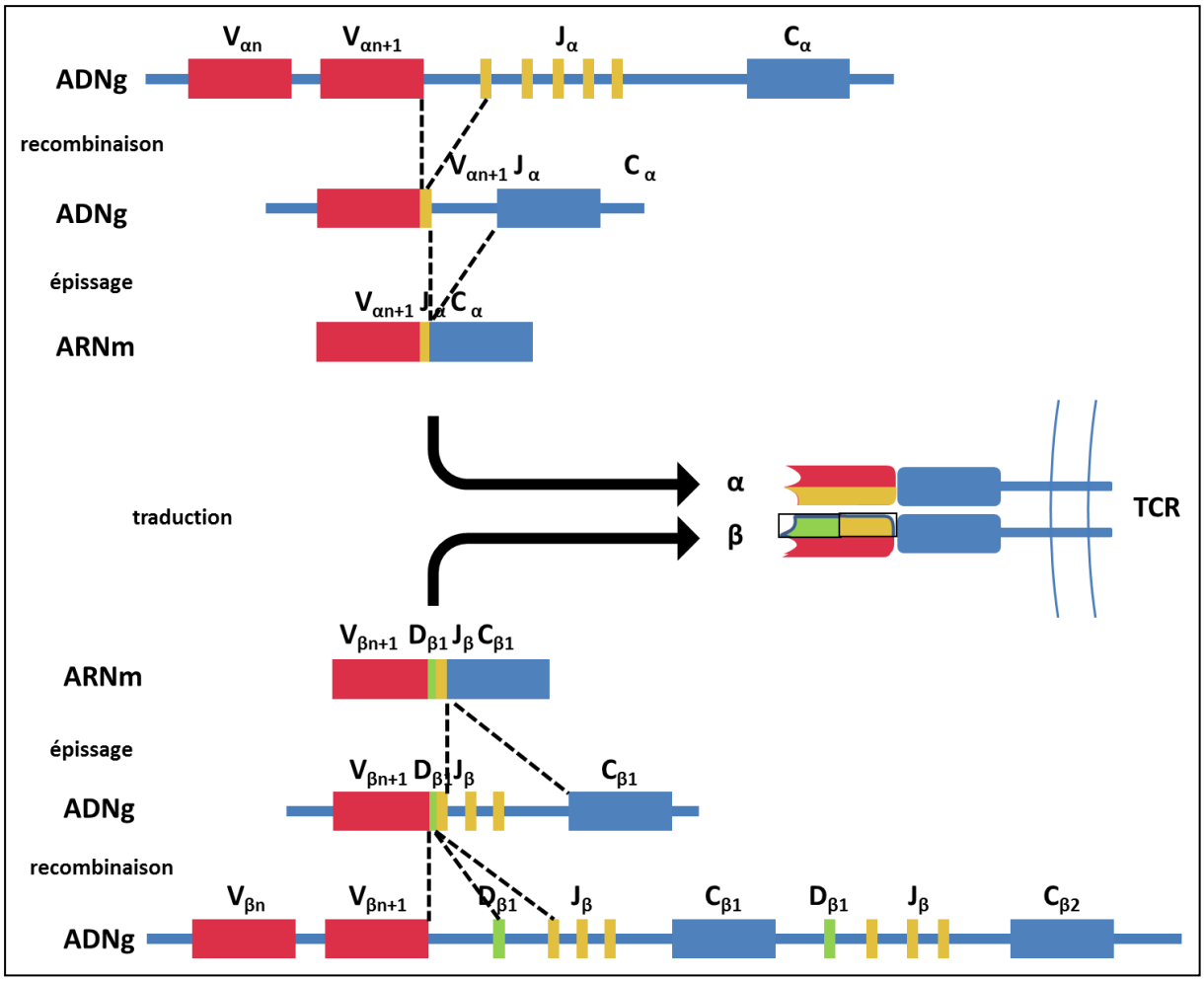


Figure 3 : mécanismes de recombinaison, d'épissage et de traduction conduisant à l'expression d'un TCR fonctionnel.

Le calcul de la diversité combinatoire consiste à estimer le nombre de combinaisons possibles. A titre d'exemple la chaine β du TCR (TRB) présente 48V x 2D x 13J = 1248 combinaisons possibles. Le mécanisme régulant la recombinaison V(D)J n'est pas aléatoire : il est régulé de façon spatio-temporelle au cours de l'ontogénie (Aude-Garcia *et al.*, 2000; Gallagher *et al.*, 2001; Jouvin-Marche *et al.*, 1998; Pasqual *et al.*, 2002; Rytkonen *et al.*, 1996). Lors du mécanisme de réarrangement, les gènes V et J proximaux sont utilisés de manière préférentielle (Pasqual *et al.*, 2002), une simple multiplication ne suffit donc pas à estimer le nombre total de combinaisons de gènes attendus. Cette première étape de génération de diversité définit l'ordre de grandeur du répertoire. En effet, même si cette étape ne génère qu'une modeste variabilité de combinaisons (quelques milliers de combinaisons possibles par rapport au répertoire maximal estimé à 10^7), la diversité combinatoire maximale est directement liée au nombre de gènes V, D et J initialement disponibles.

Les deux autres étapes de génération de la diversité amplifient de manière exponentielle la diversité du répertoire primaire.

La diversité jonctionnelle

La diversité de jonction permet de générer une grande variabilité au niveau de la région CDR3 hypervariable du récepteur en contact avec le peptide antigénique. Deux mécanismes contribuent à augmenter la diversité jonctionnelle : 1) le premier mécanisme est dû à l'ajout de nucléotides P (pour palindromiques), provenant de la résolution de l'épingle à cheveux des segments réarrangés (Fugmann *et al.*, 2000). La diversité générée n'est pas aussi grande que celle provenant du deuxième mécanisme faisant intervenir l'enzyme « terminal desoxynucleotidyl transférase » (TdT) ; 2) la TdT produit une importante diversité, en ajoutant de façon aléatoire des nucléotides N à l'extrémité 3' de chaque segment codant, sans qu'elle ait besoin d'une matrice génomique (Bogue *et al.*, 1992) (Figure 4). Des études chez la souris TdT $^{-/-}$ ont permis d'estimer que, chez ces animaux, le répertoire TCRαβ ne représentait que 5 à 10% du répertoire normal et donc que la TdT contribuait à hauteur de 90% à la génération de la diversité totale du TCRαβ. La diversité jonctionnelle représente le plus grand facteur d'amplification de la diversité du répertoire. Cependant, s'il n'y avait pas le mécanisme de réarrangement secondaire pour sauver 2/3 des thymocytes ayant interrompu leur cadre de lecture lors de la recombinaison V(D)J, seule 1/3 de cette diversité serait conservée. Lors d'un réarrangement non fonctionnel, la cellule a la possibilité de tenter un deuxième réarrangement avec les gènes V(D)J encore disponibles sur le locus (gènes V et J disponibles de part et d'autre du premier réarrangement). Si toutefois ces premiers réarrangements n'étaient toujours pas productifs, la cellule a encore la possibilité de tenter des réarrangements sur son second chromosome.

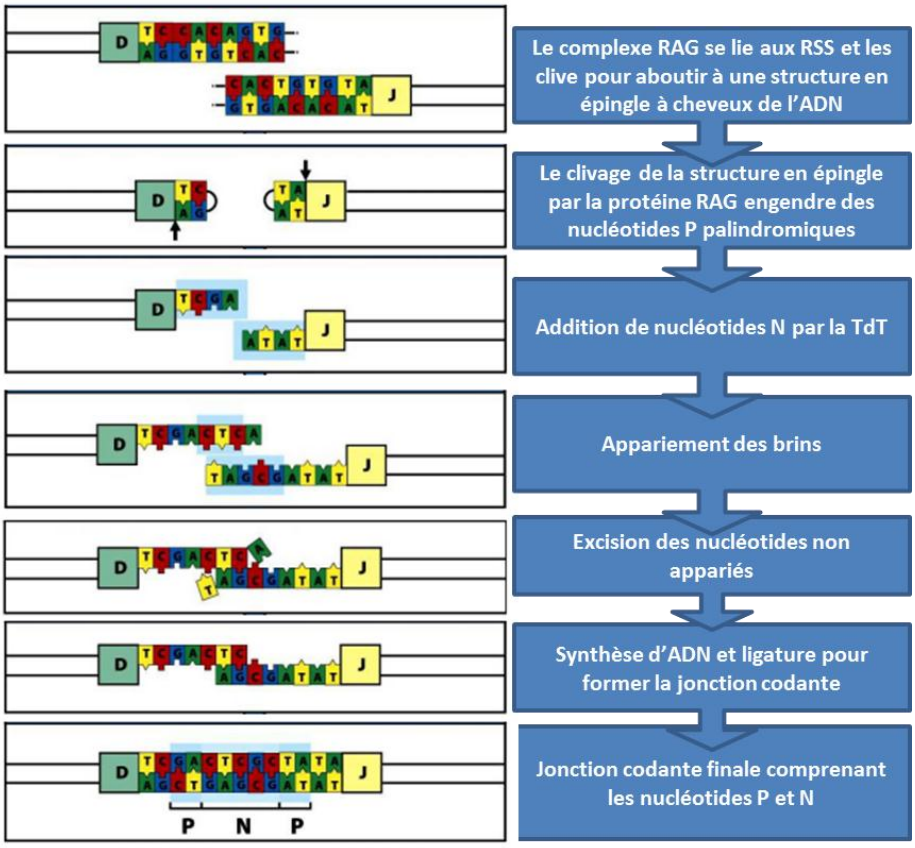


Figure 4 : mécanismes à l'origine de l'hyper variabilité de la diversité jonctionnelle (illustration adaptée de Janeway ; Immunobiologie, 2003, édition de boeck).

La diversité d'appariement TCR αβ ou TCRγδ

L'estimation de la diversité issue de l'appariement entre une chaîne TCRα et une chaîne TCRβ est obtenue en multipliant le nombre de combinaisons différentes d'une chaine TCRβ, par le nombre de combinaisons possibles pour la chaîne TCRα. La diversité générée par ce mécanisme est directement dépendante du nombre de combinaisons primaires obtenu lors du réarrangement. A titre d'exemple si nous examinons le nombre de combinaisons primaires des TCRα x TCRβ de l'homme sans prendre en compte ni la diversité jonctionnelle, ni les hypermutations somatiques (HMS) (voir encadré LB) , nous obtenons 8,26 10^5 combinaisons (46Vα fonctionnel*48Jα fonctionnels*0,3 règle d'utilisation combinatoire *48Vβ fonctionnels*2Dβ*13Jβ fonctionnels). La diversité théorique de chaque chaine est exprimée dans le tableau 1, pour l'Homme et la souris. Ces estimations ont été réalisées avant la mise en évidence de la règle d'utilisation des réarrangements génomiques et ne prennent donc pas en compte que seulement 30% des combinaisons V(D)J sont possibles.

		Répertoire naïf en périphérie		
SOURIS	**TCRβ**	5-8 10^5 Casrouge JI 2000		
	TCRα	1,18 10^4 cabaniols JEM 2001		
HUMAIN	**TCRβ**	1,3 10^6 Artisla Science 1999		
	TCRα	0,5 10^6 Artisla Science 1999	**Estimation de la fréquence d'un clone TCRαβ à la périphérie**	**Nombre de cellules TCRαβ à la périphérie**
	TCRαβ SOURIS	1,85 10^6 Casrouge JI 2000	10^1	10^8
	TCRαβ HUMAIN	10^7- 10^8 Artisla Science 1999	10^3	10^{11}

<u>Tableau 1</u> : synthèse des différentes estimations de la taille du répertoire TCRαβ chez la souris et chez l'homme. Ces valeurs ont été obtenues par analyse des séquences des pics de CDR3, à partir de transcrits provenant du sang de donneurs sains pour l'étude effectuée chez l'homme, et à partir de splénocytes chez la souris.

Cette capacité de produire un répertoire BCR/TCR théoriquement infini est en contradiction apparente avec le principe même de la stabilité du génome que l'organisme s'efforce de préserver. Ainsi pour éviter les réponses contre le SOI, l'organisme a su développer un ensemble de régulations contrôlant la mise en place du répertoire immunitaire.

1.2. Développement et sélection des LT

Le thymus, lieu de maturation des LT

Le thymus est à la fois un lieu de maturation et de sélection pour les lymphocytes. Cet organe immunitaire spécialisé dans la maturation des LT est situé juste au-dessus du cœur et assure la colonisation de l'organisme par ces acteurs de la défense immunitaire spécifique. Le parenchyme du thymus est constitué de leucocytes appelées thymocytes, la plupart appartenant à la lignée T lymphoïde, et de cellules stromales dont les cellules épithéliales thymiques (TEC). Les TEC produisent des signaux essentiels au développement des thymocytes. En réponse à ces signaux, les thymocytes prolifèrent, et se différencient pour aboutir à des LT matures au répertoire TCR à la fois diversifié et tolérant au SOI. Ces étapes prennent place dans des régions du thymus anatomiquement distinctes.

Les LT proviennent des cellules souches hématopoïétiques dérivées des cellules progénitrices lymphoïdes T qui migrent de la moelle vers le thymus. La différenciation des LT chez la souris est beaucoup mieux connue et est caractérisée par la combinaison de l'expression temporellement coordonnée de protéines de surface, dont CD4, CD8, CD25 et CD44. Les cellules les plus immatures sont définies comme les progéniteurs de la lignée T. Ces cellules n'expriment ni CD4, ni CD8 et sont des thymocytes CD4/CD8 doubles négatifs (DN). La survie et le développement des thymocytes DN est promue par des ligands delta-like (ligand de Notch) et des cytokines dont l'IL-7, les deux étant produits par les TEC corticales (cTEC). Au stade DN, chez la souris, les thymocytes entrent dans un programme de développement et passent par plusieurs étapes : DN1 ($CD44^+CD25^-$), DN2 ($CD44^+CD25^+$), et DN3 ($CD44^-CD25^+$) pendant lesquelles se déroule le réarrangement des loci des TCRγ, δ, et β. Au stade DN, les LT peuvent exprimer soit un TCRαβ soit un TCRγδ. L'appariement de la chaine β du TCR avec la chaine pré-TCRα et CD3 conduit à l'engagement du LT dans une lignée TCRαβ et à une différenciation au-delà du stade DN3 qui inclue une prolifération, le réarrangement du TCRα-VJ, l'inhibition du CD25 et l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 qui caractérise le stade double positif (DP).

Sélection du TCR

Le processus de développement des thymocytes DN est associé à une localisation spatio-temporelle des cellules dans le parenchyme thymique (Figure 5). Les cellules progénitrices sont principalement localisées dans la jonction cortico-médullaire, entre le cortex et la médulla. Les thymocytes migrent dans le cortex pendant la différenciation en thymocytes DN2 et DN3. La plupart des thymocytes DN3 sont localisés dans la région du cortex à proximité de la capsule ou ils se développent jusqu'au stade pré-DP qui n'expriment que très peu CD4, CD8, CD25 et CD44 et qui sont les précurseurs immédiats des thymocytes $CD4^+CD8^+$ DP. Les thymocytes DP qui expriment le TCRαβ à leur surface se déplacent activement dans le cortex à la recherche d'une interaction TCR-complexe CMH-peptide du SOI. Les thymocytes corticaux qui interagissent *via* leur TCR avec le complexe CMH-peptide du SOI, présentés par les cTEC et les DC, sont sélectionnés pour survivre ou être éliminés en fonction de l'avidité de l'interaction. Une interaction de faible avidité permet aux thymocytes DP de survivre et de se différencier en thymocyte matures par un procédé appelé la sélection positive. A l'opposé, une interaction de forte avidité entraîne leur élimination par un procédé appelé sélection négative. Les thymocytes sélectionnés positivement migrent vers la medulla ou ils interagissent avec les peptides du SOI présents dans le microenvironnement médullaire. Ces TEC médullaires (mTEC) expriment un panel d'Ag représentatif des tissus périphériques, contribuant ainsi à la tolérance du SOI. Une interaction trop forte des cellules simples positives (SP) $CD4^+$ ou $CD8^+$ avec les mTEC entraine également la sélection négative (Figure 6). Les différents mécanismes de sélection abordés permettent la génération d'un répertoire à la fois diversifié et tolérant au SOI.

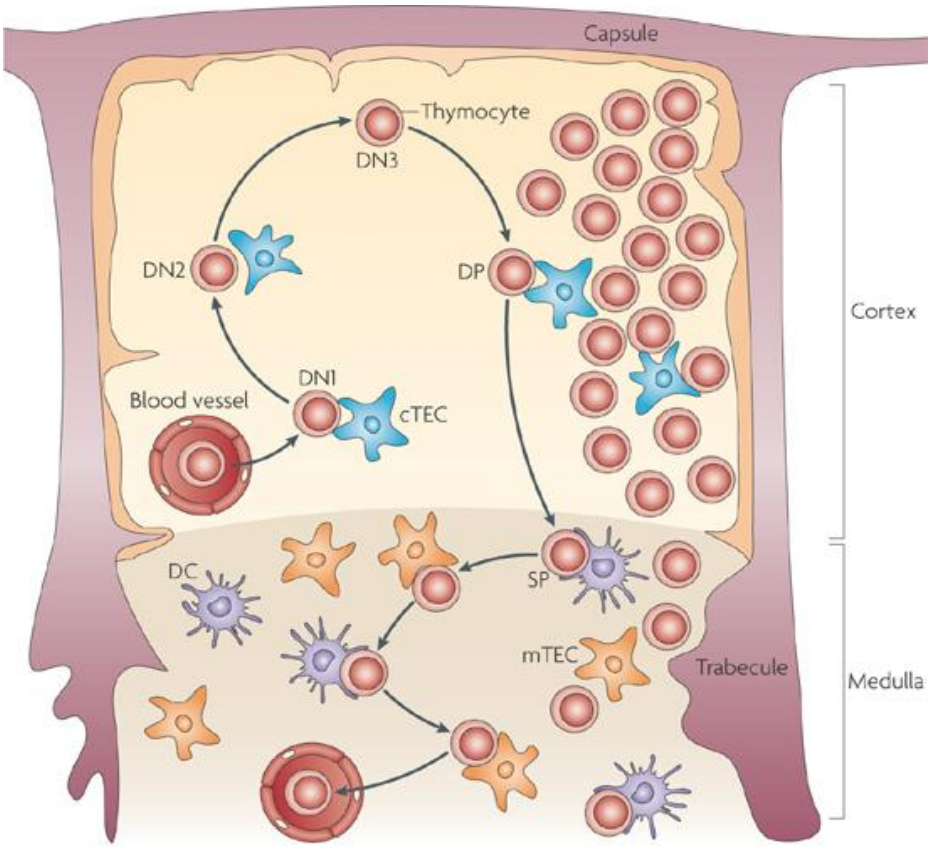


Figure 5: Différenciation des LT dans le thymus *(extrait de Nature Reviews (Klein et al., 2009)).*

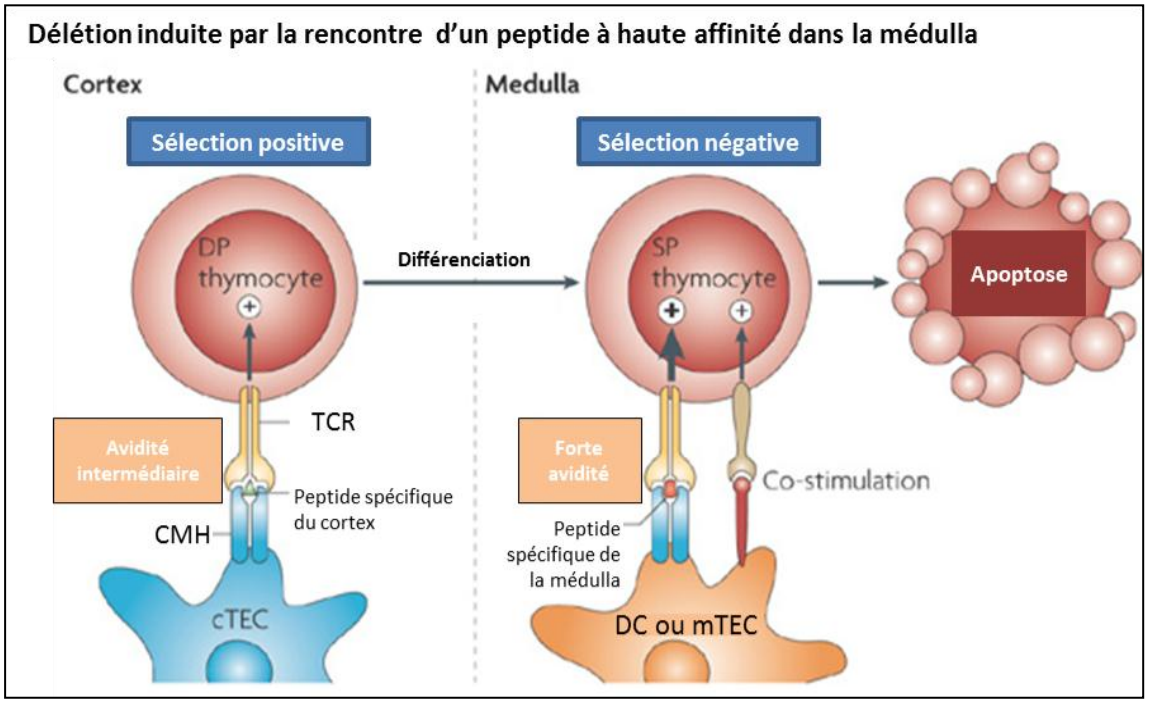


Figure 6 : Sélection négative induite par la rencontre d'un peptide de haute affinité dans la medulla (illustration adaptée de, Nature Reviews, (Klein et al., 2009)).

Le développement des LB

Les LB tout comme les LT sont originaires de la moelle osseuse. Mais contrairement aux LT il n'existe pas de sélection aussi stricte des LB. En contrepartie, la mise en œuvre de la réponse humorale nécessite une co-activation par les LT auxiliaires (Th2).

La diversité des BCR

La diversification des BCR suit un processus analogue à celui des LT. En plus de la diversité combinatoire, de la diversité jonctionnelle et de la diversité d'appariement, vient s'ajouter un mécanisme supplémentaire capable de générer de la diversité: les HMS. Ce mécanisme prend place dans les organes lymphoïdes secondaires. L'HMS induite par l'enzyme AID (activation induced cytidine deaminase) introduit des mutations ponctuelles dans les régions V réarrangées des BCR et peut modifier l'affinité de liaison à l'Ag. Lorsque cette affinité est augmentée, on parle de maturation d'affinité.

1.3. La diversité : un atout dans la lutte contre les infections et le cancer

Des études récentes ont souligné l'importance de la diversité des LT dans l'efficacité de la réponse anti-infectieuse. La diversité structurelle du TCR est importante au moins à deux niveaux : le premier à l'origine d'une avidité structurale optimale permet une réponse efficace aux épitopes immuno-dominants[1] ; et le second niveau, pour éviter l'échappement par mutation. Ces deux niveaux bien que complémentaires sont distincts. Afin de reconnaitre les épitopes immuno-dominants, le TCR le plus efficace pour cet épitope cible doit être sélectionné à partir de la diversité disponible issue du thymus (Messaoudi *et al.*, 2002) ; si le taux de mutation est limité et si la réponse est efficace, le pathogène est éliminé. L'importance de l'hétérogénéité des clones de LT définie par la diversité du TCR dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace a été démontrée par l'équipe de Nikolich-Zugich (Messaoudi *et al.*, 2002). Chez la souris, la comparaison de deux modèles murins, l'un présentant un répertoire plus diversifié que l'autre, a permis de mettre en évidence une infection virale fatale à des doses 25 fois inférieures chez les souris présentant le répertoire le moins diversifié. La réponse T $CD8^+$ moins diversifiée est aussi caractérisée par une plus faible avidité suggérant qu'une réponse plus diversifiée des LT fournirait une plus grande réserve de clones parmi lesquels des CTL de plus forte avidité pourraient être recrutés.

[1] Epitope contre lequel est principalement dirigé la réponse T spécifique. L'immuno-dominance est principalement déterminée par l'apprêtement et la présentation de l'Ag, l'abondance de la protéine antigénique, la capacité de l'épitope à se fixer à un CMH et la disponibilité de la population T capable de répondre.

Pour les pathogènes capables de muter fréquemment comme le VIH, le virus influenza ou le virus de l'Hépatite C, la diversité des récepteurs offre une réserve de TCR potentiellement capables de cibler les épitopes mutés qui auraient échappé à la réponse immunitaire initiale (Price *et al.*, 2004). La flexibilité des régions CDR (complementary determining region) des TCR permet une variété de solutions pour se lier à des structures de complexes pCMH topographiquement similaires (Colf *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008(a); Jones *et al.*, 2008(b)). Cette plasticité peut potentiellement permettre d'assurer la réactivité des LT au complexe pCMH variant qui pourraient émerger suite à une mutation du virus. L'infection de macaques rhésus par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) induit une réponse $CD8^+$ spécifique du peptide dérivé des protéines Tat (aa 28–35, TTPESANL; appelé TL8) et Gag (aa 181–189, CTPYDINQM; appelé CM9) toutes les deux présentées par le CMH I Mamu-A*01. Les CTL qui reconnaissent CM9-Mamu-A*01 présentent un large spectre de séquences CDR3β, alors que les CTL spécifiques de TL8-Mamu-A*01 utilisent un motif CDR3β conservé. La diversité limitée du TCR au sein du répertoire est associée à une rapide sélection des variants TL8 qui échappent à la réponse immunitaire. Au contraire, la réponse spécifique CM9–Mamu-A*01 présentant un TCR diversifié n'est pas affecté par ces variants et reste efficace (Price *et al.*, 2004). La raison la plus évidente à cette différence est que le répertoire spécifique CM9–Mamu-A*01 plus diversifié possède des TCR capables de trouver des solutions alternatives de fixation aux épitopes variants, limitant ainsi l'émergence de mutants capables d'échapper à la réponse immunitaire.

Avec l'âge, le nombre et la diversité de répertoire des cellules naïves décroit. Cette perte de diversité est corrélée à une altération de la réponse immune (Brien *et al.*, 2009; Cicin-Sain *et al.*, 2010; Yager *et al.*, 2008). *Yager et al*. ont étudié la capacité de souris jeunes ou âgées à répondre à de nouvelles infections par le virus influenza (Yager *et al.*, 2008). Les souris jeunes répondent vigoureusement à un épitope immuno-dominant du virus alors que certaines des souris âgées (mais pas toutes) ne sont pas capables de mettre en place une réponse immune efficace contre l'épitope immuno-dominant suggérant le développement de « trous » dans le répertoire, définis par l'incapacité de répondre à un épitope donné.

En cancérologie, les LT $CD8^+$ infiltrant la tumeur qui apparaissent au cours de la progression tumorale et qui sont stimulés après vaccination par les Ag MAGE ou Melan-A présentent un répertoire TCR diversifié (Dutoit *et al.*, 2001). Cependant, les LT avec une forte avidité, qui possèdent une activité anti-tumorale supérieure (CMH tetramer « bright » corrélés à une forte avidité du LT) *in vitro* (Dutoit *et al.*, 2001) pourraient être suffisants pour l'immunité anti-tumorale. Bien que la diversité de la réponse $CD8^+$ à un Ag tumoral artificiel soit réduite chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes, une étude plus précise qui corrélerait le degré de diversité de la réponse $CD8^+$ et l'efficacité anti-tumorale *in vivo* est nécessaire pour valider que les résultats observés chez la souris âgée sont bien le fruit d'une baisse de la diversité et non d'un autre facteur lié à l'âge.

2. Partie II : le cancer du sein, clinique et biologie

2.1. Le cancer du sein

2.1.1. *Epidémiologie*

Le cancer du sein est le premier cancer féminin en terme de fréquence avec plus de 50 000 nouveaux cas estimés en 2008 (INVS, 2009). L'âge médian au diagnostic est de 61 ans (Belot *et al.*, 2008). Le cancer du sein représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. Son incidence a augmenté de manière constante entre 2000 et 2005 (évolution du taux d'incidence standardisé de + 2,1 % par an en moyenne). Parallèlement, sa mortalité diminue sur cette même période (réduction de 1,3 % par an en moyenne)(Belot *et al.*, 2008). Ces évolutions inverses s'expliquent en partie par le dépistage organisé ayant amené à des diagnostics plus précoces, mais aussi par l'amélioration de l'efficacité des traitements disponibles. Des données publiées en 2008 (Allemand, 2008) à partir de la base de données des Affections de Longue Durée (ALD) du régime général de l'Assurance maladie suggèrent une diminution depuis 2005 de l'incidence du cancer du sein possiblement liée aux diminutions de prescriptions des traitements hormonaux de la ménopause. Le cancer du sein bénéficie d'un pronostic à long terme favorable, d'autant plus qu'il est diagnostiqué et pris en charge de plus en plus tôt. La survie moyenne à 5 ans est estimée à près de 85 %[2]. Le médecin traitant, impliqué dès la phase initiale de la maladie, se retrouve donc de plus en plus concerné par le suivi sur le long terme de sa patiente.

Lors de l'apparition de métastases, dans ~15% des cas, la pathologie marque un tournant dans son évolution : la médiane de survie est alors comprise entre 24 et 36 mois avec d'importantes variations allant de quelques mois à plus de 10 ans. Aux Etats Unis, environ 230 480 nouveaux cas de décès de patientes atteintes de cancer du sein avancé métastatique et 39 520 décès de patientes atteintes de cancer primaire sont attendus en 2011 (Desantis *et al.*, 2011). L'incidence et le taux de décès chez les femmes souffrant d'un cancer du sein sont présentés par tranche d'âge dans la Figure 7 (Siegel *et al.*, 2011). En France, l'incidence des cancers du sein est passée de 153 pour 100 000 à 269 pour 100 000 en 25 ans (Figure 8) (Junod *et al.*, 2011). Cette augmentation drastique pourrait être liée à des facteurs environnementaux comme l'alcool ou l'obésité mais pourrait également être un artefact lié au dépistage précoce de la pathologie. En parallèle, le taux de mortalité n'a quasiment pas évolué pendant le même intervalle de temps.

[2] Survie des patients atteints de cancer en France, étude des registres du réseau Francim.

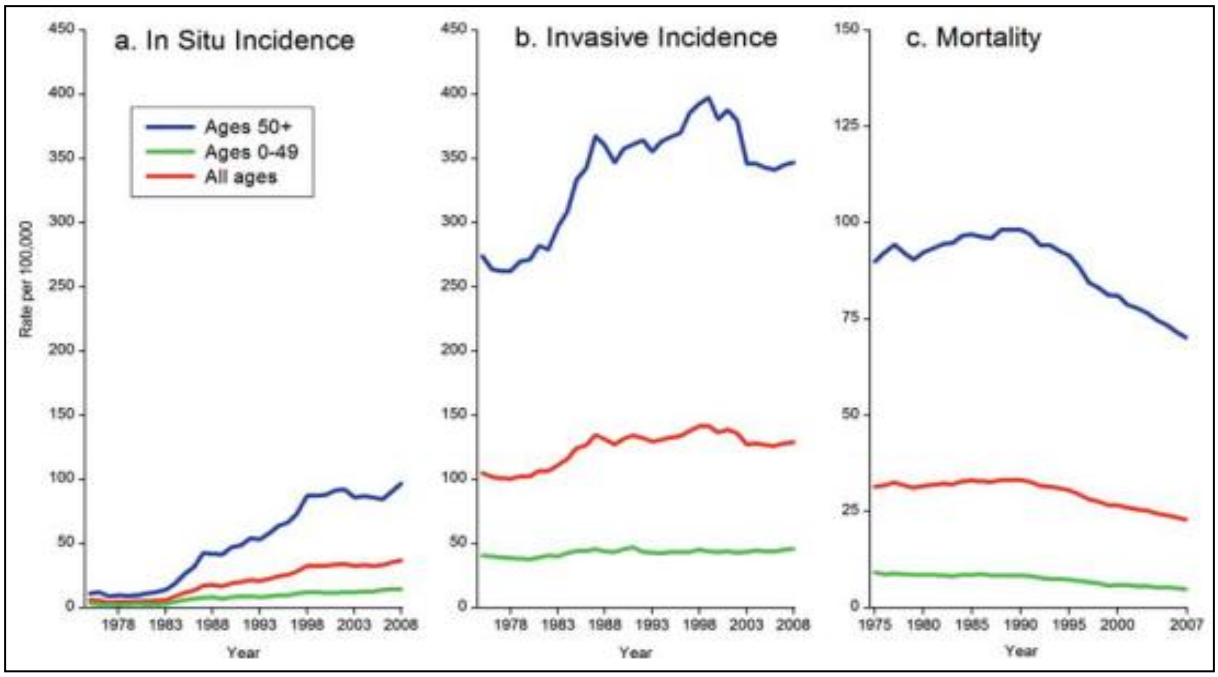


Figure 7 : Incidence de femmes atteintes d'un cancer du sein in situ ou invasif par âge aux Etats Unis de 1975 à 2008 et taux de mortalité en fonction du type de tumeur.(Adapté de Siegel et al. CA Cancer J Clin. 2011;61:212-36.) Voir définition de cancer in situ et cancer invasif §2.1.2.

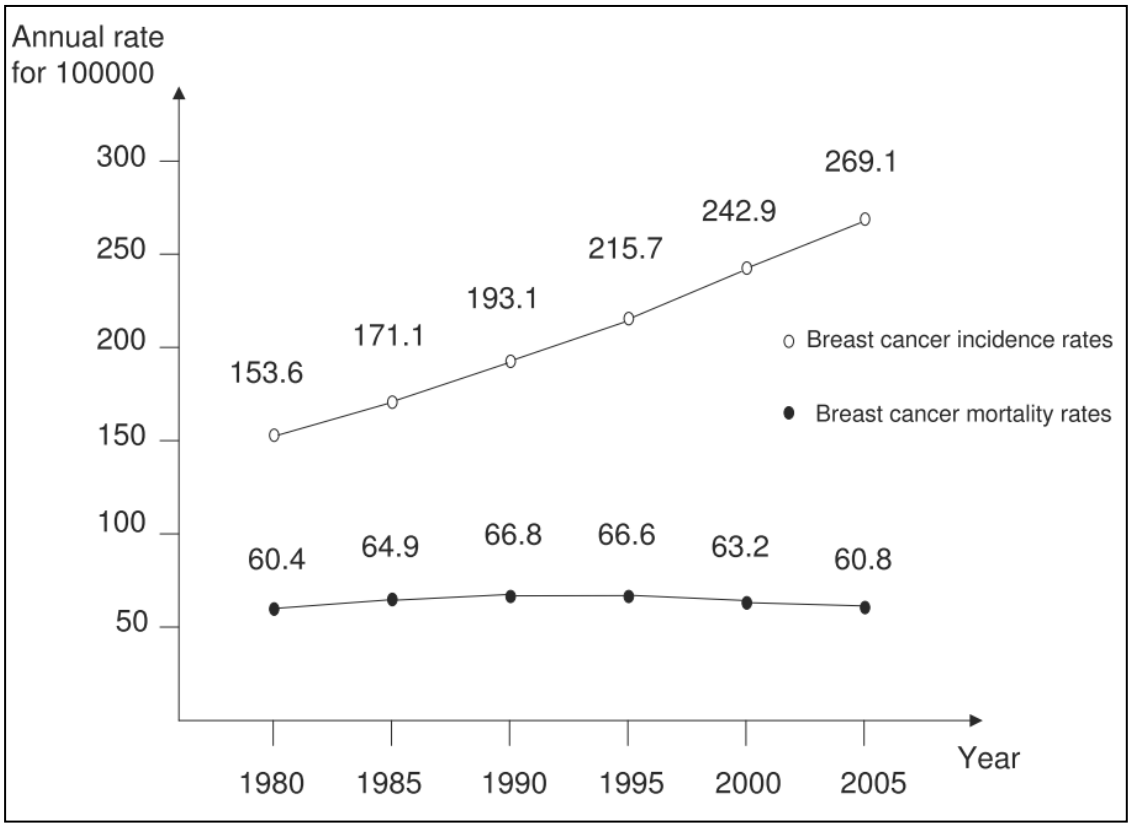


Figure 8 : Incidence et taux de mortalité des femmes atteintes d'un cancer du sein en France de 1980 à 2005 (Adapté de Junod et al. BMC Cancer 2011, 11:401)

2.1.2. Les types de cancer du sein

Plus de 98 % des cancers du sein sont des carcinomes, 2 % des sarcomes ou des lymphomes. Les carcinomes sont des tumeurs qui se développent à partir des tissus épithéliaux des canaux ou des lobules (Figure 9). Le cancer peut être non-invasif (dit in *situ*), ou bien franchir la membrane basale (cancer dit infiltrant ou invasif).

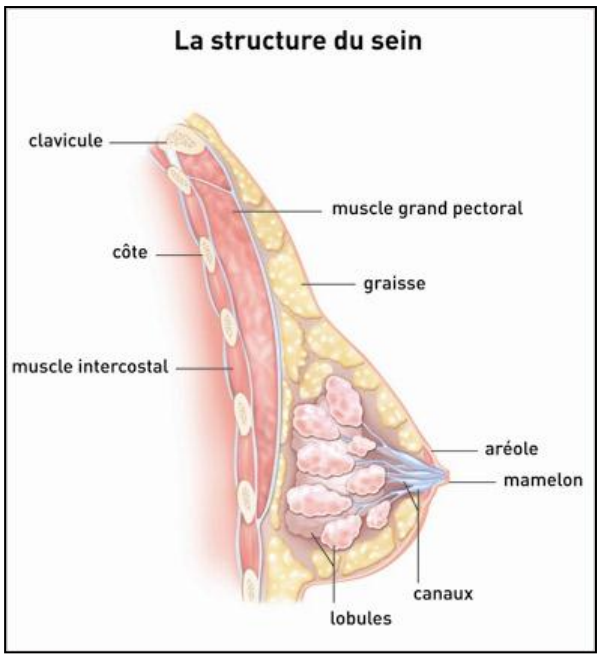


Figure 9 : Schéma anatomique du sein

Sont distingués parmi les cancers *in situ*, 1) les carcinomes canalaires *in situ* ou intra-canalaires qui se développent à partir de l'épithélium des canaux galactophores, sans infiltration tissulaire. Notons que plus de 95% des femmes, chez qui ce diagnostic a été porté, peuvent être guéries. Les cancers canalaires peuvent infiltrer les tissus voisins et devenir des cancers infiltrants. 2) les carcinomes lobulaires *in situ* : ils se développent à partir de l'épithélium du lobule. L'image à la mammographie est peu caractéristique et le diagnostic est porté sur la biopsie. Le risque d'évolution en cancer invasif est estimé entre 20 et 30%. Un cancer devient invasif lorsqu'il franchit la membrane basale et acquiert ainsi le potentiel d'atteindre un vaisseau sanguin ou lymphatique qui permettra aux cellules malignes de coloniser d'autres organes et d'y générer de nouvelles tumeurs. Comme la plupart des cancers, le cancer du sein requiert de 6 à 10 ans pour passer de la première cellule cancéreuse "acceptée par l'organisme" à la tumeur de 2 cm de diamètre. L'extension "à distance" se fait plus particulièrement au niveau des os, des poumons et du foie. Ce processus métastatique est très variable et dépend à la fois des caractéristiques de la tumeur et des caractéristiques immunitaire de la patiente.

La classification moléculaire des adénocarcinomes du sein

L'émergence des analyses génomiques a donné naissance à une nouvelle classification des cancers du sein qui permet d'identifier 4 sous types.

Le type "luminal" A et B : Le terme luminal se rapporte au nom donné à un des deux types cellulaires du tissu mammaire normal. Ces tumeurs se développent à partir des cellules épithéliales des canaux ou des lobules. Ces tumeurs expriment les cytokératines (CK) 8/18. Dans plus de 10 % des cas, ces tumeurs sont associées à une mutation de p53. Ce sont les formes les plus fréquentes de cancers du sein et elles comprennent deux sous-groupes A et B selon que les cellules tumorales expriment le récepteur aux estrogènes (ER) fortement (luminal A, *25 à 40 % des cas)*, ou faiblement (luminal B, *20 à 25 % des cas*). Le type luminal B est moins bien différencié, plus proliférant, et de moins bon pronostic.

Le type Her2/neu $^{+}$: Environ 25 % des cancers du sein sur-expriment à leur surface le récepteur HER2/neu codant pour un récepteur de facteur de croissance tumorale. Activé, ce récepteur provoque la prolifération cellulaire ; sa surexpression dans les cancers du sein a longtemps été synonyme de mauvais pronostic jusqu'au début des années 2000 (Slamon *et al.,* 1987) avec l'apparition d'une thérapie ciblant le récepteur Her2/neu.

Le type basal-like : Le terme basal se rapporte à l'origine cellulaire de ce cancer. Ces tumeurs se développent à partir des cellules basales et représentent 10 à 15 % des cancers du sein. En pratique, ils se caractérisent par l'absence de récepteurs hormonaux (RH) (ER et progestérone (PgR)) et l'absence de surexpression d'Her2/neu et sont encore appelées « tumeurs triple négatives »(TN). Ils expriment les CK basales (CK5, CK14, CK15, CK17) (Gruvberger *et al.,* 2001; Perou *et al.,* 1999; Perou *et al.,* 2000; Sorlie *et al.,* 2001; van 't Veer *et al.,* 2002; West *et al.,* 2001), sur-expriment souvent EGF-R et c-Kit et présentent souvent une mutation de p53 ainsi qu'une faible expression du gène suppresseur de tumeur BRCA1 (BReast CAncer 1) et ce phénotype est commun aux porteurs de BRCA1 et aux tumeurs TN sporadiques (Turner *et al.,* 2004). Si tous les cancers de type basal-like sont TN, une certaine proportion de tumeurs TN n'appartient pas à la catégorie « basal-like ».

2.1.3. Les différents stades de cancer du sein

Lorsqu'un diagnostic de cancer est posé, il est important de réaliser un bilan initial de l'extension de la maladie. Celui-ci permet d'une part de décider quel sera le traitement le plus adapté, et servira d'autre part de repère pour la surveillance au fil du temps. Le principal critère est la taille de la tumeur, et l'atteinte ou non de la chaine ganglionnaire drainant le sein (sous et sus-claviculaires ou axillaires)(Figure 10) par des cellules cancéreuses, voire de la présence de métastases à distance.

Les caractéristiques de taille de la tumeur, de présence ou non d'une atteinte ganglionnaire ou de métastases, classées selon la classification **T.N.M**. (Tableau 2), peuvent être regroupées en un petit nombre de stades. Les stades sont exprimés par un chiffre allant de 0 (le moins avancé) à IV (le plus avancé.). Au stade IV, le cancer, sans considération de taille, a métastasé

dans des organes distants comme les os, les poumons, le foie ou les ganglions lymphatiques éloignés du sein.

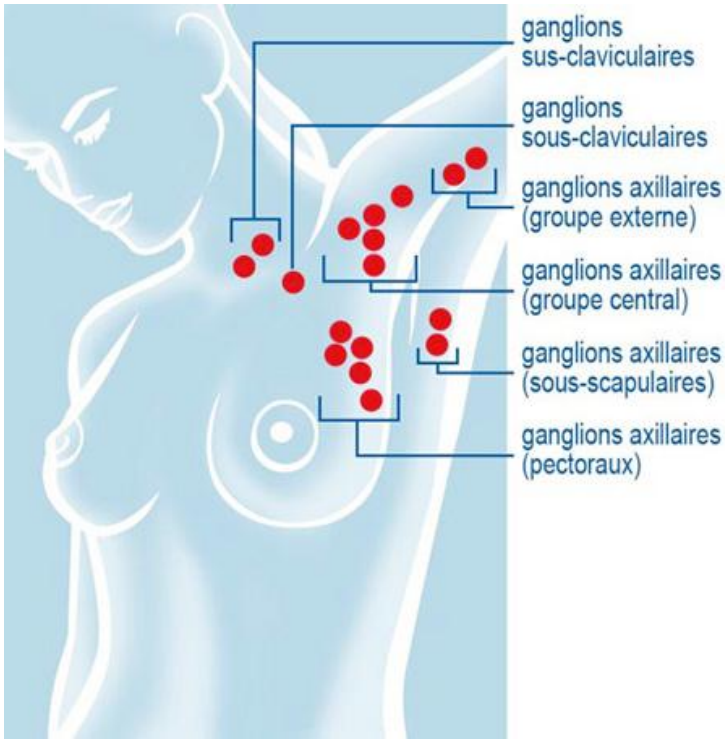


Figure 10 : localisation anatomique des ganglions lymphatiques qui drainent le sein.

Dimension de la tumeur **T**	T1	tumeur < 2 centimètres
	T2	dimension comprise entre 2 et 4 centimètres
	T3	tumeur > 4 centimètres
	T4	extension aux structures adjacentes (os, tissus mous du cou, muscles profonds de la langue)
Atteinte des ganglions **N**	N0	pas de signe d'atteinte ganglionnaire régionale
	N1	1 ganglion homolatéral < 3 centimètres
	N2	- 1 ganglion homolatéral de dimension 3 à 6 centimètres - ganglions homolatéraux, controlatéraux ou bilatéraux < 6 centimètres
	N3	ganglion(s) > 6 centimètres
Différenciation histologique **G**	G1	degré élevé de différenciation histologique
	G2	degré moyen de différenciation
	G3	degré faible ou absence de différenciation
	Gx	degré de différenciation non évaluable
Métastases **M**	M0	absence de métastases
	M1	présence de métastases

Tableau 2 : Classification TNM de l'Union internationale contre le cancer (UICC).

2.1.4. Les facteurs de risque

On distingue différents types de facteurs de risque :

- L'âge : Le vieillissement favorise l'apparition des cancers.
- Les caractéristiques propres à l'individu ou des comportements et habitudes de vie. Certains facteurs de risque ont été identifiés au plan collectif comme les premières règles précoces (avant 12 ans), ménopause tardive (après 55 ans), ou la consommation exagérée d'alcool, de sucres et de graisses d'origine animale.
- En revanche, le nombre de grossesses et l'allaitement prolongé pourraient diminuer le risque de développer un cancer du sein. Les études continuent pour mieux connaître ces facteurs et en identifier d'autres.
- Les facteurs familiaux : les formes familiales de cancer du sein, impliquant une prédisposition génétique, représentent 5 à 10% des cas. Les prédispositions génétiques constituent un groupe hétérogène. Parmi elles, les prédispositions transmises selon un mode monogénique sont à l'origine de 5 % des cancers du sein. Deux gènes répondant à un mode de transmission autosomique dominant ont été identifiés à ce jour : BRCA1 et BRCA2. Les altérations des gènes BRCA sont à l'origine de 65 % des cas familiaux comptant au moins quatre cas survenus avant l'âge de 60 ans et appartenant à la même branche parentale.

2.2. Le diagnostic

2.2.1. *Dépistage*

Le dépistage par un diagnostic précoce peut favoriser un traitement curatif à un stade moins avancé de la pathologie et ainsi améliorer à terme la survie globale. En France, le dépistage individuel et le dépistage de masse cohabitent. Le dépistage organisé du cancer du sein, mis en place dans le cadre du *Plan Cancer* depuis mars 2004, consiste en un examen clinique par le médecin généraliste ou le gynécologue, et une mammographie tous les 2 ans de 50 à 74 ans. Le taux de participation a progressé entre 2004 et 2008, passant de 40% à 52,5%, l'objectif étant de 70% au minimum pour que ce programme soit pleinement efficace. Chez les femmes à risque, le dépistage individuel peut débuter plus tôt, et être répété tous les ans avec des modalités et des objectifs différents du reste de la population. La découverte d'une tumeur mammaire se fait souvent par l'autopalpation qui conduit la patiente à consulter. En effet, les symptômes sont rares et le plus souvent liés à une tumeur inflammatoire (rougeur, chaleur) ou plus avancée ; il s'agira alors de symptômes liés aux localisations métastatiques comme des douleurs osseuses ou des troubles pulmonaires.

2.2.2. Diagnostic

L'examen clinique, méthodique et comparatif, recherche une asymétrie, une rétraction mamelonnaire ou aréolaire, un érythème, un œdème, un aspect de « peau d'orange », un écoulement mamelonnaire, un envahissement cutané ou une ulcération. La palpation recherche un nodule à mesurer et des adénopathies axillaires. L'examen radiologique clé est la mammographie. Elle est simple et rapide à réaliser et permet la détection de 80% des tumeurs.

Devant de telles images, un diagnostic histologique est nécessaire, par biopsie (micro-biopsie ou macro-biopsie selon l'image) si possible percutanée, effectuée par le radiologue et souvent radio ou écho-guidée. L'histologie permet d'évaluer un grade « histo-pronostique » : le grade SBR (Scarff-Bloom et Richardson) classé de I à III (Tableau 3) qui est établi en fonction de caractéristiques des cellules tumorales : forme et taille du noyau, différenciation cellulaire, nombre de mitoses. Elle renseigne également sur l'expression par les cellules tumorales des RH et la surexpression de l'oncogène Her2neu (25 % des cancers du sein) (révélé en immuno-histochimie (IHC) et/ou par une amplification du gène en FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridation) qui vont guider la stratégie thérapeutique en permettant l'utilisation de traitements ciblant ces molécules. L'étude histologique de la chaine ganglionnaire, prélevée lors de l'acte chirurgical (curage axillaire), pour rechercher un envahissement métastatique ganglionnaire fournit un renseignement pronostique majeur. L'ensemble de ces caractéristiques constitue les facteurs pronostiques clés et guide la stratégie thérapeutique.

Architecture
1. La tumeur comprend que des tubes 2. Partiellement tubulaires 3. La tumeur ne comprend aucun tube
Atypies cyto-nucléaires
1. Noyaux réguliers monomorphes 2. Atypies modérées 3. Noyaux pléomorphes avec atypies marquées
Nombre de mitoses
1. Si le nombre est de 1 ou 0 2. Si le nombre est de 2 3. Si le nombre est de 3 ou plus

Tableau 3 : Grade SBR histo-pronostique. Le grade « SBR » obtenu par l'addition de trois critères résumés dans le tableau ci-dessus. Ceci permet de déterminer le grade, à partir du score obtenu (Grade I : 3, 4, 5; Grade II : 6 et 7; Grade III : 8 et 9)

2.2.3. Suivi des patientes

Après traitement d'un cancer du sein, un suivi à vie est nécessaire quel que soit le type histologique de cancer du sein. Un suivi post-traitement sera en général assuré tous les 6 mois pendant les 5 premières années suivant la chirurgie, puis une fois par an à vie. Une mammographie annuelle sera également réalisée. Il s'agit là des recommandations officielles nationales françaises et internationales mais dans les faits, la fréquence des consultations dépend de la patiente qui ne se manifestera souvent qu'en cas de symptômes. Aucun autre examen n'est recommandé, leur impact sur la survie étant débattu.

2.3. Prise en charge thérapeutique

2.3.1. *Les traitements du cancer du sein primaire*

La prise en charge thérapeutique dans le cadre du cancer du sein primaire est relativement standardisée et fait l'objet de consensus internationaux (Carlson *et al.*, 2009; Eifel *et al.*, 2001) simplifié dans la Figure 11.

Le choix du traitement tient compte du type de cancer et de son stade d'évolution, de son statut RH, de son statut Her2/neu, de l'âge de la patiente, de son état de santé et de ses antécédents médicaux et chirurgicaux et bien entendu de l'avis de la patiente.

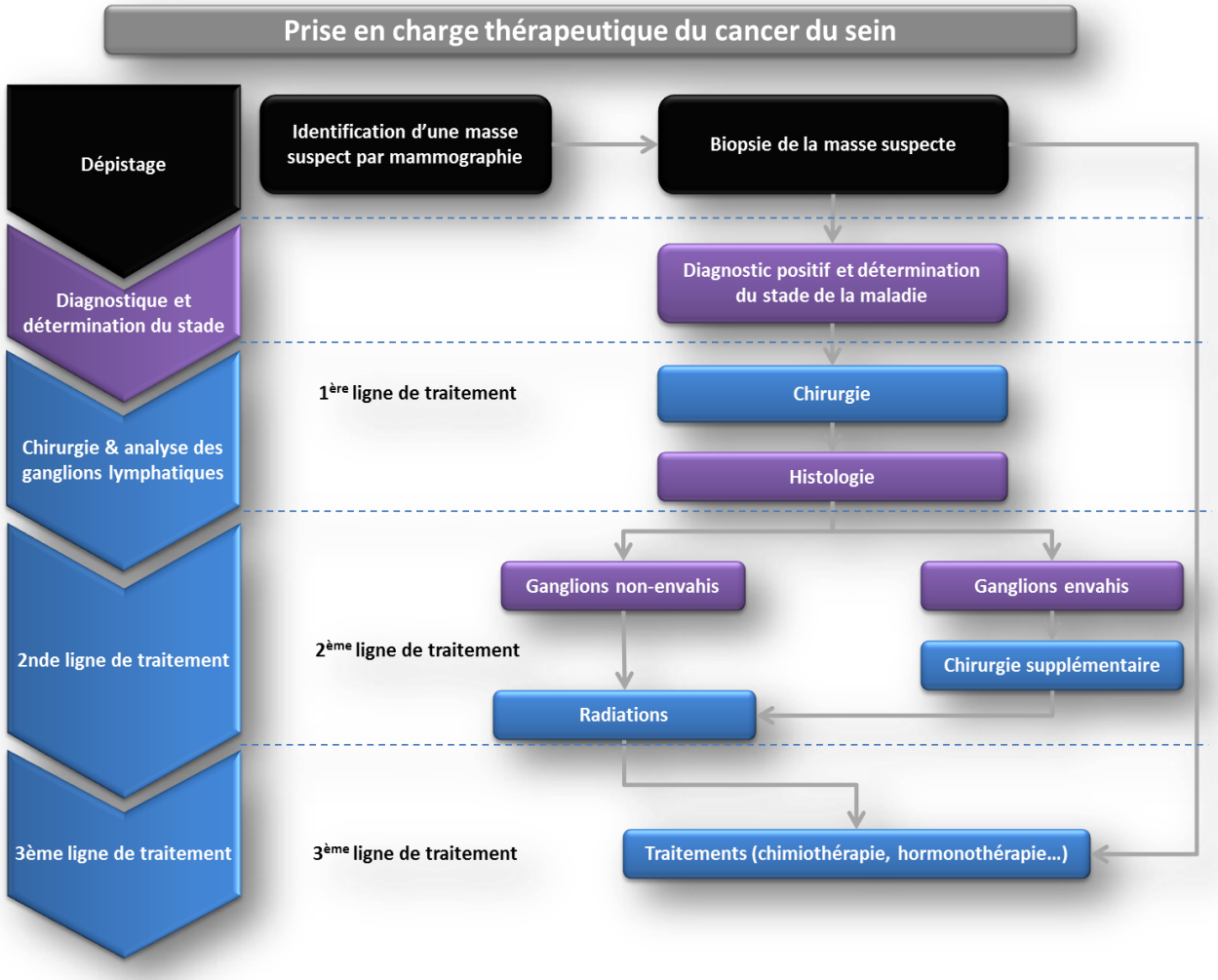


Figure 11 : schéma simplifié de la prise en charge thérapeutique du cancer du sein primaire.

Le premier traitement du cancer est la tumorectomie avec curage axillaire en principe décidée lorsque la tumeur mesure moins de 3cm. Si la tumeur dépasse 3cm, selon les cas soit une mastectomie est pratiquée, avec curage axillaire soit une chimiothérapie néo-adjuvante est prescrite afin de réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie. Une radiothérapie post-opératoire peut être utilisée en complément de la chirurgie. La chimiothérapie adjuvante (réalisée après la chirurgie) permet de réduire le risque relatif de rechute lié à la présence de micro métastases. L'hormonothérapie adjuvante est le traitement de référence pour les patientes dont les tumeurs expriment les RH et sont dites "hormono-dépendantes". Les anti-œstrogènes qui bloquent les récepteurs œstrogéniques permettent d'inhiber, pendant de longues périodes, la croissance des cellules tumorales. Les anti-aromatases en inhibant la transformation des androgènes en œstrogènes tendent actuellement à remplacer ces anti-œstrogènes. Pour les patientes dont la tumeur n'exprime pas les RH et ne peuvent donc bénéficier des stratégies précédentes, la chimiothérapie adjuvante (Tableau 4) ou les thérapies ciblées font partie de l'arsenal thérapeutique avec en particulier pour les patientes surexprimant Her2/neu, l'anticorps monoclonal (AcM) anti-Her2 (Trastuzumab=Herceptin®)) qui bloque la partie extracellulaire du récepteur transmembranaire du facteur de croissance HER2/neu ou le Lapatinib, petite molécule thérapeutique qui inhibe l'activité tyrosine kinase de Her2/neu.

Nous verrons plus loin dans ce manuscrit la notion d'immunothérapie, une stratégie thérapeutique ciblant le SI afin de permettre à celui-ci d'établir une réponse immunitaire anti tumorale efficace.

cyclophosphamide
methotrexate
5-fluorouracil (CMF)
Traitements à base d'anthracyclines • AC (doxorubicin plus cyclophosphamide) • CAF ou FAC (cyclophosphamide, doxorubicin, 5-FU) • FEC (5-FU, epirubicin, cyclophosphamide) • AC suivi par paclitaxel • FEC suivi par docetaxel • Doxorubicin, suivi par CMF • TAC (docetaxel plus doxorubicin and cyclophosphamide)

Tableau 4 : chimiothérapies adjuvantes les plus communément utilisées dans le cancer du sein.

2.3.2. Prise en charge des patientes métastatiques

Tout comme les stratégies thérapeutiques adjuvantes et néo-adjuvantes qui ont fait l'objet de consensus internationaux, il existe des directives internationales pour la prise en charge du cancer du sein en situation métastatique (Beslija *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2009; Pagani *et al.*, 2010). Le cancer du sein métastatique reste une maladie incurable et l'objectif de la prise en charge de ces patientes est avant tout l'amélioration du ratio qualité/durée de vie et la

prévention des symptômes. Le choix du moment et de la durée du traitement doit se faire en fonction des caractéristiques de la maladie et de la patiente. Le choix du traitement est guidé par le statut RH et le statut HER-2/neu de la tumeur primaire ou des métastases, l'intervalle libre entre la tumeur initiale et la rechute, la localisation des métastases (viscérales ou non), la précédente ligne de traitement et sa tolérance, les symptômes de la patiente, ses préférences, les effets secondaires prévisibles et enfin la disponibilité des traitements en fonction des protocoles ouverts (Beslija *et al.*, 2007; Beslija *et al.*, 2009).

Le traitement du cancer du sein métastatique comprend l'hormonothérapie, la chimiothérapie cytotoxique, le traitement ciblé non endocrinien, les bi-phosphonates et les anti-angiogéniques mais cette pathologie reste un véritable challenge et les opinions divergent. Il est probable qu'une approche agressive avec une poly-chimiothérapie voire une chimiothérapie à haute dose avec greffe de cellules souches périphériques soit potentiellement bénéfique pour un sous-groupe de patientes, mais il n'est actuellement pas possible de les identifier suffisamment précisément pour le prouver. De ce fait, on peut considérer qu'une approche peu agressive basée sur l'utilisation de mono-chimiothérapies successives reste une option très raisonnable pour traiter une patiente présentant un cancer du sein métastatique. Le risque étant de sous-traiter si la patiente avait fait partie de la minorité qui aurait bénéficié d'un traitement plus agressif (Bachelot *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2002).

D'autre part, les anti-angiogéniques constituent une nouvelle catégorie de traitement. Ce sont des agents qui ne ciblent pas directement les cellules tumorales mais qui empêchent le développement de vaisseaux sanguins (angiogénèse) nécessaires à l'apport en oxygène mais aussi en nutriments au sein de la zone tumorale. En France, le bevacizumab (Avastin) est indiqué dans certains cas de cancer du sein métastatique car il a permis démontré un bénéfice sur la survie sans progression (SSP). Il n'a cependant pas pu démontrer son efficacité sur l'espérance de vie globale.

2.4. Diagnostics moléculaires émergeants et théranostic

Les cancers en général et le cancer du sein en particulier, ne forment pas une seule et unique pathologie homogène mais bien plusieurs sous-catégories de pathologies dont la caractérisation reste incomplète. Ces catégories sont définies par des bio-marqueurs dont l'objectif est de permettre l'orientation thérapeutique la plus efficace, en évitant par exemple les chimiothérapies qui ne seraient pas nécessaires ou en identifiant le marqueur d'une thérapie ciblée dont pourrait bénéficier la patiente. Malgré le panel d'outils prédictifs et pronostiques à la disposition des cliniciens, une meilleure classification est nécessaire pour adapter le traitement à la patiente.

Il est possible de distinguer différentes catégories de bio-marqueurs :

2.4.1. *Marqueurs spécifiques permettant le ciblage thérapeutique*

L'expression des marqueurs spécifiques de la pathologie permettent d'orienter la stratégie thérapeutique. L'exemple le plus probant dans le cancer du sein est la surexpression du bio-marqueur Her2/neu qui permet de déterminer les tumeurs susceptibles de répondre à une thérapie anti-Her2. A l'opposé, les cancers du sein dits TN ne pouvant bénéficier d'une hormonothérapie ou des thérapies ciblant Her2/neu ou ER/PgR représentent une sous-catégorie de mauvais pronostic. .

2.4.2. Bio-marqueurs d'agressivité

Dans le domaine du cancer du sein, un certain nombre de marqueurs sont soit utilisés, soit en cours d'investigation pour leur caractère extrêmement prometteurs. Suite à la validation de leur valeur pronostique/diagnostique lors d'étude cliniques de niveau d'évidence I (essai clinique prospectif randomisé à forte puissance statistique conçu spécifiquement pour tester le marqueur ou méta analyse d'études bien conçues) les marqueurs de sévérité suivants sont recommandés par l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) pour leur valeur pronostique : CA 15-3, CA 27.29, l'Ag carcino-embryonnaire (CEA), les RH (ER et PgR), le récepteur HER2/neu, l'activateur du Plasminogène de type urokinase (uPA), et l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1). D'autres marqueurs sont en cours d'évaluation, et même s'ils ne sont pas utilisés par manque de données cliniques, les premiers résultats en font des candidats très intéressants. Parmi ces marqueurs on peut mettre en avant le statut mutationnel de p53, la cycline E (taux déterminé par IHC ou PCR), la recherche de micro-métastases dans la moelle osseuse, ou de cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang des patientes (pour revue (Harris *et al.*, 2007)).

Alors que pour la plupart, ces bio-marqueurs sont mis en évidence par une approche classique, de nouveaux tests de biologie moléculaire multi-paramétrique semblent très prometteurs. Leur mise en œuvre et leur interprétation est complexe mais l'apport informationnel pourrait s'avérer à la hauteur des attentes. Les tests de profil d'expression de gènes ont été introduits dans la littérature clinique au cours de ces 15 dernières années car les données issues de la recherche suggère que l'évaluation de l'expression simultanée de plusieurs gènes dans un échantillon tumoral pourrait fournir des informations utiles sur le comportement de la tumeur (Sorlie *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002). Ces signatures moléculaires pourraient améliorer le diagnostic, prédire une rechute et orienter la sélection thérapeutique des patientes.

La classification moléculaire a permis d'identifier des sous-types de cancer du sein décrits §2.1.2, ayant une réalité clinique. A l'heure actuelle, ces signatures moléculaires sont encore en cours d'évaluation et de définition. Plusieurs essais cliniques ont été élaborés pour ségréger les patientes en fonction de leur statut moléculaire afin de valider l'hypothèse selon laquelle différents groupes de tumeurs pourraient être plus homogènes et que les approches thérapeutiques devraient prendre en considération ces groupes plutôt que d'utiliser la même

stratégie pour traiter toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein indépendamment des caractéristiques intrinsèques de la tumeur.

Parmi les stratégies d'analyses commercialisées, on retrouve :

Le test MammaPrint (cancer primaire)
Mammaprint est une plateforme d'analyse d'expression de gènes. Le test est réalisé sur un échantillon de tissu frais composé d'un minimum de 30% de cellules malignes stocké dans un tampon de conservation. Les tumeurs primaires de 117 patientes sans invasion ganglionnaire ont été analysées par micro-array. Les données ont été soumises à une classification supervisée pour établir un profil d'expression d'ARN de 70 gènes qui corrèlent avec l'apparition, à relativement court terme (< 5 ans), de métastases (van 't Veer *et al.*, 2002). Cette signature est composée de gènes de régulation, de gènes impliqués dans l'invasion, la métastase et l'angiogénèse et permettrait d'apporter une information pronostique non redondante avec les facteurs de risque cliniques et histologiques.

Le test Oncotype DX assay (Genomic Health Inc, Redwood City, CA) (cancer primaire)
Le test Oncotype DX est un test de RT-PCR qui mesure l'expression de 21 gènes (16 gènes impliqués dans le cancer du sein et 5 gènes de référence) à partir d'ARN. Le niveau d'expression des 21 gènes est analysé par un algorithme mathématique afin de calculer un score de récurrence (risque de rechute) appelé RS qui est ensuite utilisé pour classer les patientes dans un des 3 groupes en fonction du risque d'apparition de métastases : faible, moyen, élevé (Cronin *et al.*, 2004; Dowsett *et al.*, 2010). Parmi les patientes nouvellement diagnostiquées sans invasion ganglionnaire avec un cancer du sein ER^+, le test Oncotype DX permet de prédire le risque de récurrence chez les patientes traitées par tamoxifène, un traitement utilisé en hormonothérapie. Le test Oncotype DX pourrait également être utilisé pour identifier les patientes à pronostic défavorable pour leur proposer une chimiothérapie adjuvante.

Le test CellSearch (cancer métastatique)
Les CTC sont des cellules tumorales présentes dans le sang qui possèdent des caractéristiques antigéniques ou génétiques d'un type tumoral spécifique. Ces cellules peuvent être identifiées par plusieurs approches. Après une étape de sélection positive, les cellules isolées sont caractérisées par IHC ou par la recherche de l'expression de cytokératines ou de TAA. Le test de détection de CTC CellSearch a été autorisé par la FDA pour une application dans le cancer du sein métastatique. Deux études de Cristofanilli et coll. montrent que les patientes CTC positives présentent une survie globale (SG) ainsi qu'une survie sans progression (SSP) inférieures aux patientes CTC négatives (Cristofanilli *et al.*, 2004; Cristofanilli *et al.*, 2005). En plus de sa valeur pronostique, ce test permet de prédire la réponse à l'hormonothérapie ou la chimiothérapie, la présence de CTC étant corrélée à l'absence de réponse au traitement (Hayes *et al.*, 2006).

2.4.3. Bio-marqueurs associés à l'Hôte

L'état de santé global des patientes, estimé sur la base du taux d'hémoglobine et de polynucléaires neutrophiles (PNN), peut guider le choix de la thérapie ainsi que son intensité. En effet, la neutropénie (taux de PNN <7.5 Giga/L) est considérée comme un facteur de risque infectieux qui nécessite l'administration préventive de facteurs de croissance (G-CSF) pour stimuler la prolifération des PNN et réduire le risque d'infection et/ou de sepsis grave lié à la chimiothérapie. Les neutropénies fébriles peuvent conduire à des reports de cure ou des réductions d'intensité de la dose de chimiothérapie. Des données issues de la recherche clinique et plus particulièrement de notre équipe (Borg *et al.*, 2004) démontrent l'impact pronostic défavorable de la forte réduction du nombre absolu de lymphocytes circulants (< 1 Giga/L) avec un risque accru de décès précoces et de toxicité des chimiothérapies.

2.4.4. Les bio-marqueurs permettent-ils de faire des économies de coût de santé ?

Une analyse du rapport coût/bénéfice patient appliquant un modèle analytique décisionnel de Markov a été utilisée pour prédire la survie globale, les coûts et le rapport coût/efficacité de l'utilisation du test Oncotype DX en pratique clinique (Hornberger *et al.*, 2005). Lors de cette étude clinique sur 668 patients, la classification déterminée par le test Oncotype DX a été comparée à la classification selon les directives cliniques du NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (Carlson *et al.*, 2006). Les résultats de cette étude suggèrent que l'utilisation du test Oncotype DX aurait permis une augmentation moyenne de survie ajustée par la qualité de vie (Glasziou *et al.*, 1990) de 8.6 années et une réduction du coût global de 202 828$.

Cette estimation suggère le potentiel de tels marqueurs sur la santé publique d'une part mais surtout sur le bénéfice qu'en tireraient les patientes, bien que l'identification et la validation de bio-marqueurs, qui font partie intégrante du développement de compagnon diagnostic et le développement d'un test diagnostic commercial, soient longs et présentent un faible taux de succès.

La médecine personnalisée permet d'avoir une meilleure compréhension de l'hétérogénéité de la pathologie et l'innovation technologique est perçue comme le futur de la médecine, particulièrement dans le domaine de l'oncologie.

3. Partie III : Immunité et cancer

3.1. Le concept d'Imuno-editing tumoral

Le SI intervient dans la prévention des tumeurs selon trois mécanismes. Premièrement, il protège l'hôte contre les tumeurs viro-induites en luttant contre les infections virales (ex : le cancer du col de l'utérus, de la tête et du cou, induits par le papillomavirus ; les carcinomes hépatiques induits par les virus de l'hépatite B ou C). Deuxièmement, il élimine les organismes pathogènes, et permet la résolution rapide des phénomènes inflammatoires qui pourraient favoriser la tumorigénèse. Enfin, il identifie et détruit les cellules tumorales, en reconnaissant des Ag ou des molécules spécifiques induites, ré-exprimées ou sur-exprimées lors de la transformation tumorale. Le SI est capable de détecter les états pré-cancéreux ou cancéreux, et de les détruire avant qu'ils ne deviennent dangereux. Ce phénomène est appelé immuno-surveillance anti-tumorale (Zitvogel *et al.*, 2006). Cependant, malgré cette surveillance opérée par le SI, certaines cellules tumorales peuvent se développer et former une tumeur. Le concept d'immuno-surveillance a alors été repensé, intégrant la théorie de l'immuno-editing. Cette théorie définit les relations entre cellules transformées et SI selon trois phases : l'élimination, l'équilibre, et l'échappement. La phase d'élimination est la phase décrite par la théorie de l'immuno-surveillance, au cours de laquelle les cellules en cours de transformation sont reconnues et détruites par le SI. Si certaines de ces cellules ne sont pas détruites, elles peuvent persister, et progresser dans les phénomènes d'oncogénèse au cours d'une phase appelée phase d'équilibre. Le SI exerce au cours de cette phase une pression de sélection qui va permettre d'éliminer les cellules sensibles mais cette phase se traduit par la sélection de cellules tumorales capables d'éviter ou de résister à l'attaque du SI, voire même d'induire une immuno-suppression conduisant à la phase d'échappement. Le SI devient alors incapable de contrôler la croissance tumorale. Cette théorie est soutenue par de nombreuses constatations expérimentales chez la souris, mais également chez l'homme. Dunn et coll. ont été les premiers à proposer en 2004 que l'immuno-editing pouvait être la 7ème caractéristique associée au développement d'une tumeur (Dunn *et al.*, 2004).

3.1.1. *Evidence de l'immuno-surveillance*

Dans les années 90 Dighe et coll. ont observé que les tumeurs transplantées chez des souris traitées avec un Ac monoclonal spécifique de l'IFN-γ progressaient plus rapidement (Dighe *et al.*, 1994) et que les souris immuno-déficientes qui ne répondaient pas à l'IFN-γ (IFNGR1$^{-/-}$, une composante du récepteur à l'IFN-γ) ou qui présentaient un compartiment cellulaire T déficient étaient plus sensibles à la formation de sarcomes induits par le méthylcholanthrène (MCA) (Engel *et al.*, 1996; Engel *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1998). Les souris immuno-déficientes qui ne possèdent pas le gène RAG-2 (conduisant à l'absence de LT, LB, et NKT) développent plus de tumeurs spontanées et sont plus sensibles aux carcinomes induits par le MCA comparé aux souris sauvages. De plus, ~40% des sarcomes induits par le MCA issus de souris immuno-déficientes RAG2$^{-/-}$ sont rejetées lorsque elles sont transplantées chez des souris sauvages, alors que tous les sarcomes issus de souris sauvages immuno-compétentes progressent lorsqu'elles sont transplantées chez des souris sauvages « naïves » (Shankaran *et al.*, 2001). Les tumeurs formées en l'absence de contraintes liées au SI sont plus

immunogéniques que les tumeurs issues d'hôtes immuno-compétents. Ces résultats montrent que le SI en plus de protéger l'hôte de la formation de tumeurs modifie l'immunogénicité de la tumeur. Ces données sont à l'origine de l'affinement du concept d'immuno-surveillance et ont conduit à l'hypothèse de « l'immuno-editing ».

Mise en évidence du concept « d'immuno-editing » chez l'Homme.

Plusieurs études cliniques ont démontré que les concepts « d'immuno-editing » mis en évidence chez la souris étaient applicables à l'Homme. Une augmentation de la fréquence des cancers est observée chez les patients immunodéprimés atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Boshoff et Weiss, 2002). Bien que la plupart de ces cancers soient d'origine virale, il existe également des cancers d'origine non virale, particulièrement chez les patients atteints d'adénocarcinomes du poumon (Chaturvedi *et al.*, 2007). Malgré les facteurs confondants, notamment chez les fumeurs, l'association entre SIDA et cancer du poumon a été démontrée comme indépendante de la consommation de cigarettes (Kirk *et al.*, 2007), avec un risque 3.5 fois plus élevé d'avoir un cancer du poumon pour les patients atteints du SIDA. D'autre part, un certain degré d'immuno-déficience peut être induit chez l'Homme à l'aide de molécules immunosuppressives suite à une transplantation. Une augmentation de l'incidence des cancers chez ces patients suggère un rôle de l'immuno-surveillance chez l'Homme. Les patients qui reçoivent une greffe du rein présentent une augmentation de l'incidence des cancers 3 fois supérieure au reste de la population. Bien que les cancers induits par des virus prédominent, ces patients présentent également un risque accru de développer un cancer non infectieux au niveau de sites tels que le colon, le poumon, le pancréas, le rein et le système endocrinien (Vajdic *et al.*, 2006). De plus, une augmentation importante du risque de cancers de la peau (200 fois plus important), hors mélanomes, a été démontré chez les patients ayant reçu une greffe de rein, suggérant un rôle particulièrement important de l'immuno-surveillance aux sites exposés aux UV (Ultraviolet) (Moloney *et al.*, 2006).

Valeur pronostique de l'infiltration lymphocytaire des tumeurs

L'infiltration des tumeurs par les populations lymphocytaires T, NK ou NKT est souvent associée à un meilleur pronostic dans un certain nombre de pathologies cancéreuses (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996; Scanlan *et al.*, 2004). Si les premières études ont été réalisées sans distinction des sous populations lymphocytaires (Zhang *et al.*, 2003), il s'est vite avéré que chaque sous population pouvait jouer un rôle différent dans la réponse anti tumorale. La présence de LT $CD8^+$ cytotoxiques est souvent associée à un meilleur pronostic. Chez les patients atteints de mélanome, la présence d'un fort infiltrat lymphocytaire dans la tumeur est associée à un meilleur taux de réponse aux immunothérapies (Haanen *et al.*, 2006). Dans le cancer du côlon et dans le cancer du sein, un infiltrat de LT $CD8^+$ est associé à un bon pronostic (Galon *et al.*, 2006; Mahmoud *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a récemment été démontré que la présence de ces LT $CD8^+$ pouvait être corrélée à la réponse aux chimiothérapies cytotoxiques anthracycline / taxane (Denkert *et al.*, 2010), soulignant ainsi le rôle majeur du SI dans la réponse au traitement.

Importance de la réponse immune dans la réponse clinique aux chimiothérapies

Contre toute attente, certaines chimiothérapies peuvent avoir des effets secondaires bénéfiques sur la réponse immune anti tumorale (Figure 12). Le rôle du SI dans la réponse aux chimiothérapies a été mis en évidence pour la première fois à partir de cellules clonales de thymome EL4 relativement résistantes aux anthracyclines (doxorubicine) *in vitro* et qui devenaient sensibles à la doxorubicine une fois transplantées dans une souris immunocompétente C57BL/6. L'efficacité thérapeutique dépend des splénocytes, suggérant que l'immunité pourrait être indispensable aux effets anti tumoraux des anthracyclines (Maccubbin *et al.*, 1992). Les travaux de Zitvogel, Kroemer et coll. (Zitvogel *et al.*, 2008) ont démontré que la mort cellulaire induite par la chimiothérapie pouvait induire une réponse immunitaire qui est fonction du type de cascade biochimique de mort cellulaire induite par le traitement. A la suite d'un traitement par anthracyclines, la calréticuline transportée à la surface des cellules tumorales favorise une augmentation de la phagocytose des cellules tumorales par les DC (Obeid *et al.*, 2007). De plus, les tumeurs traitées par anthracyclines relarguent une protéine de type alarmine (HMGB1) et de l'ATP induisant la stimulation de, respectivement, TLR4 et l'inflammasome NLRP3 (Apetoh *et al.*, 2007; Ghiringhelli *et al.*, 2009). **Ces données montrent clairement que les agents de chimiothérapie peuvent avoir un effet bénéfique sur la réponse immunitaire anti-tumorale et impliquent qu'au moins une partie de l'effet clinique des chimiothérapies dépend de la fonctionnalité du système immunitaire.** Ceci est soutenu par les observations selon lesquelles les patients atteint de cancer colorectal et présentant un polymorphisme de TLR4 (Asp299Asp et Asp299Gly ou Gly299Gly allèles) avec perte de fonction (Tesniere *et al.*, 2009) ont une SSP et une SG réduites en réponse à l'oxaliplatine comparé aux patients porteurs de l'allèle TLR4 sauvage. Des données similaires associées au polymorphisme de TLR4 (Apetoh *et al.*, 2007) ou de P2X7 récepteur (Ghiringhelli *et al.* 2009) ont été observées chez les patientes atteintes de cancer du sein traitées par anthracyclines. Tout comme certains agents de chimiothérapie, l'effet thérapeutique de certaines nouvelles thérapies ciblées semblent dépendre du SI. En effet, la présence de LT $CD4^+$ est nécessaire pour obtenir une efficacité thérapeutique complète de l'imatinib (Gleevec; Novartis) contre les cellules tumorales dépendantes de l'oncogène *myc* dans les leucémies (Rakhra *et al.*, 2010). Une étude récente montre que les LT sont indispensables à l'effet anti-tumoral induit par l'imatinib dans les GIST (tumeur mésenchymateuse gastro-intestinale) (Balachandran *et al.*, 2011) et qu'une combinaison avec une autre immunothérapie telle que le traitement par l'AcM anti-CTLA-4 produit un effet synergique soulignant le rôle du SI. L'imatinib active les LT $CD8^+$ et induit l'apoptose des Treg au sein de la tumeur en réduisant l'expression par les cellules tumorales de l'enzyme immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygenase (Ido). Les thérapies ciblant les récepteurs à tyrosine kinase peuvent également induire une réponse immunitaire, ainsi le Sunitinib induit une réversion de l'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral des patients atteints de cancer du rein métastatique et est corrélé à une amélioration de leur survie globale (Adotevi *et al.*, 2010).

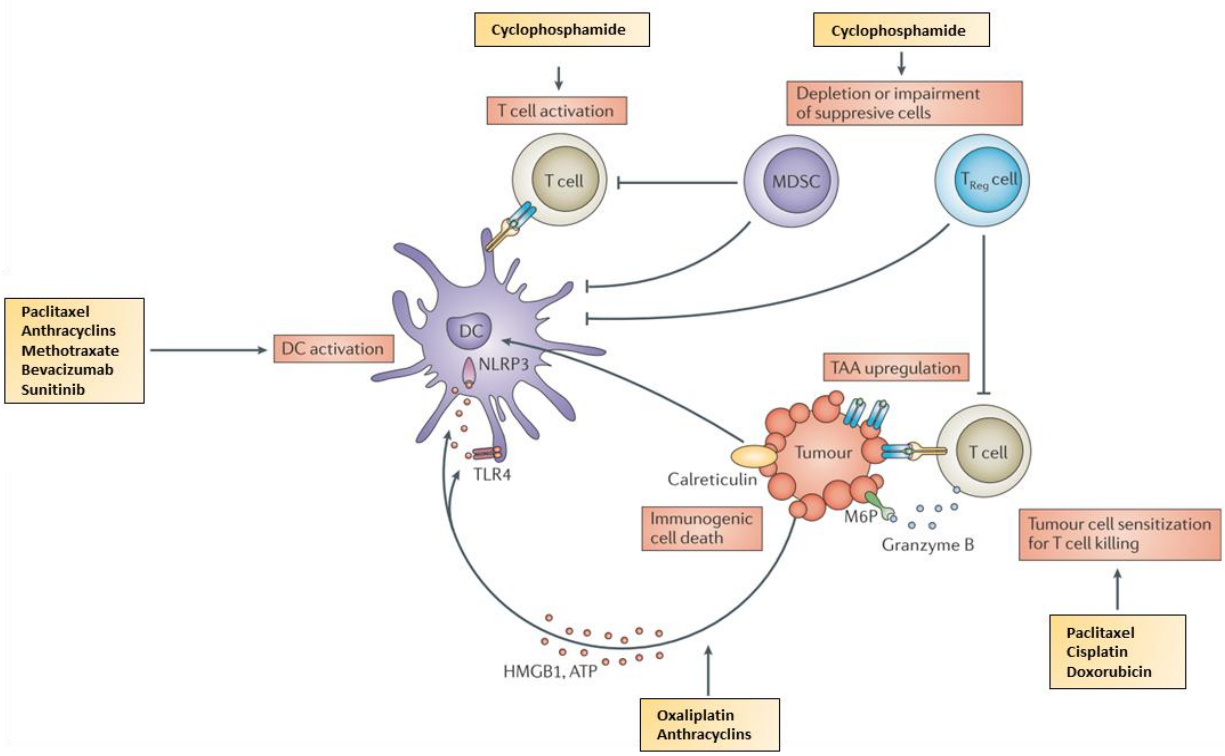


Figure 12 : Exemple de chimiothérapies cytotoxiques et de thérapies ciblées ayant un effet positif sur le système immunitaire (illustration adaptée de Joost Lesterhuis & al. Nat Rev Drug Discovery 2011)

3.1.2. Evidence de l'échappement à l'immuno-surveillance

La phase d'échappement représente l'échec du SI face aux cellules malignes qui vont survivre et proliférer pour former une tumeur. Les cellules cancéreuses subissant des changements stochastiques génétiques et épigénétiques qui génèrent des modifications essentielles nécessaires pour contourner à la fois les défenses innées et adaptatives. De plus, le SI contribue à la progression tumorale en sélectionnant les variants les plus agressifs et en supprimant la réponse immunitaire anti-tumorale *via* les Treg notamment. L'interaction entre une population hétérogène de cellules cancéreuses soumises à des modifications génétiques rapides et à une pression constante du SI entraine un processus de sélection selon Darwin pour la survie du variant le plus adapté et le plus capable de former un cancer chez l'hôte immuno-compétent.

Au cours de ce processus d'échappement deux mécanismes se mettent en place de façon complémentaire. Les cellules tumorales, suite à la pression de sélection, perdent l'expression des TAA qui permettent leur reconnaissance par le SI : c'est ce que l'on appelle l'immuno-editing. En parallèle, la tumeur développe un ensemble de mécanismes pour inhiber ou contourner la réponse immune anti-tumorale : c'est le processus d'immuno-subversion. Les exemples cités ci-après développent certains de ces mécanismes identifiés chez l'Homme.

Rôle des Treg dans l'échappement à la réponse immune

Parmi les LT, les Treg $CD4^+CD25^{high}$ exprimant FOXP3 constituent une sous population lymphocytaire aux propriétés immuno-suppressives. Plusieurs études fournissent des preuves solides d'un rôle des Treg dans le mécanisme d'immuno-suppression (Curiel *et al.*, 2004; Ghiringhelli *et al.*, 2005; Viguier *et al.*, 2004). Dans le cancer du sein, les Treg sont recrutés de manière active dans les infiltrats lymphocytaires où ils sont activés et vont proliférer localement inhibant la réponse immune (Faget *et al.*, 2011; Gobert *et al.*, 2009), participant ainsi au mécanisme d'échappement de la tumeur et donc à la progression tumorale. Néanmoins, la valeur pronostique des Treg reste controversée et varie en fonction du type tumoral : la présence de Treg dans l'environnement tumoral a été associée à un impact favorable (Badoual *et al.*, 2006; Carreras *et al.*, 2006; Salama *et al.*, 2009), négatif (Bates *et al.*, 2006; Curiel *et al.*, 2004) ou pas d'effet du tout sur la SG des patients. Dans le lymphome et le cancer tête et cou, l'effet bénéfique des Treg pourrait s'expliquer par leur rôle inhibiteur sur la réponse inflammatoire qui peut être pro-tumorale. Dans les pathologies malignes hématologiques, l'impact favorable des Treg peut s'expliquer par leur effet inhibiteur direct sur les lymphocytes B. La localisation des Treg au sein de la tumeur (Gobert *et al.*, 2009) ainsi que le stade de la pathologie (Badoual *et al.*, 2009) pourrait être importante pour définir la valeur pronostique des Treg. Plus qu'une population en particulier, il semble que ce soit la proportion de certaines populations lymphocytaires qui détermine le type de réponse. Des études rétrospectives dans le cancer du sein ont révélé que l'augmentation de Treg ainsi qu'un ratio CD4/CD8 élevé dans la tumeur primaire ou dans les ganglions lymphatiques corrèle avec le grade tumoral, le stade, et la survie globale des patients (Bates *et al.*, 2006). Il s'agit encore une fois d'un équilibre fragile.

Altération des DC et de leur fonction

Les DC sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative et ont un rôle primordial dans la présentation des Ag aux LT. Il existe deux classes principales de DC, les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les mDC ou DC conventionnelles sont composés de populations hétérogènes qui sont spécialisées dans la mise en place, *via* la production de fortes quantités d'IL-12, d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire (Caux *et al.*, 1997; Dubois *et al.*, 1998; Klechevsky *et al.*, 2008; Schmitt *et al.*, 2009). Les mDC incluent une sous population qui cross présentent les Ag aux LT $CD8^+$ et favorise leur activation (Klechevsky *et al.*, 2010; Klechevsky *et al.*, 2008). Les pDC présentent la particularité de produire très rapidement de grandes quantités d'interférons (IFN) de classe I après reconnaissance *via* des récepteurs endosomaux particuliers (TLR 7 et 9) et acquièrent les compétences de CPAg après maturation. La présence de pDC, mais pas de mDC dans l'environnement tumoral est associée à un pronostic défavorable dans le cancer du sein (Treilleux *et al.*, 2004) mais aussi de l'ovaire (Labidi-Galy *et al.*, 2011) et dans le mélanome (Jensen *et al.*, 2011) et le cancer tête et cou (Hartmann 2004) suggérant leur contribution à l'immunosuppression associée au cancer. D'un point de vue mécanistique, il semblerait que le blocage par l'environnement tumoral de la capacité des Ta-pDC à sécréter de l'IFNα localement pourrait jouer un rôle majeur dans la progression *via* l'induction d'une tolérance immunitaire et l'induction de la prolifération de Treg (Labidi-Galy *et al.*, 2011). Dans le cancer du sein métastatique, il a récemment été suggéré que la présence de métastases dans les ganglions sentinelles serait

corrélée à un arrêt de la maturation des DC, une diminution de l'interaction entre DC matures et LT cytotoxiques, et une augmentation du nombre de Treg par rapport à des ganglions sentinelles sans métastases (Mansfield *et al.*, 2011).

Macrophages infiltrant la tumeur

Les macrophages, recrutés de la périphérie vers les zones tumorales suite à la production par ces dernières de CSF-1 favorisent d'une part la croissance tumorale comme l'a montré l'équipe de L. Coussens (DeNardo *et al.*, 2009; Qian et Pollard; Wyckoff *et al.*, 2007)) dans un modèle murin de cancer du sein où les macrophages intra-tumoraux (TAM) après activation par l'IL-4 et L'IL-13 (sécrétés par les $CD4^+$ de type Th2) vont produire de l'EGF qui va activer la prolifération des cellules tumorales. D'autre part ces TAM sécrètent du VEGF qui va permettre la génération de néo-vaisseaux perméables (Leek *et al.*, 2000), du TGF-β qui favorise la transition épithélio mésenchymateuse (Walsh et Damjanovski, 2011) et des enzymes dégradant la matrice telles que les métallo-protéinases et des protéases cathepsine cystéine (Joyce et Pollard, 2009; Kessenbrock *et al.*, 2010; Mohamed et Sloane, 2006; Palermo et Joyce, 2008), l'ensemble de ces phénomènes se complémentant pour favoriser l'invasion locale et le développement de métastases à distance (Kessenbrock *et al.*, 2010).

Résumé

De nombreux exemples confirment l'existence chez l'homme des phénomènes d'immuno-surveillance des tumeurs, démontrant le rôle capital du SI dans le contrôle du développement des cellules tumorales et dans la sélection de clones faiblement immunogènes. La réponse immunitaire adaptative qui prend place dans l'environnement de la tumeur apparaît comme un facteur pronostique important. Peut-être qu'une combinaison des paramètres immuns incluant la nature, la densité, l'orientation fonctionnelle, et la localisation des cellules immunitaires à l'intérieur de la tumeur sera essentiel pour définir précisément l'impact de la réaction immunitaire locale dans le cancer du sein. Un des enjeux, à travers la compréhension de ces phénomènes, sera de rétablir une immunité anti-tumorale efficace.

3.2. Lymphopénies et immuno-reconstitution

3.2.1. Les populations lymphocytaires circulantes

Dans la circulation sanguine, la lymphopénie a été identifiée pour la première fois comme un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de lymphome Hodgkinien avancé (Hancock *et al.*, 1982; Hasenclever et Diehl, 1998). Dans une série rassemblant plus de 3000 patients, notre groupe a montré l'existence d'une lymphopénie chez 20-25% des patients avec un cancer avancé, dont 20% de patientes avec un cancer du sein métastatique en première rechute non traité (Blay *et al.*, 1996; Blay *et al.*, 1998; Borg *et al.*, 2004; Marec-Berard *et al.*, 2003; Ray-Coquard *et al.*, 2003; Ray-Coquard *et al.*, 1999). Tous les compartiments sont affectés dont les LT $CD4^+$ et $CD8^+$, les NK $CD56^+$, et les LB $CD19^+$ (Borg *et al.*, 2004). L'analyse d'une large cohorte de patients, a permis de montrer que la lymphopénie associée avec un PS>1 corrèle avec un risque de décès précoce de 20% à 1 mois et 50% à 3 mois (Borg *et al.*, 2004; Ray-Coquard *et al.*, 2009(b); Ray-Coquard *et al.*, 2001). Les lymphopénies $CD4^+$

et $CD56^+$ sont aussi des facteurs de risque de décès précoce et de toxicité indépendants dans ces cohortes (Borg *et al.*, 2004; Ray-Coquard *et al.*, 2009(b)). De plus, dans une étude prospective intégrant des patients souffrant de cancer du sein avancé en première ligne de traitement, de NHL et de sarcomes des tissus mous, la lymphopénie est associée avec une augmentation du risque de progression et une diminution de la SG (Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)). Depuis, l'altération quantitative des cellules immunitaires circulantes a été identifiée comme jouant un rôle dans la progression de la maladie et la survie globale dans différentes pathologies cancéreuses (cancer du poumon non à petites cellules, de la prostate, du colon, cancer de l'estomac) (Alexandre *et al.*, 2007; Ceze *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011; Lheureux *et al.*, 2011; Oguz *et al.*, 2006)

3.2.2. Lymphopénies

Effets secondaires immuno-suppresseurs des chimiothérapies

De nombreux traitements cytotoxiques ont des effets immunosuppresseurs majeurs directs, en inhibant les fonctions des cellules effectrices du SI ou en les détruisant. Le cyclophosphamide (Mullins *et al.*, 1975) ou le méthotrexate (Salloum *et al.*, 1996) sont connus pour inhiber la prolifération des LT périphériques. De même, les inhibiteurs de tyrosine kinase peuvent affecter la fonction des LT. A fortes doses, l'imatinib mesylate (STI571), qui agit en bloquant les récepteurs c-ABL, BCR-ABL, et KIT, inhibe l'activation et la prolifération des LT chez l'Homme, probablement *via* inhibition de la tyrosine kinase LCK (Seggewiss *et al.*, 2005). De plus, des études expérimentales chez la souris ont permis de montrer que l'imatinib diminue l'expansion des LT mémoires, mais n'affecte pas les réponses lymphocytaires B et T primaires (Mumprecht *et al.*, 2006). Chez les patients bénéficiant d'allogreffe de moelle, l'imatinib peut également supprimer l'apparition de maladies du greffon contre l'hôte, et augmente la susceptibilité aux infections bactériennes et virales (Mattiuzzi *et al.*, 2003).

3.2.3. La reconstitution du système immunitaire

Régulation homéostatique

Le SI s'appuie sur un mécanisme homéostatique pour assurer la régulation du compartiment lymphocytaire qu'il soit stable ou perturbé par une activation antigénique. Pour les LT, cela implique de maintenir un répertoire diversifié de LT naïfs, d'éliminer rapidement les cellules effectrices après l'éradication d'un pathogène et d'assurer la survie à long terme des LT mémoires. L'homéostasie du « pool » de LT naïfs est régulée de manière très fine par la compétition pour les facteurs de survie que sont l'IL-7 et l'interaction CMH/peptide-TCR. L'homéostasie est assurée par l'internalisation de la chaine α du récepteur à l'IL-7 (CD127) lors de l'interaction avec son ligand. Cette internalisation entraîne une consommation de l'IL-7 et donc une diminution du taux d'IL-7 circulant. Ainsi lors de l'augmentation des populations de LT naïves et mémoires, la prolifération se voit freinée par des quantités d'IL-7 de plus en plus limitées (Park *et al.*, 2004; Swainson *et al.*, 2006).

Reconstitution du répertoire immunitaire lors d'une lymphopénie induite

Suite à une immuno-suppression induite par un traitement cytotoxique, par une irradiation ou encore certains virus, l'organisme possède deux moyens pour reconstituer sa population de lymphocytaire T : la reconstitution thymique et l'expansion périphérique homéostatique.

Reconstitution thymique

La reconstitution thymique, qui prédomine chez les enfants, génère de nouveaux LT à partir de cellules souches qui migrent vers le thymus pour s'expandre, se différencier, et subir la sélection. Les LT qui en résultent, qui ont un phénotype naïf, présentent un répertoire TCR diversifié capable de reconnaître un large éventail d'Ag. Le thymus est un organe dont la capacité à produire des LT évolue avec l'âge. Sa taille s'accroit de la naissance à la puberté, puis il subit une involution. La quantité de LT produits est directement liée à la taille du thymus : la production sera donc maximale à la puberté et diminuera par la suite. Ainsi, bien que le nombre total de LT reste quasiment toujours le même, le réservoir de LT de plus en plus homogène présente une capacité réduite à répondre à de nouveaux Ag.

Prolifération induite suite à une lymphopénie (LIP)

Dans le cadre d'une lymphopénie induite par une chimiothérapie, une irradiation, ou une infection par certains virus comme le VIH, l'immuno-déficience est tellement prononcée qu'une expansion homéostatique se met en place malgré un thymus fonctionnel afin de combler le vide. Cette expansion périphérique homéostatique indépendante du thymus prédomine chez l'adulte. Ce mécanisme conduit à une diminution des LT naïfs et donc à une constriction du répertoire immunitaire. Cette expansion se fait par l'intermédiaire de l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide et une stimulation cytokinique, dont l'IL-7. Chez la souris, lorsque le taux de LT chute, suite à une chimiothérapie, la consommation d'IL-7 chute conduisant ainsi à une augmentation du taux d'IL-7 disponible pour les LT restants. Les LT naïfs qui subissent une LIP acquièrent un phénotype et les caractéristiques fonctionnelles des LT mémoires et ressemblent aux cellules mémoires centrales (TCM) générées en réponse à un Ag étranger (Surh et Sprent, 2008). L'expansion périphérique homéostatique résulte en un répertoire T biaisé pauvrement diversifié (Chu *et al.,* 2004; Storek *et al.,* 2003). Une étude récente indiquerait que les Treg à la périphérie limiteraient ce phénomène en inhibant les populations majoritaires, permettant la reconstitution d'un répertoire plus diversifié (Winstead *et al.,* 2010).

3.2.4. Immunothérapies

On observe une augmentation rapide du nombre d'immunothérapies utilisées dans la lutte contre le cancer. Les premiers essais consistant à injecter des TIL expandus *ex vivo* dans le cancer du rein et le mélanome (Goedegebuure *et al.,* 1995; Hayakawa *et al.,* 1991), étaient lourds à mettre en place avec des résultats souvent décevants (Morita *et al.,* 1992). Depuis, d'énormes progrès ont été réalisés dans ce domaine et d'autres approches s'avèrent très prometteuses alors que certaines de ces immunothérapies sont même devenues des standards : dans le cancer du rein, l'association IL-2/IFN-α à forte doses reste le traitement de référence (Fisher *et al.,* 2000; Fyfe *et al.,* 1995; McDermott *et al.,* 2005) même si les thérapies ciblées commencent à la supplanter. Dans le mélanome, le traitement par AcM anti-CTLA-4 a été approuvé par la FDA en mars 2011. Les résultats les plus récents sur le transfert adoptif de LT (Rosenberg et Dudley, 2009), la vaccination combinée à de fortes doses d'IL-2 (Schwartzentruber *et al.,* 2011), ainsi que des Ac ciblant d'autres points de contrôle comme PD-1 (Sznol *et al.,* 2010) soulignent le rôle primordial du SI dans la lutte contre le cancer.

Immunothérapies ciblant la reconstitution T

IL-2

L'IL-2 est une cytokine qui joue un rôle important dans la régulation du SI. Elle est capable de stimuler la prolifération des LT $CD4^+$ et des $CD8^+$, l'activité des macrophages et la production d'Ac par les LB en se liant à la chaine α de haute affinité de l'IL-2R (CD25) présente à leur surface. Produite par des techniques de génie génétique, l'IL-2 recombinante a fait l'objet de nombreux essais thérapeutiques afin d'évaluer son efficacité en immunothérapie.

Un pré-traitement par IL-2 des patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique et présentant une lymphopénie favorise la normalisation du taux de lymphocytes chez la majorité des patients et semble améliorer l'efficacité de la chimiothérapie (Lissoni *et al.,* 2005). Des protocoles similaires ont été conduits dans le cancer du sein en combinant l'IL-2 à une forte dose de chimiothérapie, une transplantation de cellules progénitrices périphériques et de l'acide 13-cis rétinoïque (Recchia *et al.,* 2010) et dans le cancer du pancréas en pré-opératoire sans chimiothérapie adjuvante (Uggeri *et al.,* 2009) avec des résultats similaires. Une étude récente souligne l'efficacité de l'IL-2 dans une stratégie de vaccination thérapeutique chez des patients atteints de mélanome en phase métastatique (Schwartzentruber *et al.,* 2011). Dans cette étude, une vaccination avec le peptide gp100 montre une amélioration significative de la réponse clinique globale, comparée à IL-2 seule. Les patients traités par une vaccination couplée à l'IL-2 présentent également une meilleure SSP et une médiane de survie plus longue. Néanmoins, l'IL-2 présente des effets toxiques non négligeables de grade 3 à 5 selon la classification CTC (Common Toxicity Criteria, version 2.0) qui affecte essentiellement le sang et la moelle osseuse, les systèmes cardiaques, hépatiques et rénaux.

L'IL-2 est une arme à double tranchant puisqu'elle va également stimuler la prolifération des Treg qui sur-expriment le marqueur CD25. Dans le cancer de l'ovaire, l'administration d'IL-2 change les molécules du trafic en stimulant l'expression du récepteur CXCR4 sur les Treg et permettant ainsi leur recrutement par le microenvironnement tumoral en réponse à la chimiokine CXCL12 aboutissant à une augmentation du nombre de Treg (Wei *et al.,* 2007). Ces résultats indiquent qu'il est important de prendre en compte cette sous population lymphocytaire inhibitrice lors de l'évaluation d'une stratégie thérapeutique.

IL-7

L'IL-7 appartient à la superfamille des cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) qui partagent la chaine commune γc pour transduire leur signal. L'IL-7 possède une chaine α spécifique IL-7Rα. L'IL-7 est un facteur de croissance hématopoïétique secrété par le stroma de la moelle osseuse, le stroma thymique, les kératinocytes, les neurones, les CPAg et les cellules endothéliales. Cette cytokine est importante pour le développement des LB et LT. Elle forme, avec le facteur de croissance hépatique (HGF), un hétéro-dimère qui agit comme facteur de croissance cellulaire pré-pro-B. L'IL-7 joue un rôle critique dans le développement des LT, leur expansion homéostatique périphérique, et leur protection contre l'apoptose (Fry et Mackall, 2002; Fry *et al.*, 2003; Graninger *et al.*, 2000) permettant d'augmenter la durée pendant laquelle les LT sont disponibles pour une réponse spécifique. L'IL-7 a une propriété immuno-reconstituante qui se traduit par une expansion massive des LT naïfs et mémoires, un support de la thymopoïèse qui favorise la production d'émigrants thymiques récents (RTE) (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995) et donc le rétablissement d'un répertoire immunitaire diversifié. De plus, l'IL-7 entraine une inhibition à la fois de la production de TGF-β, cytokine immuno-suppressive majeure, et de la signalisation en aval du récepteur (Andersson *et al.*, 2011), mais aussi une amélioration de la réactivité des LT αβ vis-à-vis de faibles immunogènes comme les TAA qui de paire avec l'expansion globale des LT pourrait contribuer à briser la tolérance à une stimulation chronique par un virus ou un TAA. Contrairement à l'IL-2, l'IL-7 n'affecte que très peu la prolifération des Treg à l'origine de la suppression de la réponse T dirigée contre la tumeur (Jaleco *et al.*, 2003; Melchionda *et al.*, 2005) et présente l'avantage d'être beaucoup moins toxique que l'IL-2.

Chez l'homme, des données *in vivo* issues des essais cliniques de phase I dans le traitement de l'infection par le VIH, montrent la capacité de l'IL-7 à amplifier le pool de LT *via* une expansion homéostatique des T périphériques et une thymopoïèse accrue sans induire l'expansion des Treg (article en préparation). Une étude clinique récente montre également une augmentation de la diversité combinatoire du répertoire chez des patients infectés par le virus HCV traités par IL-7 (poster présenté à l'AASLD en 2011).

Dans un essai sur 16 patients souffrant de cancer métastatique non hématologique réfractaires aux traitements, Sportes et coll. (Sportes *et al.*, 2010) ont montré récemment que l'IL-7 était capable d'entrainer une expansion des LT ainsi qu'une augmentation statistiquement significative de la diversité du répertoire dans les deux populations lymphocytaires T $CD4^+$ et $CD8^+$. L'analyse des Treg a montré une prolifération et une expansion bien inférieures aux autres LT $CD4^+$, aboutissant à une réduction de la proportion de Treg circulants. Cette étude supporte le fait qu'un traitement par immunothérapie IL-7 favorise une forte expansion de LT circulants présentant un profil régénéré ressemblant à celui d'une personne jeune avec une expansion minime des Treg. Une étude plus récente suggère un effet plus direct de l'IL-7 sur les Treg et le réseau inhibiteur au niveau cellulaire et moléculaire (Pellegrini *et al.*, 2009). L'IL-7 favoriserait la différenciation des LT $CD4^+$ en TH_{17} plutôt qu'en Treg.

IL-15

Comme l'IL-7, l'IL-15 appartient à la superfamille des cytokines qui partagent la chaine commune IL-2Rγ pour transduire leur signal. L'IL-2 et l'IL-15 ont en plus une chaine IL-2Rβ identique mais possèdent chacune une chaine α spécifique. La structure similaire de leur récepteur explique partiellement la redondance entre ces cytokines. L'IL-15 est souvent comparée à l'IL-2 même si ces cytokines présentent des caractéristiques différentes. Les cibles de l'IL-15 sont les lymphocytes T et les NK. L'IL-15 présente des fonctions pléïotropiques dans l'homéostasie et l'activation de l'immunité innée et adaptative. Le mécanisme d'action dominant de l'IL-15 est une trans-présentation (signalisation juxtacrine), bien qu'il existe également des voies de signalisation intracrine, autocrine, et paracrine (Rowley *et al.*, 2008; Tsukamoto *et al.*, 2006). Les cellules productrices d'IL-15, les monocytes et les DC en particulier, expriment l'IL-15Rα qui, au contraire de l'IL-2Rα, se lie à l'IL-15 avec une forte affinité (Bulanova *et al.*, 2001). Le complexe IL-15/IL-15Rα est essentiellement trans-présenté aux cellules cibles qui expriment le récepteur IL-2/15Rβδc (Anderson *et al.*, 1995; Giri *et al.*, 1995) à leur surface. Cette trans-présentation permet aux cellules productrices d'IL-15 de s'adresser plus précisément à leurs cellules cibles.

L'avantage de l'IL-15 en thérapie anti-tumorale réside dans sa capacité unique à activer des mécanismes immuns anti tumoraux dont le développement et la fonction cytotoxique des cellules NK et des NKT (Decot *et al.*, 2010; Dubois *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2000) et des LT $CD8^+$ (Alves *et al.*, 2003; Berard *et al.*, 2003; Hinrichs *et al.*, 2008; Kanegane et Tosato, 1996). Elle inhibe l'AICD induite par l'IL-2, et favorise le maintien d'une réponse immune persistante au travers de son action sur les LT mémoires en combinaison avec l'IL-7 (Berard *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2009; Huarte *et al.*, 2009; Markley et Sadelain; Sandau *et al.*). La capacité de l'IL-15 à stimuler les NK cytotoxiques *via* l'induction d'une surexpression du récepteur activateur (KAR) NKG2D (Decot *et al.*, 2010) présent à la surface des NK et des LT $CD8^+$ est un mécanisme qui permettrait d'interférer avec la stratégie d'évasion de la tumeur. Autre avantage non négligeable, l'IL-15 est moins toxique (Munger *et al.*, 1995) et induit moins d'activation des Treg que l'IL-2 (Vang *et al.*, 2008), et pourrait même induire, dans certaines circonstances, une protection des LT effecteurs contre l'effet inhibiteur des Treg (Ben Ahmed *et al.*, 2009). L'IL-15 a été utilisée avec succès dans un modèle préclinique du cancer du côlon en combinaison avec un Ac agoniste anti-CD40 (Zhang *et al.*, 2009). Le meilleur effet thérapeutique a été atteint avec une stratégie combinant l'IL-15, un blocage de PD-L1 et CTLA-4 (Basak *et al.*, 2008). Une première étude clinique utilisant l'IL-15 recombinante humaine chez des patients porteurs d'un mélanome métastatique réfractaire ou d'un cancer du rein métastatique est actuellement en cours de recrutement (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01021059).

Autres immunothérapies

D'autres stratégies ciblent les voies d'activation des lymphocytes afin de déclencher une réponse immunitaire anti tumorale efficace.

CTLA-4 transmet un signal inhibiteur bloquant l'activation des LT, alors que CD28 transmet un signal de stimulation. L'ipilimumab est un AcM humanisé dirigé contre CTLA-4 utilisé dans le traitement du mélanome. La liaison de l'ipilimumab au récepteur bloque l'activité du CTLA-4, améliorant l'activité immune anti-tumorale en prolongeant l'activation des LT dirigés contre la tumeur. Une étude clinique récente dans le mélanome a démontré une amélioration de la survie globale des patients ayant bénéficié du traitement (Hodi *et al.*, 2010).

PD-1 présente des homologies avec CTLA-4 mais induit un signal immunitaire inhibiteur distinct. PD-1 induit une inhibition fonctionnelle des cellules effectrices médiée par l'inhibition de la prolifération, ou la délétion/apoptose. Une stratégie anti-PD-1 a été testée pour augmenter la réponse des LT spécifiques de la tumeur. L'étude clinique de phase I utilisant l'AcM humanisé anti PD-1 humain (MDX-1106, IgG4 (BMS 936558/ONO-538) conduite sur 39 patients atteints de tumeur solide résistante aux traitements classiques (cancer du poumon non à petite cellule, cancer de la prostate hormono-résistant, mélanome, cancer colorectal, et cancer du rein) (Brahmer *et al.*, 2010) montre une activité anti tumorale avec une rémission complète et 2 rémissions partielles chez des patients atteints d'un cancer colorectal.

Contrairement à CTLA-4 et PD-1, la voie de signalisation 4-1BB (CD137) transmet un signal activateur qui améliore la prolifération des LT et la production des cytokines Th1 et protège les cellules T $CD8^+$ de la mort cellulaire induite par AICD (Lee *et al.*, 2002). La tolérance liée à l'engagement du TCR sans signal de co-stimulation suffisant pourrait être en partie responsable de l'évasion tumorale. Dans ce cas la potentialisation des signaux de co-stimulation pourrait augmenter l'immunogénicité des tumeurs. BMS-663513 est un AcM agoniste de CD137. Les premiers résultats cliniques chez l'Homme dans le mélanome, le cancer du rein et de l'ovaire (Sznol M *et al.*, 2008) montrent une réponse partielle dans seulement 6% des patients atteints de mélanome. Pourtant dans 17% des mélanomes et 14% des patients atteints de cancer du rein une stabilisation de la maladie à 6 mois et plus est observée.

Conclusion

L'ensemble de ces données suggère que la stimulation et l'éducation du SI adaptatif et notamment des LT pourraient favoriser le développement d'une réponse anti-tumorale durable qui réduirait la progression tumorale et permettrait de contenir de nouveaux assauts de la maladie et d'éviter les récidives.

Objectif des travaux de thèse

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction, le SI joue un rôle clé dans le cancer. Son rôle initial de surveillance peut être détourné au cours de la progression tumorale afin de permettre à la tumeur de proliférer et de prospérer.

Des études récentes ont montré que ces perturbations avaient des répercutions mesurables sur le SI en périphérie : ~25% des patientes métastatique présentent une lymphopénie <1Giga/L avant tout traitement qui est associée à une espérance de vie réduite (Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)).

Ce travail de thèse reposait sur l'hypothèse selon laquelle une étude approfondie du SI, au travers de l'étude combinée de la lymphopénie et de la diversité combinatoire, pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la lymphopénie impacte la SG et d'identifier une sous-population de patientes plus fragiles et donc à fort risque de mortalité et d'infections qui pourraient bénéficier d'une adaptation thérapeutique.

L'impact de la lymphopénie sur la SG ayant été démontré chez des patients atteints de cancer métastatique, nous avons réalisé, sur une cohorte rétrospective de 66 patientes (étude SEMTOF) atteintes de cancer du sein métastatique pour lesquelles nous avions un suivi de 3 ans, les analyses de la lymphopénie et de la diversité combinatoire du TCR. Nous avons souhaité confirmer, sur une cohorte prospective (n=67), les résultats préliminaires obtenus et vérifier la valeur pronostique de la diversité combinatoire et du NDL chez les patientes en phase métastatique (**Article n°2**).

Nous avons par ailleurs étudié l'impact d'un déficit quantitatif des différentes sous populations lymphocytaires ($CD4^+$, $CD8^+$, NK) et l'impact des taux de cytokines circulantes sur la SG et la SSP au cours de l'évolution métastatique et avons comparé deux cohortes de patientes atteintes de cancer du sein métastatique i) en première rechute (n=103) ou ii) après au moins deux lignes de chimiothérapie (n=112) (**Article n°3**).

Nous avons également étudié la puissance prédictive de la diversité combinatoire sur le risque de toxicité grave chez des patientes atteintes de cancer du sein en phase primaire (données non publiées).

Une nouvelle approche statistique a été développée pour exploiter plus en profondeur les données de diversité et aboutir à une analyse plus fine de la perturbation du répertoire immunitaire (**Article 1**).

RESULTATS

RESULTATS

4. La technologie d'étude du répertoire immunitaire et de dépistage de la Divpénie.

L'analyse de la diversité combinatoire du TCR est réalisées selon différentes techniques incluant la cytométrie de flux, l'analyse par biologie moléculaire au niveau ARNm ou ADN génomique (ADNg) (technique développée par ImmunID). Les avantages et inconvénients de ces différentes techniques seront développés à la fin de cette partie.
Une partie de mes travaux de thèse a consisté en la création et en l'amélioration de tests de biologie moléculaire développés par la société ImmunID pour l'analyse du répertoire immunitaire.

4.1. La technologie d'étude du répertoire développée par ImmunID

Nous analysons la diversité combinatoire grâce à une approche qualitative et semi-quantitative qui donne une vision globale de la diversité combinatoire des LT (TCRβ) et des LB (BCR).

Description de la technologie

Les études de répertoire sont réalisées sur de l'ADNg ce qui assure la stabilité du matériel biologique. Une analyse semi-quantitative est ainsi possible grâce à la relation directe au niveau génomique « une cellule = un réarrangement ». Cette technologie est basée sur une PCR multiplexe qui permet l'identification de plusieurs cibles avec un seul jeu d'amorces. Cette approche est rendue possible par le mécanisme naturel de réarrangement des gènes V(D)J et le fait que l'amorce J soit dans une région non codante commune en aval du cluster J. Le test développé pour analyser la diversité du répertoire TCR (hTRB) est composé de 23 tubes correspondant aux 23 familles de gènes V, chaque tube permettant d'amplifier le réarrangement entre une famille de gènes V donnée et l'ensemble des 13 gènes J fonctionnels (**Figure R-1**). La valeur de diversité correspond au pourcentage de réarrangements observés par rapport au nombre de réarrangements théoriques possibles. Dans le test ImmunTraCkeR β, 276 réarrangements sont attendus. Si le test détectait 100 réarrangements, la diversité combinatoire de l'échantillon serait calculée comme suit :

> Diversité combinatoire = 100 réarrangements observés * 100 / 276 réarrangements théoriques = 36.2%.

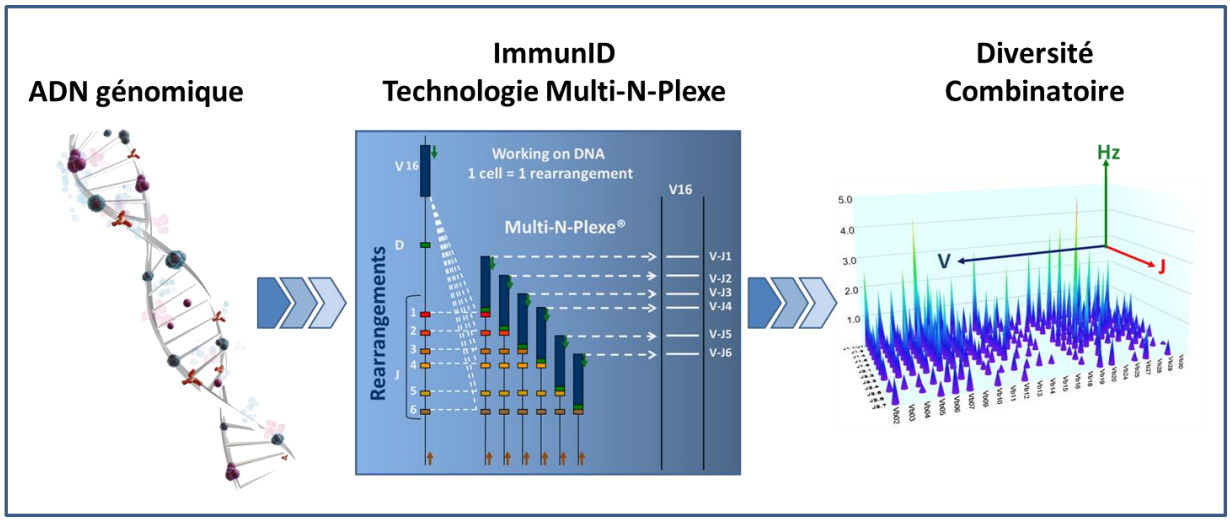


Figure R-1 : mécanisme d'identification des réarrangements V(D)J par PCR multi-n-plexe à partir d'ADN génomique

Conditions techniques de la PCR

Le nombre de cycles d'amplification a été défini par qPCR de manière à ce que l'amplification reste dans la phase exponentielle sans atteindre la phase plateau de PCR ou il n'y a plus de relation entre intensité du signal et nombre de cellules initiales (**Figure R-2**). Nous avons décidé d'arrêter l'amplification à 28 cycles afin de rester en dessous de la phase plateau. Cette approche de PCR multiplexe nécessite l'amplification de fragments d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases et donc l'utilisation d'une enzyme capable d'amplifier des fragments de cet ordre de taille. L'enzyme iProof® de BioRad utilisée dans nos tests ImmunTraCkeR permet l'amplification de fragments « GC rich » de 1kb en 15 secondes.

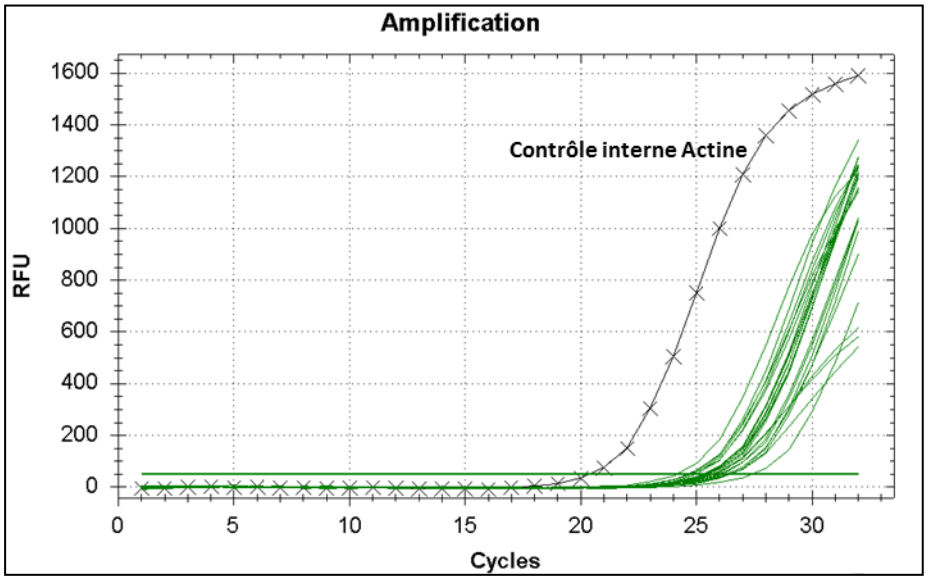


Figure R-2 : courbes d'amplification en qPCR d'une cartographie ImmunTraCkeR β. Chaque courbe correspond à une famille V amplifiée.

Mesure de la taille et de l'intensité du signal

Les différents réarrangements obtenus sont analysés par migration sur gel d'agarose (plateforme IFS3) ou plus récemment par migration micro-fluidique (système Caliper LabChip GX) (plateforme IFS4) qui permet d'automatiser le processus au niveau de la migration et de l'analyse du signal.

Sur la plateforme IFS3, la quantification des différents réarrangements et de la diversité du répertoire se fait par la prise d'une image *via* une caméra CCD. Chaque réarrangement V(D)J est identifié en fonction de sa taille : l'amplicon le plus petit correspondant au réarrangement du gène V avec le gène J le plus distal et l'amplicon le plus grand celui du gène V avec le gène J le plus proximal (**Figure R-1**). La taille des bandes est déterminée par rapport au marqueur de poids moléculaire dont toutes les tailles sont connues. La diversité est évaluée sous forme de pourcentage des réarrangements observés par rapport à l'ensemble des réarrangements possibles, soit 276 pour le TCRβ et 48 pour le BCR.

Logiciel Constel'ID

Les données produites par la plateforme expérimentale sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Constel'ID, une application, développée par la société, qui permet de comparer les données de migration avec les données théoriquement attendues et d'en faire un rendu graphique aisément interprétable.

L'étape d'analyse consiste en une mise en correspondance des produits de migration avec les réarrangements théoriquement attendus. La contribution de chaque réarrangement identifié est calculée par rapport à un marqueur de poids moléculaire pour lequel la concentration de chaque bande est connue. A partir de ces données analysées, un rendu est réalisé sous forme de graphique en 3 dimensions. A chaque réarrangement correspond un pic, dont la hauteur est proportionnelle à la fréquence de détection du réarrangement.

Le logiciel Constel'ID est accessible à travers une interface web sécurisée. Cette interface permet d'analyser de nouveaux résultats, ainsi que de consulter des résultats existants. Il permet également de créer le score NDL (Numération Diversité Lymphocytaire) à partir d'une donnée de numération fournie.

4.2. Contrôles qualité

Tous les échantillons reçus à ImmunID sont soumis à des contrôles qualité permettant de vérifier l'absence de dégradation ou d'inhibiteur.

Contrôle spectrophotométrique

Ce contrôle, réalisé en duplicat consiste à doser l'ADNg de chaque échantillon extrait et à déterminer la présence de protéines contaminantes grâce à la mesure du ratio d'absorbance (A260/280). Le ratio est considéré comme satisfaisant s'il est compris entre **1,4 et 2**. Un ratio en dehors de ces limites n'est pas rédhibitoire pour la suite des analyses et les contrôles qualités suivant seront tout de même réalisés.

Contrôle qualité ADNg de haut poids moléculaire

Il s'agit d'un contrôle permettant de mettre en évidence la présence éventuelle d'une dégradation de l'échantillon d'ADNg extrait. Une quantité fixe d'ADNg est déposée sur un gel d'agarose et une migration électrophorétique est réalisée pendant 10 minutes à 220V/110mA. Un ADNg de bonne qualité est caractérisé par la visualisation d'une bande d'ADN de haut poids moléculaire, et par l'absence de smears (**Figure R-3 A**). Dans le cas contraire, la qualité de l'ADNg de l'échantillon n'est pas validée (**Figure R-3 B**).

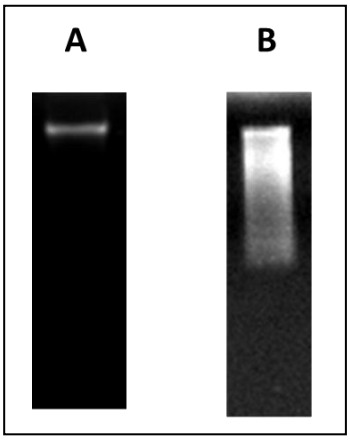


Figure 15 : migration sur gel d'agarose 1.2% de l'ADNg total. A) ADNg non dégradé ; B) ADNg dégradé.

Contrôle qualité PCR sur le gène hActine

Ce contrôle permet de mettre en évidence une éventuelle inhibition enzymatique de la PCR en effectuant une amplification sur le gène de ménage actine dans les échantillons d'ADNg extraits (**Figure R-4**). Un échantillon de référence (témoin positif) est inclus pour vérifier le bon fonctionnement du test. Si l'amplification n'est pas inhibée, un produit PCR de taille connue est obtenu, le contrôle qualité est alors validé.

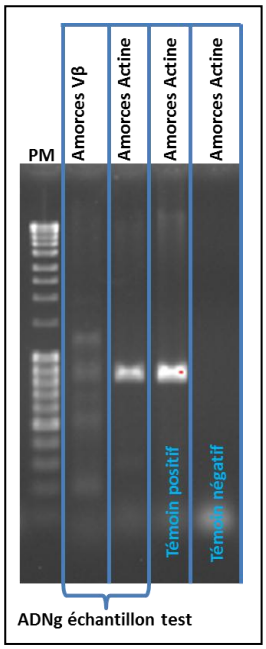


Figure 16 : Format du test hActine ; exemple d'un échantillon validé.

4.3. Reproductibilité

Evaluation de la répétabilité

Afin de mesurer la variabilité du test ImmunTraCkeR, une étude de répétabilité a été réalisée sur la plateforme IFS3. Le même échantillon a été analysé 14 fois consécutives et les variations de diversité ont été mesurées (**Figure R-5**). Une analyse de variance réalisée sur cet échantillon indique que la diversité combinatoire ne varie pas en fonction des répétitions (p=0.28169).

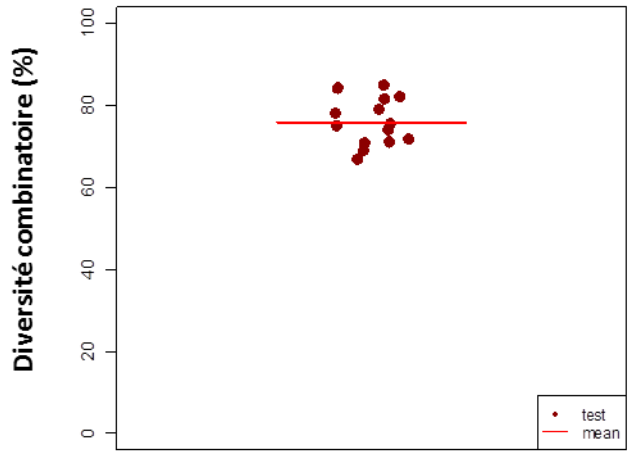


Figure R-5: Variation de la diversité sur un même échantillon testé 14 fois.

Quantité de matériel biologique nécessaire :

A l'heure actuelle, pour réaliser une cartographie complète hTRB en duplicat, 4 .10^6 cellules mononucléées du sang sont nécessaires afin d'obtenir après extraction une quantité de matériel d'ADN génomique suffisante pour déposer 50ng par puits. La limite de détection actuelle du test ImmunTraCkeR® β est de 150 000 LT triés. Cette limite a été déterminée en diminuant la quantité de cellules T jusqu'à observer une diminution de la diversité (**Figure R-6**).

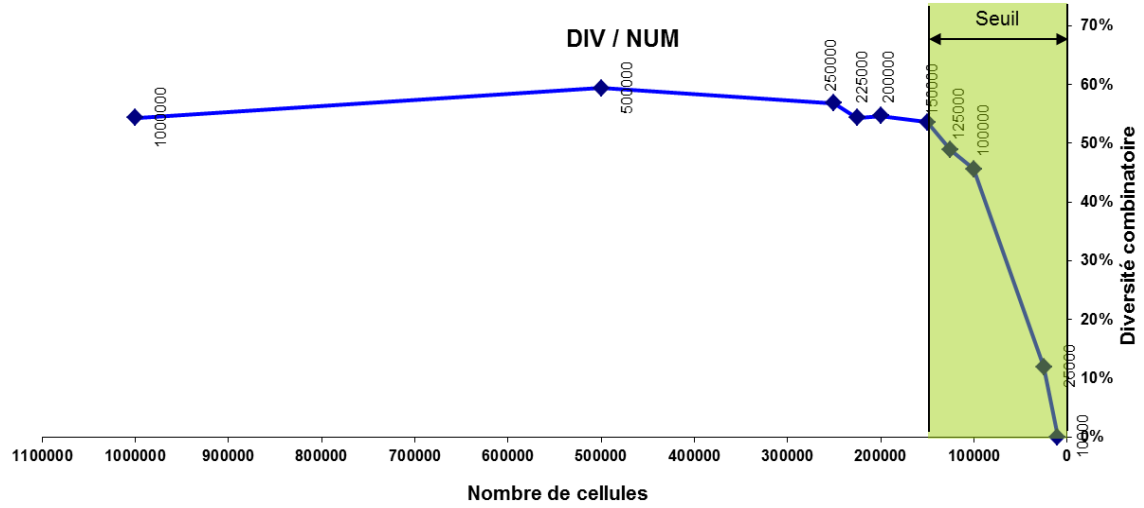


Figure R-6 : impact de la quantité de cellules initiales sur la diversité combinatoire observée par le test ImmunTraCkeR β (analyses réalisées à partir du même donneur).

4.4. Le score NDL

Le taux de lymphocytes est déterminé lors d'analyses de routine pour être intégré dans le bilan biologique du patient. Une numération lymphocytaire est considérée comme normale lorsqu'elle est comprise entre 1.0 et 2.4 Giga/L. En dehors de cette plage, le patient est considéré comme potentiellement à risque et bénéficie d'une prise en charge adaptée en fonction de sa pathologie.

Suite au constat qu'une numération lymphocytaire dite normale n'était pas toujours synonyme de bonne diversité du répertoire immunitaire et inversement, l'analyse NDL a été développée. Le score NDL est une représentation graphique qui permet de combiner les deux facettes du répertoire immunitaire que sont la numération lymphocytaire et la diversité combinatoire pour obtenir une image plus fine du statut immunitaire d'un patient (**FigureR-7A**).

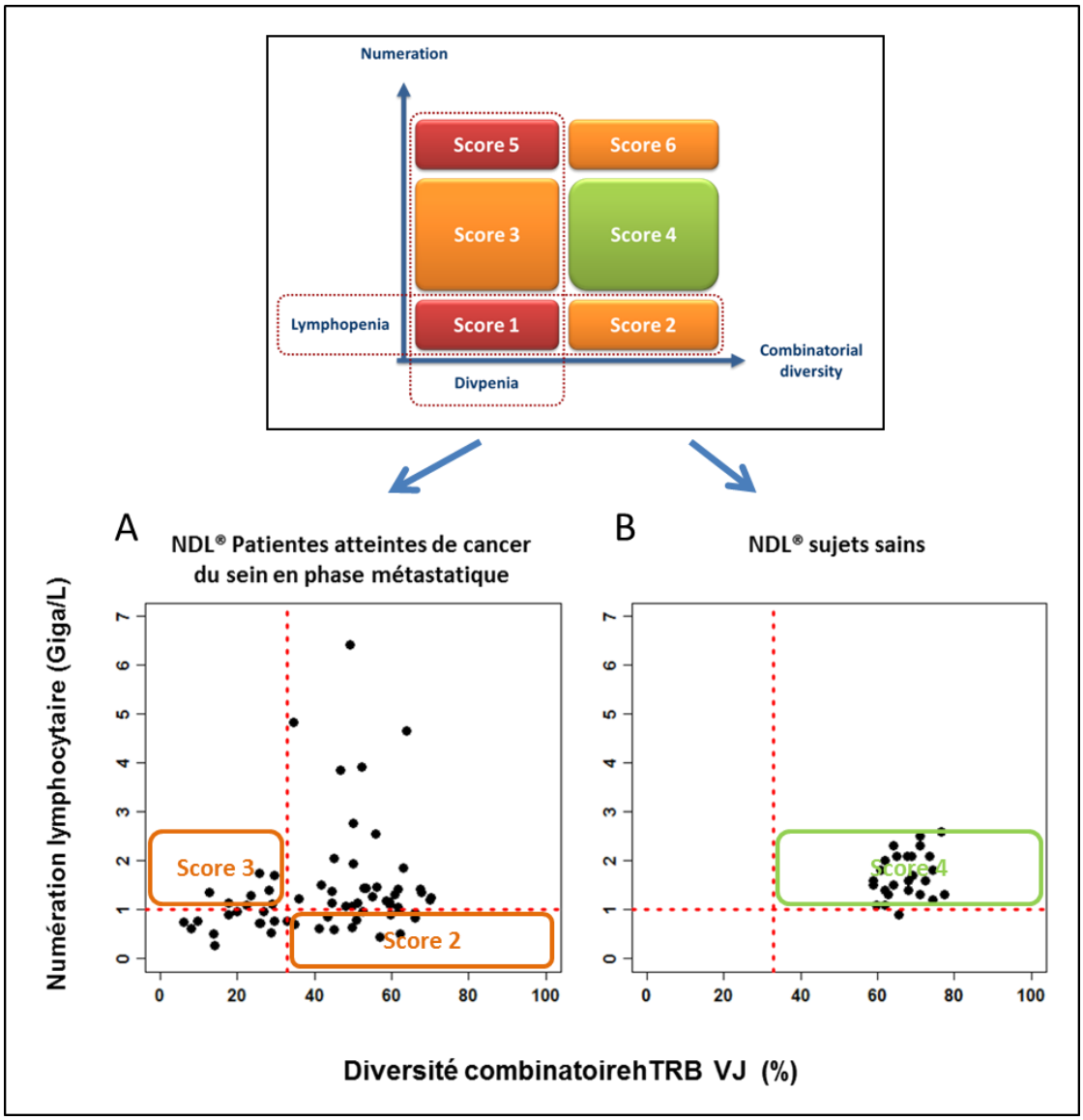


Figure R-7 : NDL, représentation graphique de la diversité en fonction de la numération. Distribution des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique (A) et des sujets sains sur un graphique NDL (B).

Au sein d'une population de patients, présentant une numération lymphocytaire normale, il est possible de détecter un large panel de diversité TCR dont certaines qui sont faibles (divpénie) et donc en contradiction évidente avec la numération. Cette analyse NDL permet une meilleure discrimination des patients sur la base d'une analyse de la quantité de lymphocyte (numération) et de la qualité de la diversité de leur répertoire immunitaire. Des seuils qui définissent les patients lymphopéniques et divpéniques permettent de segmenter cette représentation en 4 ou 6 zones distinctes, chacune étant associée à un niveau d'immuno-compétence. Les patients de la zone NDL 4 présentent une bonne numération couplée à une bonne diversité et représenteraient donc le meilleur cas de figure. La quasi-totalité des donneurs sains sont retrouvés dans cette zone (**Figure R-7B**). Les zones NDL 3 et NDL 4 s'opposent en termes de diversité et permettent de mettre en évidence des sous populations de patientes que la numération seule n'aurait pas identifiée (**Figure R-7A**). La valeur pronostique de ces zones 2 et 3 reste encore à définir et représente des stades de perturbation intermédiaire entre les zones 4 et 1. La zone NDL 1 composée des patients à la fois lymphopéniques et divpéniques (que nous appellerons lympho-divpéniques) serait la zone la plus à risque nécessitant une adaptation thérapeutique (cette zone est étudiée en détail dans **l'article 2**).

Le NDL reste un outil souple d'utilisation : pour avoir une image plus précise il est possible de réaliser le tri d'une sous-population lymphocytaire et de réaliser l'analyse du répertoire sur cette sous-population. La numération théorique peut être calculée par phénotypage préalable ou pendant le tri en cas d'utilisation d'un trieur. L'axe des ordonnées sera remplacé par la numération de la sous-population étudiée pour réaliser un NDL plus précis permettant par exemple d'évaluer la diversité de la population $CD8^+$ lors d'une infection virale.

4.5. Les biais de diversité associés à la pathologie et représentation NDL

L'exploitation du NDL apparaît évidente dans certaines pathologies ciblant le SI, mais nous verrons par la suite que le champ d'application est beaucoup plus vaste et le NDL pourrait être utilisé pour définir la qualité du SI du patient indépendamment de sa pathologie.

Dans le domaine de la cancérologie, l'application la plus évidente est la leucémie lymphoïde ou les lymphomes. Ces cancers des cellules immunes sont le fruit d'une prolifération anarchique et pathologique d'un clone de LT ou LB qui conduit à une numération lymphocytaire anormalement élevée et à une restriction de la diversité liée à la prolifération clonale. La plupart des patients présentent donc un score NDL 5 (**Figure R-8**) à distinguer des patients avec un score NDL 6 qui malgré un taux de lymphocytes élevé, présentent une diversité normale.

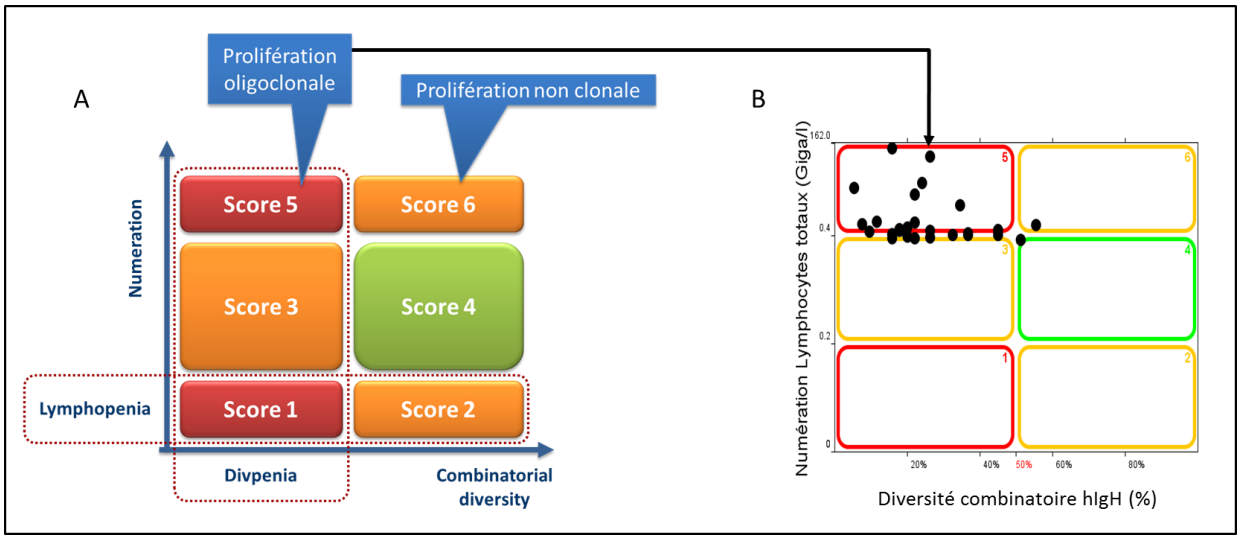


Figure R-8 : utilisation du NDL pour discriminer une leucémie d'une prolifération non clonale (A). Exemple de patients atteints d'une Leucémie Lymphoïde Chronique qui se trouvent majoritairement dans la zone 5 du NDL (B) (étude RIPAL réalisée en collaboration avec les Hospices Civils de Lyon et le Pr Gilles SALLES)

Le champ d'utilisation du NDL comprend les pathologies ainsi que les traitements impliquant les LT et s'étend des maladies auto-immunes au sepsis, en passant par la vaccination, et le suivi du traitement des cancers. Dans le cadre d'un sepsis, il est possible d'utiliser la diversité combinatoire pour identifier les patients à risque de décès (article en préparation). La vaccination devrait conduire à l'apparition de réarrangements majoritaires correspondant aux TCR spécifiques du vaccin.

Dans les cancers solides en général et plus particulièrement le cancer du sein, le SI joue un rôle clef dans la réponse anti-tumorale comme nous l'avons abordé §2.2.1. Nous détaillerons dans **l'article n°2** l'intérêt de l'utilisation de ce score pour identifier les patientes à risque dans le cancer du sein métastatique.

5. Développement d'une approche de séquençage à haut débit pour la caractérisation du répertoire immunitaire.

J'ai choisi au travers du séquençage d'illustrer le type de développements technologiques que j'ai été amené à mettre en place pour la société ImmunID au cours de ma thèse. Une bonne connaissance des loci des récepteurs des lymphocytes et des mécanismes de réarrangement est nécessaire pour la conception de ce type de tests. Les innovations technologiques proposées par les industriels (comme le SYBRgreen et les amorces LNA) nous offrent sans cesse de nouvelles opportunités pour, à notre tour, créer de l'innovation dans notre domaine d'application.

5.1. Introduction

L'étude de la diversité que nous développons a pour objectif de permettre une réalisation simple et rapide pour une utilisation lors d'études cliniques et en routine médicale mais demeure moins résolutive en se limitant à l'analyse de la diversité combinatoire. Néanmoins certaines problématiques de recherche nécessitent de pousser jusqu'au CDR3 pour répondre à la question initiale (notamment les études de vaccination). C'est donc dans ce contexte que nous avons été amenés à développer une approche de séquençage du répertoire immunitaire à partir d'ADNg. Cette approche permet d'obtenir une information exhaustive du répertoire immunitaire et donc l'image la plus nette et la plus complète. Le séquençage à haut débit permet d'identifier à la fois les gènes V(D)J utilisés et la séquence hypervariable CDR3 qui définit la spécificité du récepteur T. Cela permet ainsi de remonter jusqu'à la structure du récepteur et donc potentiellement la nature de l'Ag reconnu. Même si cette approche est à l'heure actuelle chronophage, non quantitative, et reste à des tarifs très élevés ne permettant pas un usage en routine, elle apporte un outil de recherche riche en information, pouvant par ailleurs être utile à la calibration des tests ImmunTraCkeR et Immun'IgH.

Pour déterminer la faisabilité de ce type d'approche, nous avons réalisé une preuve de concept à partir du test Immun'IgH® qui permet une étude exhaustive de la diversité combinatoire de la chaine lourde des immunoglobulines en 8 PCR. Le locus hIgH est composé de 51 gènes V fonctionnels répartis en 7 familles, 23 gènes D répartis en 7 familles et 6 gènes J. Les gènes V et D sont regroupés en 7 familles en fonction de leur similarité (>75%).

5.2. Création d'une banque d'ADN

Avant d'entamer le séquençage à proprement parler, la création d'une banque d'amplicons à partir d'ADNg est nécessaire. Cette étape nécessite une adaptation de notre test afin de répondre aux contraintes technologiques du séquençage. A l'heure actuelle, la taille maximale des fragments qui peuvent être séquencés est ~500 paires de bases (pb). Le séquençage d'un fragment de 500pb est possible par plusieurs techniques dont le « pyrosequencing » (GS Flex Roche®) (Ronaghi *et al.*, 1996; Ronaghi *et al.*, 1998) qui permet d'identifier jusqu'à 1 million de séquences en un seul run de séquence.

Contraintes génétiques spécifiques au mécanisme de réarrangement.

La PCR multi-n-plexe d'ImmunID est basée sur une long-range PCR permettant l'amplification de fragments jusqu'à 5kb. Pour atteindre cet ordre de taille, il faut faire appel à des protocoles spéciaux dont l'élément clé est la processivité de l'enzyme et le nombre de bases maximum qu'elle peut amplifier.

Afin d'amplifier des fragments de 500pb max, nous avons utilisé les amorces V de notre test mais avons dû concevoir des amorces spécifiques de chaque gène J qui soient à la fois spécifiques et exclusives. Du fait du mécanisme de réarrangement au niveau génomique cette approche conduit à l'amplification de fragments qui sans être non spécifiques, ne sont pas les fragments cibles. Par exemple : de par la configuration du locus J, dans le cadre d'une détection de réarrangements V3-J5, le même couple d'amorces peut aussi détecter un réarrangement V3-J4 localisé en amont du segment de gène J5, ce produit sera caractérisé par une taille qui sera supérieure à celle attendue (**Figure R-9**). Cette amplification non désirée, est appelée une amplification J_{x-1} et elle résulte de la faible distance séparant les différents segments J entre eux (**Figure R-10**).

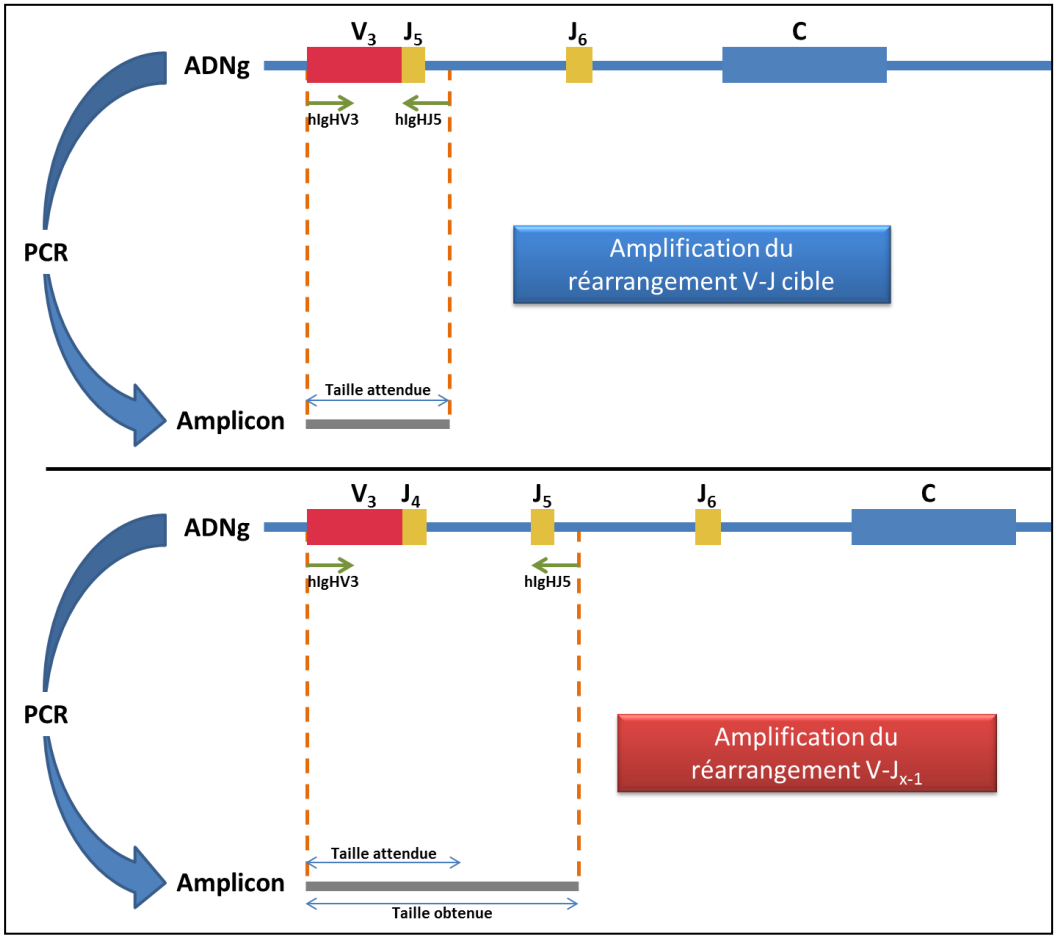


Figure R-9 : Organisation du locus et particularité du mécanisme de réarrangement conduisant à l'amplification de fragments non cibles. Dans cet exemple, le réarrangement V3-J4 est observé grâce à une amorce conçue pour reconnaitre le réarrangement J5.

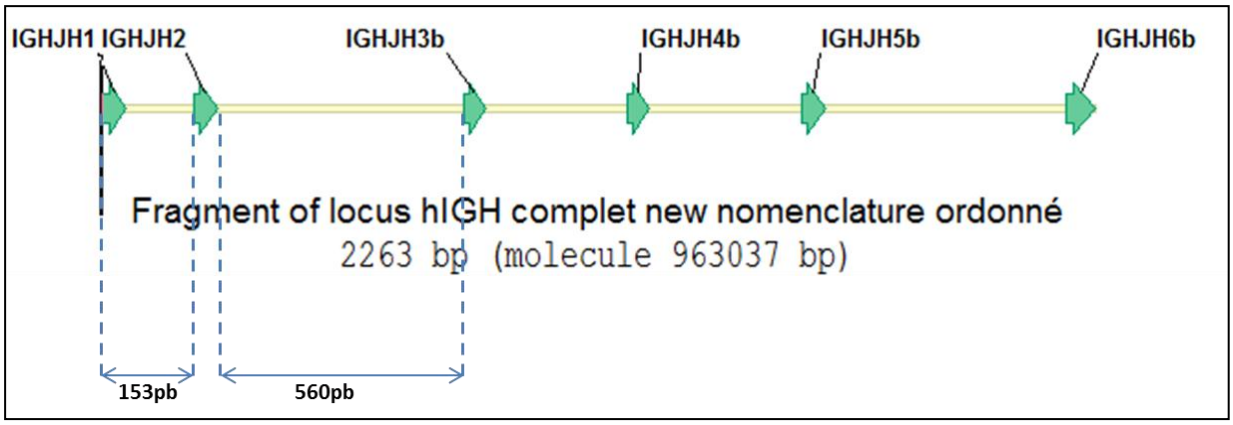


Figure R-10: représentation extraite du logiciel Vector NTI représentant les distances séparant les gènes J les uns des autres. La distance maximale entre deux gènes J est de 560pb et la distance minimale seulement 153pb

Afin d'empêcher ce phénomène, nous avons dû travailler sur des conditions PCR extrêmement stringentes et en particulier une modification de la température d'hybridation pour augmenter la stringence de cette étape et ainsi empêcher les amplifications de fragments trop grands (>500pb). Ces conditions de PCR comprennent le programme PCR ainsi que la composition du mix d'amplification.
Nous utilisions jusqu'alors l'enzyme iProof® de BioRad qui malgré un temps d'élongation de 1 seconde, ne permettait pas d'amplifier uniquement les fragments attendus (**Figure R-11A**). L'enzyme FastStart de Roche, polymérase classique beaucoup plus lente que l'iProof, permet elle l'amplification de fragments de 2 à 4 kb par minute. L'utilisation de cette enzyme couplée à une réduction du temps d'élongation a permis d'augmenter la spécificité en limitant fortement l'amplification des fragments >500bp et en favorisant l'obtention de fragments de la taille attendue (entre 100bp et 500bp) (**Figure R-11B**).

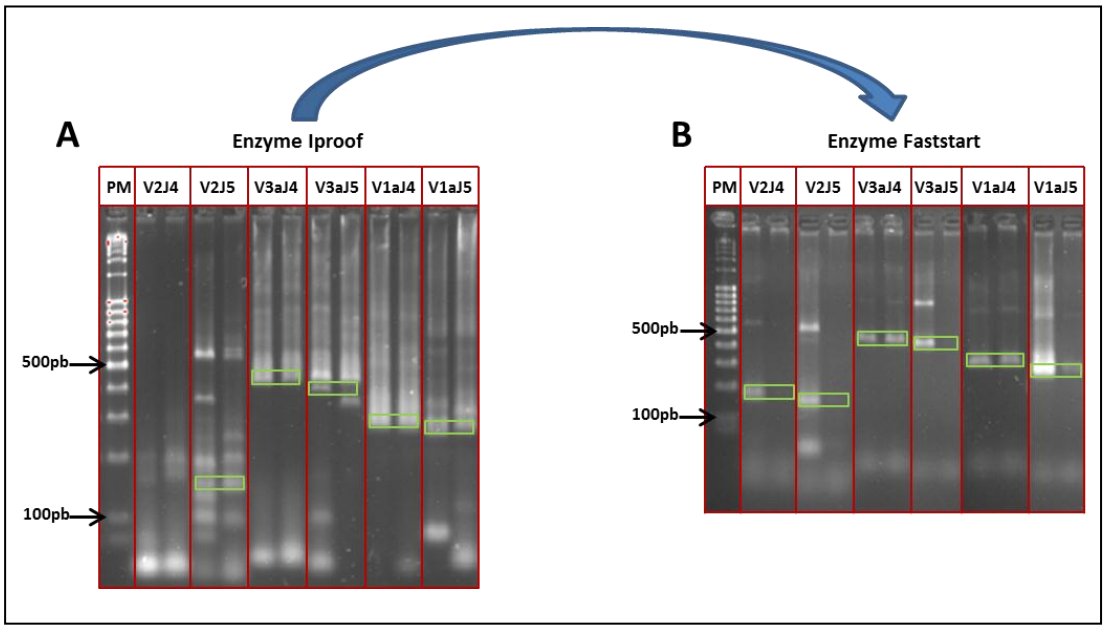


Figure R-11 : amplification de réarrangements spécifiques avec l'enzyme iProof (A) et l'enzyme FastStart (B). Les encadrés verts correspondent aux fragments de taille attendue.

Cette preuve de concept a permis la création d'une banque de produits PCR qui permettra le séquençage des réarrangements présents dans l'échantillon de départ qui représentera la dernière étape de validation de cette approche qui a pour objectif d'être exhaustif dans l'analyse de la diversité combinatoire en analysant à la fois les gènes V(D)J utilisés et la séquence hypervariable CDR3.

5.3. Discussion

L'étude de la diversité développée dans le test ImmunTraCkeR présente l'avantage d'une réalisation simple et rapide pour une utilisation dans le cadre d'études clinique et en routine médicale. Bien que ce test permette d'analyser l'ensemble du répertoire, tous les niveaux de diversité ne sont pas observables par cette approche.

Parmi les tests développés pour étudier le répertoire TCR et ses modifications, le test Iotest de Beckman Coulter permet d'étudier, au niveau membranaire, la protéine. Cette technique est simple à mettre en œuvre mais elle ne permet d'analyser que la diversité de 74% des familles de gènes V exprimées à la surface des LT et cette approche ne permet pas d'étudier les réarrangements V-D-J.

La technique Immunoscope développée par l'équipe de Kourilsky (Pannetier *et al.*, 1995) analyse une composante différente qui est la variabilité du CDR3 qui correspond à un degré supplémentaire de diversité au niveau de la région hypervariable CDR3 issue de la jonction entre les gènes V(D)J. Elle permet de déterminer l'homogénéité du répertoire ou à l'opposé l'apparition de clones mettant en évidence une perturbation du répertoire mais ne permet pas de caractériser la séquence du CDR3 (**Figure R-12**).

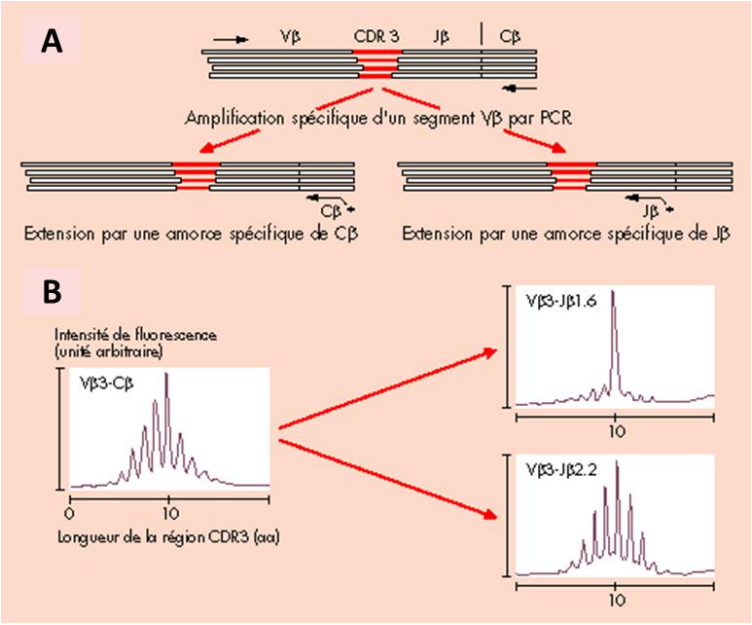


Figure R-12 : Principe de l'analyse du répertoire β par immunoscope d'après Pannetier C (thèse de doctorat, 1996).

En effet, cette approche se base la distribution des différentes tailles de CDR3 et non sur leur séquence. Elle permet une analyse par famille de gènes V grâce à une PCR réalisée entre les gènes V et les gènes C et détecte des longueurs différentes de CDR3. Le substrat utilisé dans la technologie « Immunoscope » est l'ARNm dont l'amplification peut résulter d'une prolifération clonale mais aussi d'une surproduction d'ARNm après activation de la cellule contrairement à l'ADNg utilisé dans notre test qui permet d'être au plus près de la règle 1 réarrangement = 1 cellule. Néanmoins, la quantité d'ARNm cible disponible dans un échantillon est bien supérieure à la quantité d'ADNg cible, ce qui permet une plus grande sensibilité de cette technique. Il reste important de noter que, contrairement à l'ADNg qui est très stable, l'ARNm est une matrice fragile qui demande un traitement beaucoup plus rigoureux afin d'éviter toute dégradation rendant difficile son utilisation en routine médicale.

Le test ImmunTraCkeR qui a été largement présenté dans cette partie permet une analyse par famille de gènes V tout en apportant la résolution des réarrangements V-J. Il est important de rappeler qu'une des caractéristiques du répertoire immunitaire des LT spécifiques d'un Ag est l'utilisation préférentielle des segments de gène du TCR TRAV (gène V du locus α) ou TRAB (gène V du locus β) (Day *et al.,* 2011; Turner *et al.,* 2006). La réponse à un Ag est en partie déterminée par la chaine Vβ utilisée. Il existe donc un biais de sélection qui favorise la reconnaissance d'un Ag particulier.

Chaque réarrangement observé par le test ImmunTraCkeR contient une multitude de CDR3 et l'analyse de la diversité combinatoire actuellement réalisée par le test ImmunTraCkeR ne permet pas d'accéder à la variabilité du CDR3. Comme je l'ai évoqué dans ces résultats, la seule technologie permettant d'identifier à la fois les gènes V(D)J utilisés et la séquence hypervariable CDR3 qui définit la spécificité du récepteur T est le séquençage à haut débit. L'identification des séquences CDR3 est essentiellement utilisée pour la détection des maladies résiduelles chez des patients atteints de leucémie (Logan *et al.,* 2011) et permet l'identification et le suivi du clone pathogène au cours du traitement de la pathologie.
Le séquençage devrait permettre la validation du bio-marqueur « divpénie » indépendamment de la technologie utilisée puisqu'il est, en théorie, possible de calculer la diversité combinatoire à partir des résultats de séquençage. Il sera ainsi possible de comparer les résultats des deux technologies et valider la « divpénie » en tant que bio-marqueur.

Article 1

Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice.

La moitié de la diversité combinatoire du répertoire des cellules T est défini au niveau génétique chez l'Homme et la souris humanisée.

Auteurs: Hang-Phuong Pham, Manuarii Manuel, Sylvia Cohen-Kaminsky, David Klatzmann, Adrien Six, and Gilles Marodon.

Eur J Immunol. 2011 Nov 22

6. Article n°1

Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice.

La moitié de la diversité combinatoire du répertoire des cellules T est défini au niveau génétique chez l'Homme et la souris humanisée.

Auteurs: Hang-Phuong Pham, Manuarii Manuel, Sylvia Cohen-Kaminsky, David Klatzmann, Adrien Six, and Gilles Marodon.

Problématique L'injection de cellules souches $CD34^+$ purifiées de sang de cordon dans des souris NOD.SCID.gc^{null} (NSG) permet de générer une souris humanisée reconstituée avec des LT humains. Ce modèle constitue une nouvelle stratégie pour développer un modèle d'analyse d'infection par le VIH chez la souris mais nécessite l'évaluation de la pertinence du modèle d'un point de vue immunologique. Nous avons démontré que les LT humains générés dans les souris NSG possèdent une large diversité de leur répertoire TCR (Marodon *et al.*, 2009) permettant la génération d'une réponse immune fonctionnelle contre des antigènes du virus de l'hépatite C (VHC). Nous avons ainsi montré dans un article précédent que le modèle pouvait être intéressant pour étudier la composante cellulaire de la réponse immune anti-VIH.
Dans ce modèle murin humanisé, le répertoire d'animaux différents est issu de progéniteurs humains génétiquement identiques puisque plusieurs souris ont été injectées avec des cellules provenant d'un même individu. Lors de ce travail, nous avons profité de l'opportunité offerte par ce modèle de mettre en évidence le déterminisme génétique de la formation du répertoire des TCR indépendamment de l'environnement en comparant le répertoire humain à celui des souris humanisées.
Nous avons utilisé la technologie ImmunID décrite dans le §4 pour étudier la diversité combinatoire du TCR et comparer la contribution de chaque réarrangement chez l'Homme et dans le modèle murin NSG humanisé. Ces analyses nous ont permis de valider les résultats publiés précédemment selon lesquels la distribution des réarrangements V-J du modèle murin humanisé est comparable à celle du donneur.
Afin d'exploiter ces données plus en profondeur, nous avons utilisé un modèle statistique et des méthodes d'analyse inspirées des analyses microarray pour comparer le répertoire Humain au répertoire des souris humanisées. Après normalisation, les données ont été soumises à l'algorithme ISEApeaks développé par le Pr Adrien SIX pour évaluer et comparer la perturbation des répertoires TCR. Ceci a permis de quantifier et comparer la distribution des réarrangements V-J afin d'évaluer si le répertoire humain est oui ou non plus perturbé dans le modèle murin que chez l'Homme. Cette approche nous a permis de mettre en évidence un recouvrement de la moitié des familles hTRBV chez l'Homme et la souris NSG humanisée. Une seconde méthode d'analyse multivariée a permis de valider ces résultats et d'établir que plus de 40% des réarrangements V-J sont conservés entre homme et souris humanisées.
Ces résultats suggèrent donc une influence prépondérante du déterminisme génétique indépendamment de l'environnement dans la représentation des réarrangements V-J des TCR

chez l'homme. La forte représentation de certains réarrangements V-J chez l'Homme et les souris humanisées suggère un mécanisme de sélection identique indépendamment du génotype du donneur et de l'historique immunologique du sujet.

These are not the final page numbers

European Journal of Immunology

Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice

Hang-Phuong Pham[1,2], *Manuarii Manuel*[4], *Nicolas Petit*[1,2,3], *David Klatzmann*[1,2,3], *Sylvia Cohen-Kaminsky*[5,6], *Adrien Six*[1,2] *Gilles Marodon*[1,2,3]

[1] UPMC Univ Paris 06, UMR 7211, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris, France
[2] Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, UMR 7211, Hôpital La Pitié-Salpêtrière Paris, France
[3] INSERM, U959, Hôpital La Pitié-Salpêtrière Paris, France
[4] ImmunID Tech. CEA/iRTSSV, Grenoble, France
[5] INSERM UMR S-999, LabEx LERMIT, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France
[6] Université Paris Sud, Faculté de Médecine Kremlin Bicêtre, Orsay, France

In humanized mice, the T-cell repertoire is derived from genetically identical human progenitors in distinct animals. Thus, careful comparison of the T-cell repertoires of humanized mice with those of humans may reveal the contribution of genetic determinism on T-cell repertoire formation. Here, we performed a comprehensive assessment of the distribution of V-J combinations of the human β chain of the T-cell receptor (hTRBV) in NOD.SCID.$\gamma c^{-/-}$ (NSG) humanized mice. We observed that numerous V-J combinations were equally distributed in the thymus and in the periphery of humanized mice compared with human references. A global analysis of the data, comparing repertoire perturbation indices in humanized NSG mice and unrelated human PBMCs, reveals that 50% of the hTRBV families significantly overlapped. Using multivariate ranking and bootstrap analyses, we found that 18% of all possible V-J combinations contributed close to 50% of the expressed diversity, with significant over-representation of BV5-J1.1+1.2 and BV6-J1.1+1.2 rearrangements. Finally, comparison of $CD3^-$ and $CD3^+$ thymocyte repertoires indicated that the observed V-J combination overlap was already present before TCR-MHC selection in the thymus. Altogether, our results show that half of the T-cell repertoire combinatorial diversity in humans is genetically determined.

Key words: Humanized mice · ISEApeaks · Multivariate score · T-cell repertoire · V-J rearrangements

Supporting Information available online

Introduction

T-cell repertoire diversity is based upon tightly ordered genetic rearrangements of the T-cell receptor V, D and J genes. The available numbers of these genes in the genome constitutes a first level of diversity: to date, 33 and 65 genes encoding variable elements of the human T-cell receptor β chain (hTRBV) from 30 hTRBV families have been characterized in mice and humans respectively (according to the ImMunoGeneTics (IMGT) database (http://www.imgt.org)). An additional level of diversity comes from the association of single V, (D) and J elements together. The major determinant of repertoire diversity is then random addition of nucleotides at the junction of these V(D)J gene segments, constituting the CDR3 of the TCR. Finally, a fourth level of complexity originates from the association of the rearranged α and β chains of the TCR. In theory, these sequential processes occurring during T-cell differentiation in the thymus could

Correspondence: Dr. Gilles Marodon
e-mail: gilles.marodon@upmc.fr

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

generate up to 10^{15} different TCRs, a number far in excess of the number of T-cells in the body. The 'real' size of the repertoire is probably much lower though, with recent estimations of unique TCR β chains ranging from 10^6 to 4.10^6 in humans [1, 2].

Mice reconstituted with a human immune system generated from hematopoietic precursors represent a new animal model for human immunology studies. The extent of the human T-cell repertoire diversity generated in mice may represent an important functional indicator [3], useful for immunological studies in the models. However, although some studies have reported on the TCR repertoire diversity of humanized mice [4, 5], a comprehensive analysis of T-cell repertoire combinatorial diversity in humanized mice is lacking. We believe that this analysis is relevant since it may provide new information about the rules governing V-J combinations distribution in humans. Indeed, in humanized mice, the T-cell repertoire develops in a unique setting of T-cell reconstitution from genetically identical progenitors in distinct living entities raised in similar environmental conditions. In particular, the influence of genetic determinism regulating V-J combination distribution in the human T-cell repertoire should be revealed by the degree of conservation in the distribution of these V-J combinations in humans and humanized mice. In this line, an interesting study recently proposed a numerical model of mouse TCR Vα/Jα gene accessibility that pointed out unbalanced V-J associations resulting from preferential access to gene rearrangements [6]. Despite studies using high-throughput sequencing of TCR β chains [2, 7–9], a global view on the distribution of V-J rearrangement combinations of the TCR β chain in humans was lacking. Here, we have reanalyzed T-cell repertoire data that we generated in humanized NOD.SCID.$\gamma c^{-/-}$ (NSG) mice [5] with the aim to determine the extent of the overlap between the T-cell repertoire of humans and humanized mice at the level of V-J rearrangements. In order to reveal the underlying structure of this complex data set, we applied an original combination of statistical and bioinformatics tools, including multivariate ranking and bootstrap analysis for credibility and confidence assessment. As recently reviewed [10], our report represents an example of an advanced statistical modeling scheme necessary to get an integrated understanding of the extent and complexity of immune repertoire differentiation and diversity. The results from this analysis reveal that the distribution of V-J combinations in humans and humanized mice extensively overlap. This suggests that the combinatorial diversity of the T-cell repertoire in humans is heavily influenced by genetic determinism.

Results

Correlation analysis in the distribution of V-J combinations in the thymus

To compare the distribution of V-J combinations in humanized mice and humans, we used a genomic DNA PCR-based approach detecting 100% of all V-J rearrangements of the TCR β chain. PCR signals were arranged according to the ordering of the hTRBV families in the TCR locus, based on the TCR locus map published in the IMGT database [11]. From this representation, the distribution of the BJ genes within a given hTRBV family appeared quite similar in the thymus of a child and that of a representative NSG mouse (Fig. 1A and B). A similar observation was made in four other thymuses from different cord blood donors (Supporting Information Fig 1A and B). This result illustrates the 'polyclonal' nature of V-J rearrangements in the thymus of humanized mice. The representation of hTRBV genes in the repertoire was however uneven, with significant gaps in the utilization of BV13, BV15 and BV16 families and over-representation of the BV5 and BV6 families, both in the thymus of this child and those of this humanized mouse (Fig. 1A and B). The BV12 family appeared more prominent in NSG mice (Fig. 1B). We calculated the regression coefficient of CB7.1 V-J PCR signals to that of the child control, showing a correlation coefficient R^2 of 0.74 (Fig. 1C). A similar correlation coefficient was found for the other samples (Supporting Information Fig. 1B–D). Some highly represented V-J rearrangement combinations were also highly conserved in humans and humanized mice. When calculated on the V PCR signal, the R^2 correlation coefficient reaches 0.94 (Fig. 1D). In summary, the representation of V-J combination distribution in the thymus of NSG mice was comparable to the human donor.

Correlation analysis in the distribution of V-J combinations in the periphery

To go further into the comparison of T-cell repertoires in humans and humanized mice, we evaluated the overall correlation between the mean values of the PCR signal for each V-J combination obtained in series of sorted hCD45$^+$CD3$^+$ T cells from spleens of humanized mice and human PBMCs (Fig. 2). Our analysis included 14 NSG mice from 10 to 24 weeks post-reconstitution and 5 human PBMCs of reference in four independent experiments. Surprisingly, there was a significant correlation between the two types of repertoires ($R^2 = 0.40$, $p<0.0001$). The biological significance of this statistic is however uncertain since the low p-value may simply be due to the large number of samples analyzed. Nevertheless, the V6-J1.1+1.2 rearrangements were the most abundant in both human samples and NSG mice but V5-J1.1+J1.2, V6-J2.1 and V5-J2.1 were also highly represented and conserved. Altogether, these results suggested that, similar to the thymus, some V-J combinations of the β chain of the TCR were preferentially represented in the peripheral T-cell repertoire of humans and humanized mice.

Lack of evidence for a preferential representation of multigenic V-J combinations

Our results so far showed that some V-J combinations were enriched in the immature and mature human T-cell repertoire of both humans and NSG samples. However, the PCR technology used herein did not discriminate the various members of each hTRBV genes within the family (the BV6 family comprises eight members, for instance). Thus, the over-representation of some

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

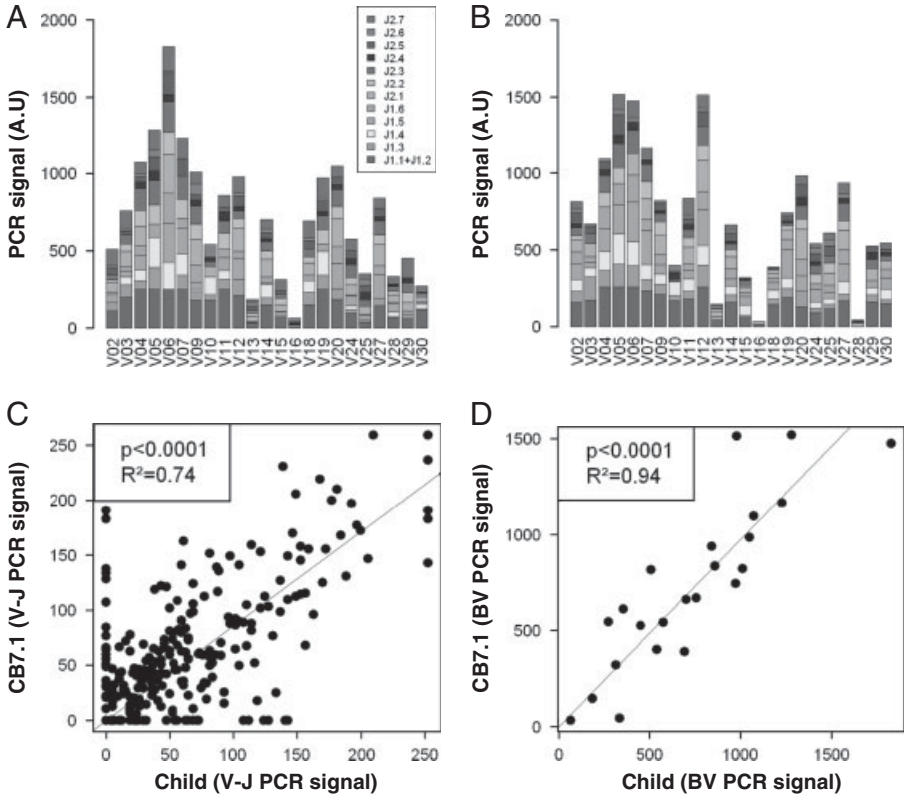


Figure 1. Similar distribution of hTRBV families in the thymus of NSG mice and humans. (A–B) Distribution of BV-BJ rearrangement combinations in the thymus of (A) a single human child and of (B) a representative NSG mouse. Histograms represent the normalized PCR signal value in arbitrary units (A.U) for each V-J combination obtained in individual samples indicated in the figure according to the schematic position of the V gene relative to the constant region following the IMGT nomenclature. The right part of the graph represents the more proximal V genes, whereas the left part of the graph represents the more distal V genes. This representation does not take into account the multigenic composition of some hTRBV families and is only given to illustrate the data in a graphical way. (C–D) Correlation of the BV-BJ distribution of a single human thymus (Child) to a representative CB7.1 NSG thymus for the (C) V-J PCR signals ($R^2 = 0.74$, $p<0.0001$) and (D) BV PCR signals ($R^2 = 0.94$, $p<0.0001$). A total of 6 thymuses from NSG mice were analyzed 10–15 weeks after $CD34^+$ T-cell transfer from 3 unrelated donors with similar results (Supporting Information Fig. 1).

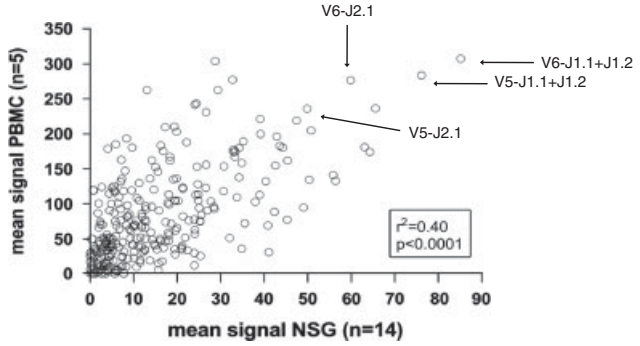


Figure 2. Correlation in the distribution of V-J rearrangements in peripheral $CD3^+$ T cells from NSG mice and humans. Shown are the mean values of the PCR signal determined in humans from PBMCs samples and from sorted human $CD45^+CD3^+$ cells of the spleen of 10–24-week-old NSG mice. PCR signals values were averaged for each BV-BJ combination across all available NSGs or PBMCs samples (the number of samples analyzed *n* is indicated in brackets). Some V-J combinations highly represented in humans and humanized mice are highlighted. Indicated on the graph are r^2 and *p*-value results of a correlation test, as calculated by Prism software.

V-J combinations in the repertoire may just reflect the addition of the PCR signals detecting multiple members of a given hTRBV family. To address this point, we turned to a direct quantification of the various members of a given hTRBV family by flow cytometry in NSGs, PBMCs and cord blood (CB) samples (Fig. 3A). In humanized mice and in humans, we showed at the cell surface that the BV6 and BV5 variable elements were abundantly expressed and highly conserved, confirming our molecular data (Fig. 3B). Noteworthy, for all hTRBV members tested, we observed a comparable frequency across NSGs, PBMCs or CB samples (Fig. 3C). The results indicate that the BV6.6, BV6.5 and BV6.2/6.3 hTRBV chains were evenly represented within the BV6 family. In contrast, the BV5.1 member contributed to 75% of the total frequency of the three BV5 members analyzed. Similar results were observed in $CD8^+$ T cells (Fig. 3D). Thus, the representation of a given BV within a BV family could be uneven, suggesting that the PCR signal may reflect preferential usage of a single member. Furthermore, rearrangements belonging to the BV7 family (which comprise seven members) were not preferen-

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

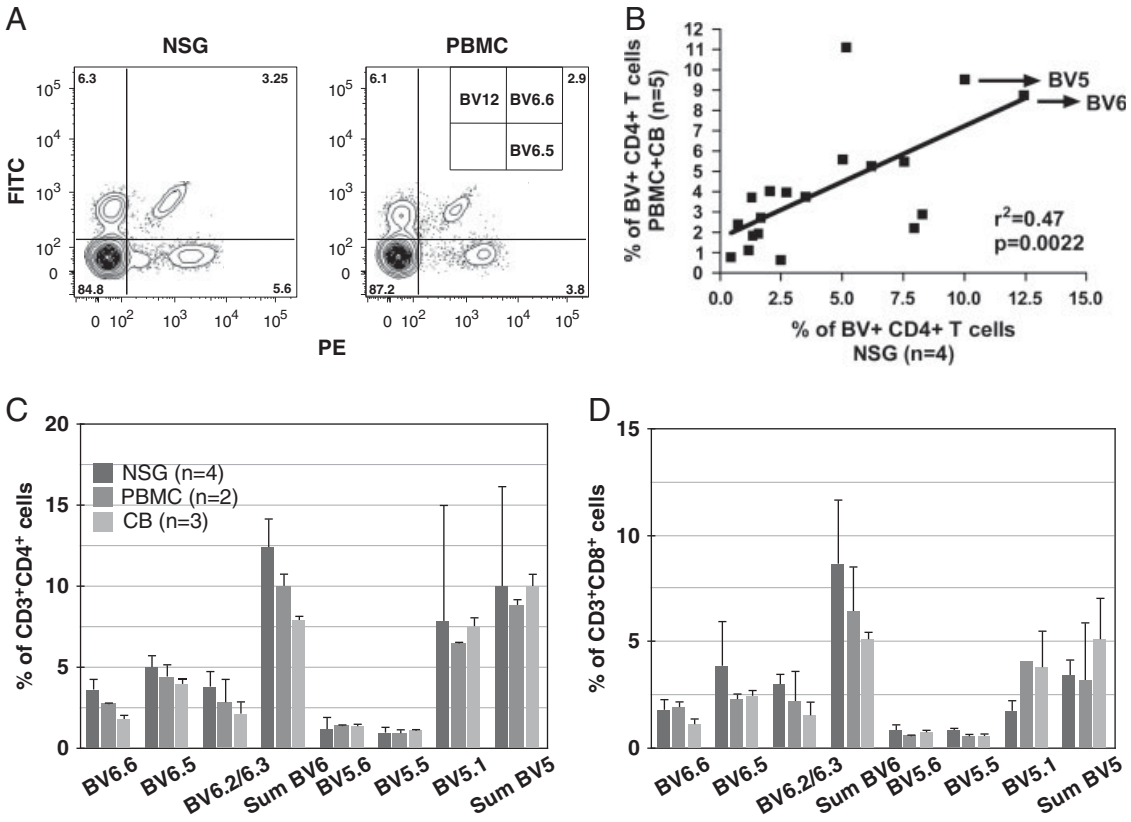


Figure 3. Quantification of the hTRBV repertoire at the cell surface in peripheral T cells from NSG mice and humans. (A) Representative profile of the indicated hTRBV genes (see insert in the PBMC profile) expressed at the cell surface of gated $CD45^+CD4^+$ T cells in a PBMC sample (right) and in the spleen of a NSG mouse 25 weeks after reconstitution (left). Cell suspensions were stained with CD45, CD3, CD4, CD8 and BV-specific mAbs labeled with FITC, PE or a combination of the two, allowing frequencies of 3 BV-expressing T cells to be measured in a single tube. (B) Correlation analysis between the mean frequency of BV-expressing $CD4^+$ T cells in 4 NSG mice and in 5 human samples (pool of 2 PBMCs and 3 cord blood (CB) samples). The linear regression best curve-fit is shown as well as the r^2 and the p-value. Highly expressed BV+ cells are annotated in the figure. Frequencies of the different members of BV4, BV5 and BV6 families detected by flow cytometry were pooled for this mean calculation. (C–D) The frequencies of the indicated BV-expressing cells in (C) $CD3^+CD4^+$ and (D) $CD3^+CD8^+$ T cells from humanized NSGs (deep gray), human PBMCs (gray) and human CB cells (light gray) are shown. The sum of the frequencies of the detected members of the BV5- and BV6-families is indicated. Data are shown as mean+SD of the indicated number of samples in a single experiment.

tially represented in the repertoire of NSG mice (Supporting Information Fig. 2). Therefore, we did not find a strict correlation between the number of genes within a family and the representation of this family in the repertoire. Altogether, these results show that an effect of the number of members within a family is unlikely to explain solely the higher V-J combination frequency of some hTRBV families depicted in Fig. 2.

Overall similarities in the distribution of V-J combinations in humans and humanized mice

In order to gain a global view on the distribution of V-J combinations in humans and humanized mice, we performed a statistical modeling of these data, using analysis tools and software borrowed from microarray analysis. Indeed, we sought for conserved (or variable) expression patterns in two data sets (humans and humanized mice), a typical statistical hypothesis tested in transcriptome analysis. We first investigated the overall similarity in V-J distribution in humans and humanized mice.

In order to normalize the data, which tended to cluster according to the experiment (Supporting Information Fig. 3A), we used the quantile normalization method that weights the signal values by the median of each rearrangement (Supporting Information Fig. 3B) [12]. We then applied the ISEApeaks algorithm developed by one author of this study to evaluate the comparative repertoire diversity perturbation between samples and groups [13]. Although originally developed to quantify repertoire perturbation assessed by CDR3 length spectratyping (Immunoscope approach) [14], we have adapted here its use to compare the distribution of V-J rearrangement combinations in humans and humanized mice. With this strategy, we addressed the following question: is the distribution of V-J combinations globally more perturbed in humanized mice than in humans? The double-hierarchical clustering heatmap depicted in Fig. 4A represents the perturbation score in the distribution of J elements in each V family and for each sample compared with the mean distribution for PBMCs samples. Regarding clustering of the hTRBV genes, three major groups were observed (Fig. 4A, vertical dendrogram): the distribution of J elements within BV15, 18, 25, 10, 29, 24, 30

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

and 28 was clearly different than the reference for half of the samples (C6, C12, PBMC3, PBMC5, C10, C13, C14, C4, C11, C7 and C8), the other half being closer to the mean. The second group showed perturbation in the distribution of J elements within BV16, 14 and 13 across all samples. Finally, the third group defined unperturbed distribution of V-J combinations across all samples for the 12 remaining V genes. In conclusion, this first analysis shows that V-J combination distribution overlaps between humans and humanized mice for half of the hTCRBV families (representing 70% of the total PCR signal).

Regarding clustering of the samples (Fig. 4A, horizontal dendrogram), two groups were observed but humanized mice or PBMCs samples did not segregate in separate clusters. This observation was confirmed using an independent *k*-means clustering (with $k = 2$ since we compared the two NSGs and PBMCs groups) with Euclidean distance of the ISEApeaks scores: the two clusters did not distinguish PBMCs from NSG samples (Fig. 4B). Thus, the perturbation score, indicative of the global distribution in V-J combinations, did not significantly differ between NSGs and PBMCs samples, further illustrating the high degree of similarities between the two repertoires.

Because our PBMCs of reference were randomly collected during the course of this unsupervised study, the homologies that we described could have been due to chance. We thus compared the distribution of V-J rearrangement combinations generated in humans and mice from the same precursors. For this, we reconstituted four distinct NSG mice with $CD34^+$ precursors originated from CBs from which T cells were also sorted for repertoire study. We then performed ISEApeaks analysis in these four NSG mice using the T-cell repertoire from the CBs as the reference. The result shows that the data clustered in two groups, according to their high or low perturbation scores (Fig. 4C). The group with low perturbation scores included 11 hTRBV genes that represented 76% of the total signal, in close agreement with the 70% value calculated using PBMCs as the reference (Fig. 4A). Out of these 11 hTRBV genes, 8 also belong to the 12 hTRBV genes identified in Fig. 4A. This overlap has a probability of less than one in a hundredth to occur by chance ($p = 0.009$ as calculated

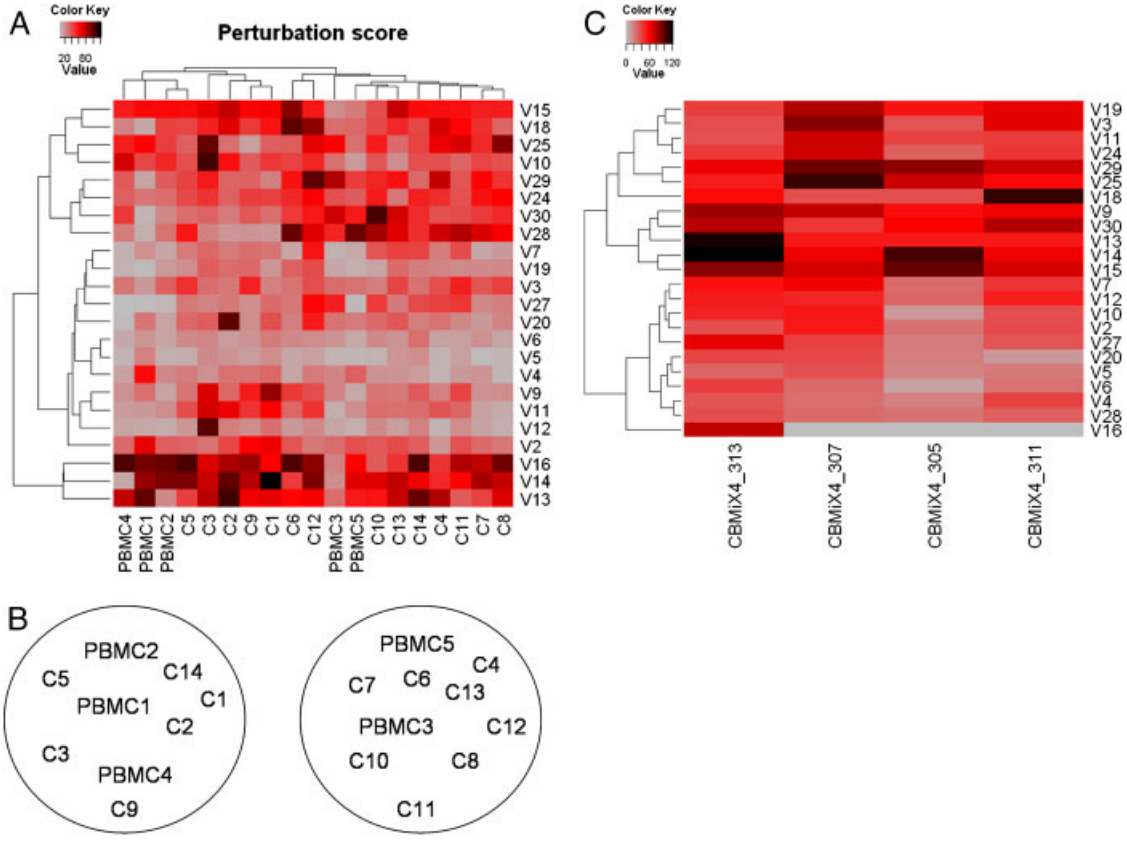


Figure 4. A global analysis in the distribution of V-J rearrangement combinations in humans and humanized mice using perturbation scores. (A) The heatmap represents the perturbation score values (indicated in the legend according to a color key) for each sample of humanized mice (C1 to C14) and each PBMC sample (PBMC1 to PBMC5), listed in the columns, for each V family (V2 to V30, listed in the rows) relative to the mean distribution of V-J combinations for the five human PBMCs samples. The perturbation score represents the difference separating the normalized PCR value of a given sample from the PCR value obtained in the T-cell repertoire of reference for each V-J combination of a given hTRBV family. (B) Partitioning of the perturbation score shown in (A) according to the *k*-means algorithm with $k = 2$, since we compared NSG mice with human PBMCs. (C) The heatmap represents the perturbation score (values indicated in the legend according to color key) of the T-cell repertoire combinatorial diversity of 4 NSG mice (columns) relative to the T-cell repertoire of reference, here purified $CD3^+$ T cells from the 2 cord blood samples that were used to purify $CD34^+$ cells to reconstitute the 4 mice. The perturbation scores were calculated as in (A). C1 to C14 reconstituted NSG mice were obtained from 3 independent experiments for a total of 5 cord blood donors.

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

according to a hyper-geometric distribution). Thus, a large proportion of the T-cell repertoire determined in NSG mice overlapped with the human T-cell repertoire of reference originated either from genetically identical or unrelated donors.

Identification of the most conserved V-J combinations in humans and humanized mice

We then asked what would be the conserved V-J combinations that best explain this overlap and what their contribution would be to the overall repertoire. For this, we first calculated a multivariate score (μ-score) for each V-J combination based on the normalized PCR signals, as originally proposed by Wittkowski et al. for clinical studies [15]. The principle of this multivariate calculation is detailed in Supporting Information Fig. 4. The multivariate score allows the ranking of each V-J combination across the 19 samples simultaneously – in contrast of simply considering the average signal – as represented in the heatmap of Fig. 5A. We first considered rearrangements at top (above third quartile) as highly expressed, and rearrangements at bottom (below first quartile) as weakly expressed. We then statistically assessed such 'conserved' V-J rearrangement combinations by computing their μ-score confidence interval by applying bootstrap analysis originally described by Efron [16]. The detailed computational methodology of the bootstrap analysis can be found in *Materials and methods* and in Supporting Information Fig. 5. Briefly, we re-sampled with replacement 1000 randomly data sets from the 19 original samples. For each bootstrapped data set, we computed μ-scores to determine conserved rearrangements. As summarized in Supporting Information Tables 1 and 2, we could thus measure, over the 1000 drawings, the significance of the original μ-score (credibility index and confidence interval). Therefore, this statistical analysis allowed identifying significantly conserved V-J rearrangement combinations (either highly or poorly represented) in both humans and humanized mice.

With a credibility index cut-off set at 0.9, 50 V-J rearrangement combinations were highly represented and conserved (Supporting Information Table 1), confirming the ISEApeaks analysis showed in Fig. 4A. We validated the over-representation of V-J combinations such as V6-J1.1+1.2 (ranked first), V6-J2.1, or V5-J2.1 (see Fig. 2) and identified several others. As expected from a random usage of hTRBV families, 14 out of 23 existing hTRBV families were represented in these 50 V-J combinations. However, these 14 hTRBV families were not evenly represented in the 50 V-J rearrangements identified by our analysis: the BV5 family contributed the most (18%) followed by BV6 (16%), BV4 and BV12 (12% each), BV19 (10%) and BV9 (8%). Thus, 76% of the 50 most represented V-J combinations belong to only six hTRBV families, including two monogenic families (BV19 and BV9).

Conversely, we identified 43 V-J combinations that were weakly represented or absent in both humans and humanized mice (Supporting Information Table 2). These rare rearrangement combinations belong to 13 hTRBV families: the BV14 family contributed the most (23%), followed by BV16 (21%), BV15 (16%) and BV18 and BV25 (9% each). Thus, 60% of the least-frequent V-J combinations belong to three hTRBV families (BV14, 15 and 16).

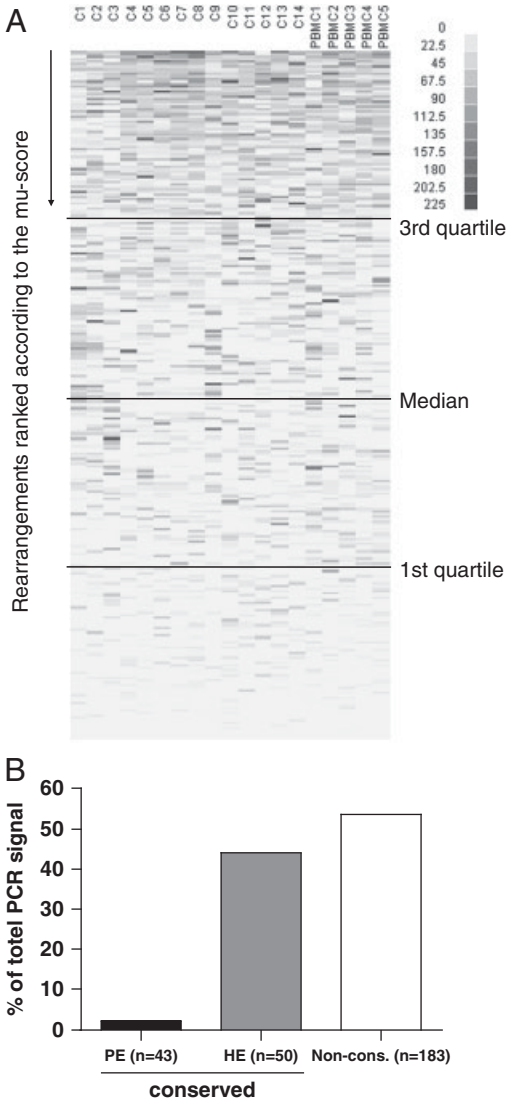


Figure 5. Multivariate ranking and bootstrap analysis reveal the contribution of conserved V-J rearrangement combinations to the overall human T-cell repertoire. (A) Multivariate score ranking of 276 V-J rearrangement combinations in humans and humanized mice. The heat map shows rankings according to the multivariate score of normalized intensity PCR data from 276 V-J combinations (rows) in 14 humanized mice (C1 to C14) and 5 human (PBMC1 to PBMC5) samples, shown in the columns. The grayscale values of the normalized PCR signals are depicted in the legend. (B) Contribution of conserved and non-conserved V-J combinations to the available human T-cell repertoire. The graph depicts the contribution of V-J combinations of the indicated groups to the available T-cell repertoire in percentage. The percentage represents the ratio of the sum of the PCR signals on normalized values for each group relative to the sum of the overall PCR signal for 276 combinations in 19 samples. The groups originate from the bootstrap analysis of 19 human or humanized mice samples, as described in the text: PE, poorly expressed; HE, highly expressed, Non-cons., non-conserved ($c \leq 0.9$), conserved ($c > 0.9$). n = number of V-J combinations belonging to each group (see also legend of Supporting Information Table 1).

We next calculated the contribution of these conserved V-J rearrangement combinations to the overall human T-cell combi-

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

natorial diversity (Fig. 5B). We found that the 50 V-J rearrangements defined above (18% of the 276 possible V-J rearrangement combinations) accounted for 44% of the mean PCR signal across all samples and rearrangements. The 43 V-J combinations (16%) that were weakly represented or absent in humans and humanized mice contributed to only 2% of the total repertoire. The remaining 183 V-J combinations (66%), contributing to 54% of the measured diversity, appeared rather stochastically represented across humans and humanized mice. Altogether, our results showed that 34% of all possible V-J rearrangement combinations exhibit a conserved expression pattern in humans and humanized mice, accounting for 46% of the available combinatorial diversity.

Comparison in the distribution of V-J rearrangements at the pre- and post-selection stage

The conserved usage of several V-J rearrangements in humans and humanized mice suggests a common mechanism for selection of these rearrangements. This positive selection may have arisen as a result of contacts between conserved residues of the TCR and non-polymorphic regions of the MHC molecules, as proposed [17]. Alternatively, the distribution of these conserved rearrangements might be genetically programmed, independently of TCR-MHC interactions. In order to test this latter possibility, we compared the distribution of V-J rearrangements in $CD3^-$ cells in the thymus of humanized mice, i.e. before TCR-MHC-driven selection, and in mature $CD3^+$ cells of the periphery, i.e. after TCR-MHC selection. Visually, the distribution of V-J rearrangements was very similar in $CD3^-$ thymocytes (Fig. 6A) and in peripheral $CD3^+$ cells (Fig. 6B), with over-representation of V genes belonging to the V4, V5 and V6 families and under-representation of the V16 gene, as already noticed in total thymocytes (Fig. 1). On average, the distribution of V-J rearrangements before selection was positively correlated to the distribution after selection (Fig. 6C). This result suggests that the distribution of V-J rearrangements was already set at the pre-selection stage in the thymus of humanized mice.

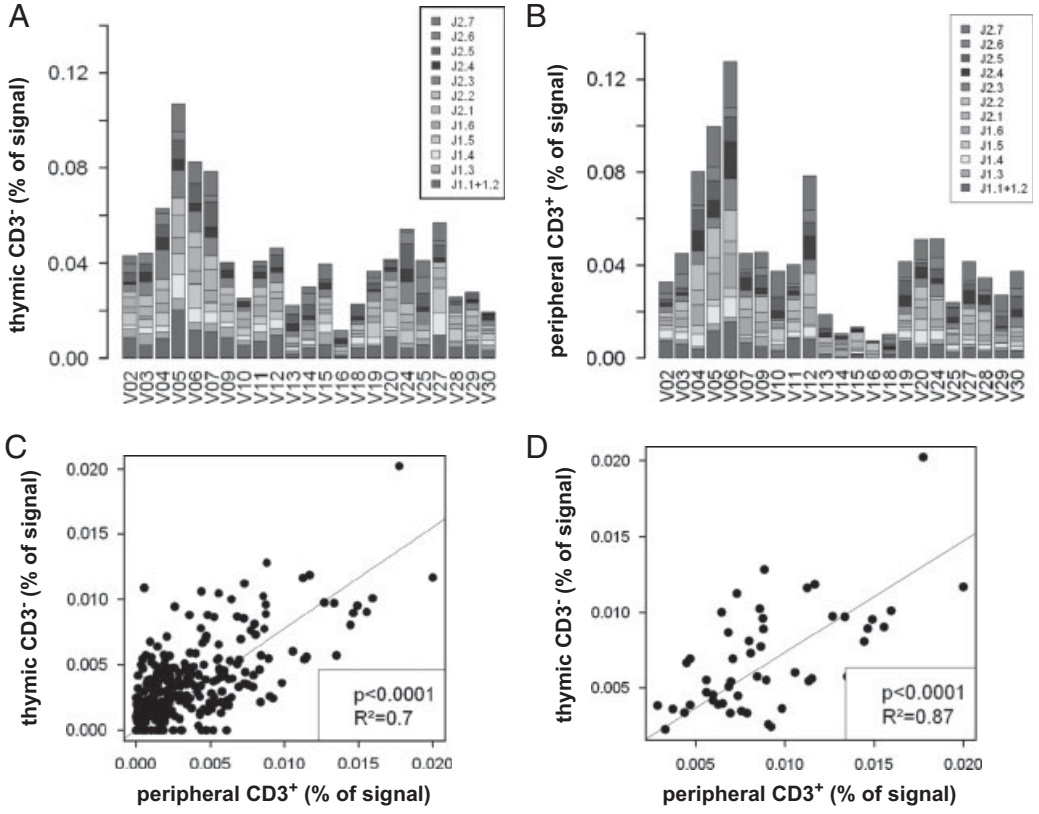


Figure 6. Correlation analysis of the pre- and post-selected human T-cell repertoire in the thymus of humanized NSG mice. (A–B) Histograms represent the mean percentages of the PCR signal value for each V to J combination relative to the overall PCR signal, according to the position of the V gene relative to the constant region in (A) the thymus and (B) the spleen of humanized NSG mice. (A) Results are from 5 thymus from NSG mice 13 weeks post-injection of $CD34^+$ CB cells from two different donors. Because numbers of $CD3^-$ cells from the thymus of humanized mice were too low for individual analysis, samples from 2 or 3 thymus were pooled before PCR. (B) Results are from 14 spleens of humanized NSG mice reconstituted with 5 different human donors 10–24 week post-injection. (C) Correlation in the distribution of V-J rearrangements in $CD3^-$ cells from the thymus with $CD3^+$ cells from the spleens of humanized NSG mice. The contribution of each rearrangement to the total signal (% of signal) for sorted $CD45^+CD3^-$ cells from the thymus of NSG mice (thymic CD3−($n = 5$)) was calculated and compared with the percentage of the signal obtained in $CD45^+CD3^+$ human splenocytes (peripheral $CD3^+$, $n = 14$). (D) Same analysis than in (C) except only the 50 V-J rearrangements identified as highly expressed and conserved in Fig. 5 were taken into account. Indicated on the graphs are the p-value and the coefficient R^2 of a correlation test, as calculated by the Prism software.

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

This was further illustrated by a more pronounced correlation ($R^2 = 0.87$) between the two subsets when the 50 conserved V-J rearrangements identified by the bootstrap analysis were analyzed (Fig. 6D). This result was not an artifact of humanized mice since it was also observed in a comparison of $CD3^-$ and $CD3^+$ cells from a human thymus (Supporting Information Fig 6). Thus, the distribution of V-J rearrangements is set, in part, before TCR-MHC driven selection in the thymus.

Discussion

Our present results confirm in much greater details the high level of TCR repertoire diversity in humanized mice reconstituted with cord blood progenitors [5]. Thus, the model of humanized mice should be considered for experimental studies in which the extent of T-cell repertoire diversity is of major importance. These would include vaccination [18], infectious [19, 20], transplantation [21] or cancer studies [22]. Given the recent progress in the development of new strains of immunodeficient mice in which human T-cell reconstitution and functionality are improved [23], it is expected that high conservation of the repertoire, as reported herein in 'first generation' humanized mice, will also apply to subsequent models.

A key question is whether the conservation that we report here at the level of V-J combinatorial diversity in humans and humanized mice would also be visible at the level of CDR3 sequences. It is reasonable to assume that similar distributions of V-J combinations in humans and humanized mice may translate into similar distributions of CDR3 sequences as well. However, previous work assessing CDR3 repertoire diversity by PCR spectratyping reported poor repertoire diversity in reconstituted NSG mice [4], in apparent disagreement with our hypothesis. A major difference, however, is that the whole spleen was subjected to CDR3 spectratyping in the former study whereas we sorted human $CD3^+$ cells before analysis for semi-quantitative PCR. We therefore believe that the poor CDR3 spectratyping complexity score reported in this study reflected a limiting number of targets rather than a poor CDR3 diversity. This idea is further supported by the fact that IL-7 adjunction greatly improved both T-cell reconstitution and repertoire diversity [4]. Using pyrosequencing, Warren et al. recently described limited conservation of CDR3 sequences among human individuals (around 1%) [8]. However, when converted into amino acid sequences, the conservation appeared much higher with up to 14.2% homology between two unrelated donors [8]. Furthermore, a recent study argue that $>24.5\%$ of the naïve TCRβ amino acid repertoire was shared with at least another donor of the study [9]. These results are in line with our observation that a significant portion of the repertoire is shared among different human donors and humanized mice.

The homogeneity of the repertoires and the existence of conserved, as well as missing, combinations indicate that the repertoire formation in humans and humanized mice obey similar rules. Furthermore, the high representation of some V-J combinations in humans and in humanized mice suggests a similar mechanism of selection, independently of the donor genotype and/or of the immunological history of the subject. In that regard, it is striking to note that, in the few studies that describe public TCR (T-cell clones conserved in various human afflictions among different patients), most belong to highly conserved hTRBV families that we describe here (the BV19 gene for Influenza infection [24], the BV6 family for HCMV [25] and SIV [26] infections, and the BV20 gene for EBV infection [27, 28]. This correlation is not restricted to viral infections since the BV4 and BV12 families are also commonly used in autoimmune anti-phospholipid syndrome [29]). Hence, public TCR reported in the literature may have a probabilistic advantage to expand after antigenic stimulation simply because they belong to highly represented V-J rearrangement combinations. In another set of experiments, T-cell repertoires were compared in either genetically related or unrelated adult donors by flow cytometry [30]. These investigators confirmed a limited role of HLA haplotype and of the environment in shaping the T-cell repertoire. The contribution of endogenous factors to the composition of the hTRBV chain repertoire was proposed to be around 50%, in close agreement with our own estimation based on a totally different set of data and repertoire diversity evaluation technology. Altogether, these results concur with the hypothesis that the underlying rules governing the establishment of the human T-cell repertoire might be less random than previously thought.

Indeed, accumulating evidence since the pioneering work of Pannetier et al. [31] suggest that there is an inherent bias in the TCR to react with some conserved regions of the MHC molecules, outside of the peptide-binding groove, allowing the 'right' docking of the TCR with MHC molecules for efficient selection [17, 32, 33]. Recent functional data revealed the important role of Y at position 48 of the hTRBV chain in T-cell positive selection, through contacts with the α domains of both class I and class II MHC molecules [17, 34]. Strikingly, the BV5 genes (highly expressed both in humans and humanized mice) present this Y at position 48. Likewise, it has been reported that the BV6 family contacts the MHC molecules in two instances at position 29 of the CDR1 and at position 54 of the CDR2 [33]. Thus, based on these examples, it is tempting to speculate that contacts between evolutionary-conserved residues in the TCR and MHC molecules during thymic positive selection may explain the high proportion of some hTRBV families in the mature T-cell repertoire. However, we observed that the preferential usage of some hTRBV families (BV4, BV5 and BV6 families, for instance) was set before TCR-MHC-driven thymic selection. This result argues in favor of genetic mechanisms affecting the T-cell repertoire before MHC-mediated thymic selection. These may include mechanisms owing to TCRβ locus factors, such as the number of BV genes per family, epigenetic locus accessibility, accessibility of the recombination signal sequences (RSS) to recombinases, promoter activities or variations in RSS. At present, it is difficult to weigh the contribution of these various mechanisms to the selection of particular V-J rearrangement combinations in the human T-cell repertoire. As presented in Fig. 3 and Supporting Information Fig. 2, the higher number of available genes within commonly used hTRBV families is unlikely to be the only expla-

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

nation. We also think it is unlikely that genomic localization of the highly expressed V genes greatly impacted on their representation since both proximal (relative to the constant region) (such as BV19) and distal V genes (such as BV9) were found over-represented in the repertoire. This may not need to be the case for poorly represented V-J rearrangement combinations since we described here that they belong mostly to BV14, 15 and BV16 families, three clustered BV families on hTCRβ locus. A speculative possibility is that evolution has favored the use of BV4, BV5 and BV6 families because they possess hitherto reactivity with conserved residues of MHC molecules, for the reasons described above. In this perspective, thymic selection would 'fine-tune' evolutionary-imposed V-J combinations belonging to BV4, BV5 BV families and others. Thymic selection would impact more on the randomly generated repertoire in the thymus, which is observed for 50% of all possible rearrangements. This delicate blend between constrained and random selection of V-J rearrangements might be at the root of the adaptive immune system to operate on a changing, yet more or less constant, environment.

Materials and methods

Human lymphoid tissue samples

Thymic sample from a child undergoing corrective cardiovascular surgery has been obtained at the Centre Chirurgical Marie-Lannelongue (CCML, Service de Chirurgie Thoracique, Le Plessis Robinson, France), after informed consent of parents. Umbilical cord blood was obtained from the maternity of the Hôpital de la Pitié-Salpétrière after informed consent of the mother. PBMCs were obtained from healthy blood donors at the Etablissement Français du Sang of the Hôpital de la Pitié-Salpétrière.

Mice and reconstitution

The detailed protocol has been published previously [5]. Briefly, NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg$^{tm1Wjl/SzJ}$ (NSG) (stock 005557, The Jackson Laboratory) mice were bred in our own animal facilities in Specific Pathogen-Free conditions (accreditation number from the Veterinary services: A75-13-10). Umbilical cord blood mononuclear cells were enriched on a Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Quentin, France) gradient. Hematopoietic progenitors expressing CD34 were sorted using the CD34 CliniMacs purification kit (Miltenyi Biotech, Paris, France) according to manufacturer's instructions. 24–48 h-old NSG neonate mice were irradiated at 1 Gray and 10^5 to 3.10^5 purified human CD34$^+$ cells were directly injected in the liver using a 300-μL insulin syringe (Terumo, Tokyo, Japan) to generate humanized NSG mice.

Combinatorial diversity analysis

Throughout this study, the hTRBV genes were designated according to the international ImMunoGeneTics information system (http://www.imgt.org). Detailed protocols have been published previously [35]. Briefly, genomic DNA was extracted from human CD45$^+$ CD3$^+$ cells sorted on an FACSAria (Becton Dickinson, le Pont-de-Claix, France) with purity greater than 90% from mouse spleen or from mononuclear peripheral blood cells in humans after informed consent. Thymus sample from a child undergoing corrective cardiovascular surgery has been previously described [5]. Multiplex PCR was performed as described [5]. Quantile normalized data were used for repertoire perturbation analysis with the ISEApeaks software platform as described by Collette et al. [13].

Flow cytometry

For flow cytometry analysis of the T-cell repertoire, we used the IOTest® Beta mark (Beckman Coulter) in conjunction with the following mAbs: CD45-allophycocyanin (BD), CD4-PerCp (BD), CD8-Alexa700 (Biolegend); CD3-PE-Cy7 (eBioscience, San Diego, CA). Up to 10^6 cells were stained with optimal quantity of directly labeled mAbs at room temperature for 20 min under gentle shaking with 100 μL of the mix containing all of the mAbs of interest diluted in sterile PBS SVF 3%. Data were acquired on an LSRII flow cytometer using DiVA software (BD) and analyzed with FlowJo (TreeStar, Arshland, Oregon).

Statistical analysis

Two-tailed unpaired *t*-test with 95% confidence intervals, correlation and linear regression statistical analysis were performed using the Prism 4.0c for Macintosh (GraphPad software, San Diego, CA) and R. Statistical significant level was fixed at 0.05. For correlation analysis, the *p*-value represents the probability to be mistaken when affirming there is correlation and the R^2 (varies between 0 and 1) indicates the square of the coefficient correlation.

Multivariate score and bootstrap analysis

In order to determine conserved V-J rearrangement combinations (among 276 assessed combinations) according to their representation in humans and humanized mice, we analyzed multivariate data with a non-parametric (distribution-free) method. We computed a score (called μ-score) for each V-J combination across all samples. According to the μ-score distribution over all 276 V-J combinations, conserved and highly represented V-J combinations in both humans and humanized mice could be defined as combinations above the third quartile value (corresponding to the top 25% of μ-score values) and conserved but poorly represented combinations as combinations below the first quartile value (corresponding to the lowest 25% μ-score values). In order to avoid misidentification of conserved V-J combinations, we computed a credibility index (**c**) for each conserved combination, as defined above, by performing bootstrapping analysis: we designed a pseudo-algorithm as follows (Supporting

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

Information Fig. 5): (i) we re-sampled 1000 data sets randomly from the original data set (14 NSGs and 5 PBMCs) with replacement. Thus, the same sample has a chance of being drawn from 0 to 19 times in each drawing. (ii) For each re-sampled data set, μ-scores were recalculated. (iii) For each bootstrap, conserved combinations as described above (above third quartile and below first quartile values) were recorded. (iv) For each conserved V-J combination identified on the original data set, a credibility index **c** was calculated as the frequency at which this combination was found across the 1000 bootstraps. **c** ranges from 0.001 to 1, with $\mathbf{c} = 1$ meaning that a given V-J combination appeared 1000 times in the conserved regions. (v) We finally defined V-J combinations as conserved between humans and humanized mice when their **c** index was at least 0.9. This calculation also allowed computing of a 95% confidence interval for each μ-score. Multivariate scoring calculations and bootstrap analysis were performed with the R software (freely available at www.r-project.org) on a supercomputer (IBM iDataPlex, equipped with 640×2.53 GHz Xeon microprocessors with 2 To of RAM for a total calculation power of 6.5 teraflops).

Acknowledgements: The authors thank Laetitia Mercey, Sofien Dessolin, Claude Baillou and Bruno Gouritin for technical assistance, Dr. Bruno Lucas, Dr. Béhazine Combadière, Dr. Benoît Salomon, Dr. Victor Appay and Pr. Guy Gorochov for stimulating discussions, Nadia Plantier, Solène Perez and Dr. Nicolas Pasqual (ImmunID Tech.) for their help in various aspects of the project, Dr. Michelle Rosenzwajg for the kind gift of reagents used for repertoire analysis by flow cytometry, and Pr. Alain Serraf and his surgical team (Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Service de Chirurgie Thoracique, Le Plessis Robinson, France) for the human thymic sample. Supported by grants from the DIM-Stem Pôle of the Région Ile-de-France, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Association Francaise contre les Myopathies (AFM), and the Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS).

Conflict of interest: M. Manuel is a paid-employee of ImmunID Tech. G. Marodon was supported by ImmunID Tech. to attend an international scientific conference.

References

1 **Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P.,** A direct estimate of the human αβ T cell receptor diversity. *Science* 1999. **286**: 958–961.

2 **Robins, H. S., Campregher, P. V., Srivastava, S. K., Wacher, A., Turtle, C. J., Kahsai, O., Riddell, S. R. et al.,** Comprehensive assessment of T-cell receptor β-chain diversity in αβ T cells. *Blood* 2009. **114**: 4099–4107.

3 **Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. and Messaoudi, I.,** The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. **4**: 123–132.

4 **Shultz, L., Lyons, B., Burzenski, L., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M. et al.,** Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 2005. **174**: 6477–6489.

5 **Marodon, G., Desjardins, D., Mercey, L., Baillou, C., Parent, P., Manuel, M., Caux, C. et al.,** High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.*SCID.gc*$^{-/-}$ mice. Eur. J. Immunol. 2009. **39**: 2136–2145.

6 **Thuderoz, F., Simonet, M.-A., Hansen, O., Pasqual, N., Dariz, A. l., Baum, T. P., Hierle, V. et al.,** Numerical modelling of the V-J combinations of the T cell receptor TRA/TRD locus. *PLoS Comput. Biol.* 2010. **6**: e1000682.

7 **Robins, H. S., Srivastava, S. K., Campregher, P. V., Turtle, C. J., Andriesen, J., Riddell, S. R., Carlson, C. S. et al.,** Overlap and effective size of the human CD8$^+$ T cell receptor repertoire. *Sci. Trans. Med.* 2010. **2**: 47ra64.

8 **Warren, R. L., Freeman, J. D., Zeng, T., Choe, G., Munro, S., Moore, R., Webb, J. R. et al.,** Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. *Genome Res.* 2011. **21**: 790–797.

9 **Venturi, V., Quigley, M. i. F., Greenaway, H. Y., Ng, P. C., Ende, Z. S., McIntosh, T., Asher, T. E. et al.,** A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J. Immunol.* 2011. **186**: 4285–4294.

10 **Boudinot, P., Marriotti-Ferrandiz, M. E., Pasquier, L. D., Benmansour, A., Cazenave, P. A. and Six, A.,** New perspectives for large-scale repertoire analysis of immune receptors. *Mol. Immunol.* 2008. **45**: 2437–2445.

11 **Baum, T.-P., Hierle, V., Pasqual, N., Bellahcene, F., Chaume, D., Lefranc, M.-P., Jouvin-Marche, E. et al.,** IMGT/GeneInfo: T cell receptor gamma TRG and delta TRD genes in database give access to all TR potential V(D)J recombinations. *BMC Bioinformatics* 2006. **7**: 224.

12 **Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. and Speed, T. P.,** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003. **19**: 185–193.

13 **Collette, A. and Six, A.,** ISEApeaks: an Excel platform for GeneScan and Immunoscope data retrieval, management and analysis. *Bioinformatics* 2002. **18**: 329–330.

14 **Pannetier, C., Even, J. and Kourilsky, P.,** T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 1995. **16**: 176–181.

15 **Wittkowski, K. M., Lee, E., Nussbaum, R., Chamian, F. N. and Krueger, J. G.,** Combining several ordinal measures in clinical studies. *Stat. Med.* 2004. **23**: 1579–1592.

16 **Efron, B.,** Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 1979. **7**: 1–26.

17 **Scott-Browne, J. P., White, J., Kappler, J. W., Gapin, L. and Marrack, P.,** Germline-encoded amino acids in the alphabeta T-cell receptor control thymic selection. *Nature* 2009. **458**: 1043–1046.

18 **Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Irie, A., Baba, H. and Nishimura, Y.,** An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2r[gamma]null (NOG) mice. *Immunol. Lett.* 2009. **126**: 67–72.

19 **Brainard, D. M., Seung, E., Frahm, N., Cariappa, A., Bailey, C. C., Hart, W. K., Shin, H.-S. et al.,** Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. *J. Virol.* 2009. **83**: 7305–7321.

20 **Jaiswal, S., Pearson, T., Friberg, H., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Rothman, A. L. and Mathew, A.,** Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized *NOD-scid IL2rg-null* mice. *PLoS One* 2009. **4**: e7251.

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

21 **King, M., Pearson, T., Shultz, L. D., Leif, J., Bottino, R., Trucco, M., Atkinson, M. A. et al.,** A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin. Immunol.* 2008. **126**: 303–314.

22 **Markley, J. C. and Sadelain, M.,** IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood* 2010. **115**: 3508–3519.

23 **Ramer, P. C., Chijioke, O., Meixlsperger, S., Leung, C. S. and Munz, C.,** Mice with human immune system components as in vivo models for infections with human pathogens. *Immunol. Cell. Biol.* 2011. **89**: 408–416.

24 **Lehner, P. J., Wang, E. C., Moss, P. A., Williams, S., Platt, K., Friedman, S. M., Bell, J. I. et al.,** Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 79–91.

25 **Trautmann, L., Rimbert, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V. et al.,** Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J. Immunol.* 2005. **175**: 6123–6132.

26 **Price, D. A., Asher, T. E., Wilson, N. A., Nason, M. C., Brenchley, J. M., Metzler, I. S., Venturi, V. et al.,** Public clonotype usage identifies protective Gag-specific $CD8^+$ T cell responses in SIV infection. *J. Exp. Med.* 2009. **206**: 923–936.

27 **Venturi, V., Chin, H. Y., Asher, T. E., Ladell, K., Scheinberg, P., Bornstein, E., van Bockel, D. et al.,** TCR beta-chain sharing in human $CD8^+$ T cell responses to cytomegalovirus and EBV. *J. Immunol.* 2008. **181**: 7853–7862.

28 **Lim, A., Trautmann, L., Peyrat, M. A., Couedel, C., Davodeau, F., Romagne, F., Kourilsky, P. et al.,** Frequent contribution of T cell clonotypes with public TCR features to the chronic response against a dominant EBV-derived epitope: application to direct detection of their molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire. *J. Immunol.* 2000. **165**: 2001–2011.

29 **Yoshida, K., Arai, T., Kaburaki, J., Ikeda, Y., Kawakami, Y. and Kuwana, M.,** Restricted T-cell receptor beta-chain usage by T cells autoreactive to beta(2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood* 2002. **99**: 2499–2504.

30 **Melenhorst, J. J., Lay, M. D., Price, D. A., Adams, S. D., Zeilah, J., Sosa, E., Hensel, N. F. et al.,** Contribution of TCR-beta locus and HLA to the shape of the mature human Vbeta repertoire. *J. Immunol.* 2008. **180**: 6484–6489.

31 **Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M. and Kourilsky, P.,** The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germline segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993. **90**: 4319–4323.

32 **Zerrahn, J., Held, W. and Raulet, D. H.,** The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997. **88**: 627–636.

33 **Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L. and Kappler, J. W.,** Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. **26**: 171–203.

34 **Feng, D., Bond, C. J., Ely, L. K., Maynard, J. and Garcia, K. C.,** Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction 'codon'. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 975–983.

35 **Pasqual, N., Gallagher, M., Aude-Garcia, C., Loiodice, M., Thuderoz, F., Demongeot, J., Ceredig, R. et al.,** Quantitative and qualitative changes in V-J α rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor α chain repertoire. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 1163–1173.

Abbreviations: **C:** Credibility index · **CB:** cord blood · **NSG:** NOD.SCID.$\gamma c^{-/-}$ · **hTRBV:** variable element of the human TCR β chain

Full correspondence: Dr. Gilles Marodon, UPMC CNRS UMR7211, INSERM U959, 83 Bd de l'Hôpital, Bât CERVI, 75013 PARIS, France
Fax: +33-14-217-7462
e-mail: gilles.marodon@upmc.fr

Additional correspondence: Prof. Adrien Six UPMC CNRS UMR7211, 83 Bd de l'Hôpital, Bât CERVI, 75013 PARIS, France
e-mail: adrien.six@upmc.fr

Received: 27/5/2011
Revised: 26/10/2011
Accepted: 17/11/2011
Accepted article online: 22/11/2011

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

These are not the final page numbers

European Journal of Immunology

Supporting Information

for

DOI 10.1002/eji.201141798

Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice

Hang-Phuong Pham, Manuarii Manuel, Nicolas Petit, David Klatzmann, Sylvia Cohen-Kaminsky, Adrien Six Gilles Marodon

Article 2

Reduction of TCR Diversity (divpenia) and Lymphopenia as Prognostic Factor of Overall Survival in Metastatic Breast Cancer

La réduction de la diversité TCR (divpénie) et la lymphopénie en tant que facteurs pronostiques de survie globale dans le cancer du sein métastatique.

Auteurs: Manuarii Manuel, Olivier Trédan, Thomas Bachelot, Gilles Clapisson, Anaïs Courtier, Gilles Parmentier, Tioka Rabeony, Audrey Grivès, Solène Perez, Jean-François Mouret, David Perol, Sylvie Chabaud, Isabelle Ray-Coquard, Intidhar Labidi-Galy, Pierre Heudel, Jean-Yves Pierga, Christophe Caux, Jean-Yves Blay, Nicolas Pasqual, Christine Ménétrier-Caux.

Article accepté pour publication dans OncoImmunology

7. Article n°2

Reduction of TCR Diversity (divpenia) and Lymphopenia as Prognostic Factor of Overall Survival in Metastatic Breast Cancer

La réduction de la diversité TCR (divpénie) et la lymphopénie en tant que facteurs pronostiques de survie globale dans le cancer du sein métastatique.

Auteurs : Manuarii Manuel, Olivier Trédan, Thomas Bachelot, Gilles Clapisson, Anaïs Courtier, Gilles Parmentier, Tioka Rabeony, Audrey Grivès, Solène Perez, Jean-François Mouret, David Perol, Sylvie Chabaud, Isabelle Ray-Coquard, Intidhar Labidi-Galy, Pierre Heudel, Jean-Yves Pierga, Christophe Caux, Jean-Yves Blay, Nicolas Pasqual, Christine Ménétrier-Caux.

Problématique : plusieurs études réalisées dans notre équipe et d'autres démontrent la valeur pronostique de la lymphopénie dans les cancers solides en phase métastatique pendant ou avant tout traitement (Blay *et al.,* 1996; Choi *et al.,* 2003), soulignant ainsi l'importance du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale. Une étude de *Borg et al*. indique que la population principalement concernée par cette perturbation est la population lymphocytaire T (Borg *et al.,* 2004). Au cours de ce travail, nous avons voulu savoir si d'autres perturbations du système immunitaire pouvaient venir renforcer sa valeur pronostique. La diversité des TCR est directement corrélée au nombre d'Ag que peut reconnaitre le SI et joue donc un rôle essentiel dans l'efficacité de la réponse immunitaire notamment dans la réponse anti-tumorale (Dutoit *et al.,* 2001). Nous avons étudié la diversité combinatoire des récepteurs T en utilisant la stratégie de PCR multi-N-plexe développée par ImmunID et avons corrélé cette diversité au devenir de patientes atteintes de cancer du sein en phase métastatique.
Les analyses ont été réalisées sur des patientes atteintes de cancer du sein en phase métastatique recrutées au Centre Léon Bérard entre 2004 et 2010 dans une cohorte test et une cohorte de confirmation. Les critères d'exclusion avaient pour objectif d'éviter les perturbations du système immunitaire qui ne seraient pas liées au cancer.
Nous avons tout d'abord validé la corrélation entre une lymphopénie <1Giga/L et la survie globale chez ces patientes. L'étude de la diversité combinatoire du TCR nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre une faible diversité (divpénie) et une survie globale (SG) plus courte (modèle de Cox ; p=0.042) sur la première cohorte.
Bien qu'il existe une corrélation statistique entre ces deux variables, il est intéressant de noter que la divpénie permet d'identifier de manière significative une sous population particulièrement à risque parmi les patientes lymphopéniques, mais non parmi les patientes non lymphopénique, soulignant complémentarité de ces deux marqueurs.
L'analyse combinée de ces deux bio-marqueurs représentée sous forme de graphe NDL nous a permis d'isoler une population particulièrement à risque présentant à la fois une lymphopénie <1Giga/L et une divpénie ≤33% (score NDL1). Ces patientes lympho-divpéniques présentent une médiane de SG de 7.6 mois et 10.6 mois *vs* 24.4 mois et 22.9 mois pour les autre patientes, pour les cohortes A et B respectivement.

Afin d'augmenter la puissance statistique de notre analyse, nous avons « poolé » les deux cohortes et réalisé une analyse multivariée intégrant le score NDL, la diversité combinatoire, la lymphopénie ainsi que toutes les variables cliniques ayant une valeur pronostique en analyse univariée. Le score NDL apparait comme un facteur pronostique indépendant en plus de l'anémie et la localisation hépatique des métastases.

En conclusion, ces données démontrent l'importance du score NDL en tant que facteur pronostique de SG et viennent confirmer l'importance de l'évaluation du SI dans la prise en charge des patients dans le cancer du sein en phase métastatique.

Reduction of TCR Diversity (divpenia) and Lymphopenia as Prognostic Factor of Overall Survival in Metastatic Breast Cancer

Authors: M. Manuel[1, 2], O. Trédan[4], T. Bachelot[4], G. Clapisson[3], A. Courtier [1], G. Parmentier[1], T. Rabeony[1], A. Grives[1], S. Perez[1], JF. Mouret[1], D. Perol[5], S. Chabaud[5], I. Ray-Coquard[4], I. Labidi-Galy[4], P. Heudel[4], JY. Pierga[6], C. Caux[2,3,] JY. Blay[2], N. Pasqual[1], C. Ménétrier-Caux[2,3]

1- ImmunID Technologies, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France
2- Team 11 " Therapeutic targeting of tumor cells and their immune environment " CRCL INSERM U-1052/CNRS 5286, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France
3- Innovation in Immunotherapy and Immuno-monitoring (PI3), Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France
4- Department of medical oncology, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France
5- Biostatistic Unit, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008, Lyon, France

ABSTRACT

Rationale: Lymphopenia (<1 Giga/L) detected before initiation of chemotherapy is a predictive factor for toxicity and death in metastatic solid tumors. Combinatorial diversity of T Cell Receptor -beta chain (TCR-β), as a measure of T cell repertoire diversity, was investigated and tested either alone or in combination with lymphopenia as a prognostic factor at diagnostic for overall survival (OS) in metastatic breast cancer (MBC) patients.

Patients and methods: Using semi quantitative multiplex PCR, the V-D-J combinatorial diversity of the TCR was measured on cryo-preserved blood samples from 2 cohorts of MBC patients before the initiation of the first line chemotherapy: a development cohort (cohort A, n=66) and a validation cohort (cohort B, n=67). A prognostic score,called NDL (Numeration & Diversity of Lymphocytes) combining lymphocyte count and TCR diversity was evaluated. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors for OS were performed in both cohorts.

Results: Lymphopenia (<1 Giga/L) was associated with shorter OS for cohort B. TCR diversity ≤33% (called divpenia) was associated with a reduced OS in cohort A. The combination of lymphopenia with low TCR diversity (called lympho-divpenia) was associated with poor OS compared to patients with either lymphocyte count ≥1 Giga/L or diversity >33% or both, in cohort A (median OS: 7.6 *vs* 24.5 months, log rank p.value =0.0006) and cohort B (median OS 10.6 *vs* 22.9 months, log rank p.value =0.0035). In a multivariate analysis, including other significant clinical factors from the univariate analysis (PS, liver metastasis, hemoglobin) lympho-divpenia was

found to be an independent prognostic factor in the pooled cohort (A+B) (p=0.005) along with triple negative tumors (p=0.011) and hemoglobin level (11.5 g/dL) (p=0.009).

Conclusion: NDL score combining lymphopenia and reduced TCR diversity may be a novel prognostic factor to improve care quality of MBC patients.

Introduction

Numerous studies have shown an impact of immune system status on cancer patients' outcomes. In a series of studies gathering more than 3000 patients, our group demonstrated that lymphopenia is observed in 20-25% of patients with advanced cancers, including 20% of untreated metastatic breast cancer (MBC) patients (1-5). All lymphocyte compartments are affected including $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes, NK cells, and B lymphocytes (3). Importantly, in a large series of patients, lymphopenia in combination with PS>1, is associated with a 20% risk of early death at 1 month and 50% risk at 3 months (3;6;7). In addition, lymphopenia is also associated with an increased risk of disease progression and worse long term survival in three prospectively collected series of patients with metastatic breast cancer in the first line setting, along with Non Hodgkin Lymphoma, and soft tissue sarcomas (7).

Several studies have shown the presence and function of immune cells in solid tumors that may promote both humoral and cellular antitumor immune responses, contributing to tumor control. As an example, high numbers of $CD8^+$ T cells infiltrating the tumors are associated in colon carcinoma with favorable clinical outcomes (8). However, tumors develop escape mechanisms including production of immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-β), alteration of dendritic cell subsets differentiation or function (9-11), and recruitment of immunosuppressive regulatory T cells (Treg) (12;13).

The recent success of immunotherapy with anti CTLA-4 monoclonal antibody (mAb) in advanced melanoma (14;15) confirms the importance of immune system against cancer. Increased overall survival and objective responses obtained in melanoma patients treated with anti CTLA-4 blocking mAb enhancing immune activity by favoring T cell activation (*for review* (16)) suggest that stimulation and education of immune system could favor the development of a specific anti-tumor immune response leading to tumor control.

The T cell receptor (TCR) combinatorial diversity results of mechanism by which exons encoding TCR variable regions are assembled in developing T lymphocytes from germline variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments (17;18). V(D)J recombination leading to combinatorial diversity is of fundamental importance for the generation of diverse antigen receptor repertoires. Several studies demonstrate the importance of this lymphocyte diversity in infectious diseases and in

anti-tumor responses. Indeed, constriction of the immune TCR repertoire has been associated with progression in AIDS (22). In melanoma, a progressive widening of the repertoire diversity under chemo-immunotherapy treatment was accompanied by high avidity and tumor reactivity of Melan-A-specific T-cell clones of patients (23).

The objective of this study was to assess the impact of the quality of the immune system on MBC patients' outcomes. We demonstrate that a composite score called NDL (Numeration & Diversity of Lymphocytes), combining lymphocyte count and combinatorial TCR diversity, allowed the identification of a subgroup of MBC patients with poor outcomes.

Material and methods

PATIENTS

Sixty-six patients with MBC who received first-line chemotherapy at Léon Bérard Cancer Center between 2004 and 2007 were enrolled in the development cohort (cohort A). A validation cohort (cohort B) of 67 patients with MBC was enrolled in a prospective clinical trial between 2006 and 2010. Patients with a known HIV disease were excluded of these two studies. Healthy subjects used as controls for TCR diversity analyses were recruited on the basis of absence of auto-immune disease, infectious disease and cancer. Pregnant women, subjects recently vaccinated or on corticotherapy over the last 3 months were also excluded.

Previously validated prognostic factors were collected to characterize both cohorts (age, menopausal status, performance status (PS), hemoglobin, LDH, neutrophils (PNN), hormonal receptor status (ER, PgR), Her2/neu amplification, metastatic sites and number of metastatic sites).

Peripheral blood samples were collected for full blood count evaluation before initiation of the chemotherapy treatment (Day 0).

Written informed consent was obtained from each patient. The institutional ethics committee approved both study protocols before implementation.

COMBINATORIAL DIVERSITY ANALYSIS (MULTI-N-PLEXE PCR ASSAY)

Human T lymphocyte repertoire diversity was measured using Human ImmunTraCkeRβ® test (ImmunID Technologies, Grenoble France) on genomic DNA. Genomic DNA was extracted using standard techniques from total peripheral blood

cells (PBMC) of patients after informed consent. Multi-N-plex PCR was performed using an upstream primer specific of all functional members of a given TRBV family and a downstream primer specific of a given TRBJ segment. This assay allows the simultaneous detection of several V–J rearrangements in the same reaction. By using this technique, it is possible to detect 276 different TRBV–TRBJ rearrangements covering 100% of the possible combinatorial rearrangements. All V–J1, J2, J3, J4, Jn products were separated as a function of their size with a maximum amplicon size of ~5 kb. PCR signals were detected and analyzed using the Constel'ID software developed by ImmunID Technologies (Grenoble, France). It is here important to mention that the multiplex PCR strategy could potentially amplify a DNA fragment corresponding to a rearrangement involving a Vx+1 gene located 3' of the targeted Vx gene. However, these side products were recognized and excluded from the final results by the Constel'ID software. PCR products were generated using iProof GC rich Master Mix (Bio-Rad). The cycling condition were: Touchdown PCR cycle protocol beginning with 98°C for 3 minutes, 98°c for 20 seconds, 72°C for 20 seconds and 72 °C for 3 minutes 30 seconds and reducing the annealing temperature by one degree every cycle until reached 68°C wich was then repeated 23 times. Finally one cycle of 10 min at 72°C was performed. In order to perform semi-quantitative analysis, PCR reactions were stopped at the exponential step of the PCR. In order to normalize DNA quantity in each reaction the actin gene was amplified in the same PCR run. DNA isolated from kidney and/or HEK cell lines, in which no rearrangement takes place, was used as a negative PCR control. PCR products were separated on a 0.8% agarose gel, directly stained with SyberGreen I and quantified using a CCD camera equipped with BIO-1D (Vilbert Lourmart, France). Constel'ID software was used for further analytical studies including the generation of 3D repertoire illustration.

STATISTICAL ANALYSIS

In order to analyze the impact of TCR diversity on clinical outcomes, the study population was divided into tertiles on the basis of the combinatorial diversity. The threshold for the first tertile corresponding to ≤33% combinatorial diversity was called 'divpenia'.

Furthermore, we built a NDL score assessing the lymphocyte count as a function of the combinatorial diversity. Four NDL scores were defined using <1 versus ≥1 Giga/L

for lymphocyte count and ≤33% versus >33% for combinatorial diversity (**Figure 4**) Lymphopenia (<1 Giga/L) and divpenia (≤33%) were called 'lympho-divpenia'.

Survival analysis. Overall survival (OS) was defined as the time from patient's inclusion to the date of death or the date of the last follow-up for patients alive at last contact. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method (24).

Univariate analysis. To assess the relationship between survival and all relevant biological and/or clinical data, reliable prognostic factors were included in univariate Cox proportional hazard regression model. Prognostic factors most commonly used in previous studies (e.g., PS, age, hemoglobin, LDH levels and PNN count) were dichotomized using previously published cutoff. Lymphopenia (<1 Giga/L *vs* ≥1 Giga/L) and TCR divpenia (≤33% *vs* >33%) were also used as dichotomous variables. Candidate prognostic factors with a 0.05 level of significance in univariate analysis were then selected for inclusion in the multivariate analysis

Multivariate model analysis. Independent prognostic variables of OS were identified by a Cox regression analysis using a backward selection procedure (25). The added value of NDL in each model were evaluated using a likelihood ratio test (LRT); likelihood scores of the model evaluated with and without the biomarker of interest were compared, considering that lower likelihood scores will indicate better fitting models (26).

All statistical analyses were performed independently by the Centre Leon Berard biostatistic department using SAS v.9.2 (Cary) package and ImmunID Technologies using R (GNU Public).

Results

PATIENTS' CHARACTERISTICS

Table 1 described the patients' characteristics in cohorts A and B. Both cohorts were similar except for higher proportion of triple negative breast cancer (TNBC) patients in cohort B (22% versus 8%). None of the patients in the cohort A was treated with bevacizumab, whereas 39% of patients from cohort B received bevacizumab-based chemotherapy. All patients with over-expressing HER2 tumors were treated with trastuzumab-based chemotherapy. Median follow-up was 18.8 months in the cohort A and 14.3 months in the cohort B.

PROGNOSTIC VALUE OF LYMPHOPENIA

In univariate analysis (**Table 2**), PS>1 (p=0.03), liver metastasis (p=0.02) and hemoglobin <11.5 g/dL (p=0.003) were associated with poor prognosis in the cohort A, while LDH level was the only prognostic factor in cohort B.

The incidence of lymphopenia (<1 Giga/L) was 39% for the cohort A and 45% for the cohort B higher than in previous series (1-5;27). In both cohorts, lymphocyte count <1Giga/L was associated with OS, with a median OS of 11.2 and 10.4 months, versus 25.1 and 24.5 months for patients with lymphocyte count ≥1Giga/L, in cohort A and B respectively (**Figure 1A, 1B**). The difference was statistically significant in cohort B (p=0.0002) but not in cohort A (p=0.210).

PROGNOSTIC VALUE OF LOW TCR DIVERSITY (DIVPENIA)

Analysis of TCR combinatorial diversity on 26 healthy subjects showed a highly homogenous diversity with a median of 67.8% (range [59-77]) (**Figure 2A**). By contrast, TCR diversity in both cohorts of MBC patients demonstrated reduced and highly dispersed diversity (for cohort A: median = 46.4%, range [1.1-83.7]; and for cohort B: median = 47.46%, range [6.2-70.3]). Regardless the lymphocyte count, TCR diversity varied substantially between patients.

In cohort A, divpenia (≤ 33%) was correlated with low hemoglobin level (<11.5g/dL) (55% of divpenic patients had also anemia, p=0.022, khi-deux de Pearson), lymphopenia (50% of divpenic patients were also lymphopenic, p=0.026). Conversely, in cohort B, divpenia was found to be associated with age (50% of divpenic patients were ≥60 years old, p=0.007), number of metastatic sites ($p<10^{-4}$) and liver metastasis (44% of divpenic patients had liver metastasis, p=0.027).

In cohort A, divpenia was associated with poor prognosis (p=0.038) (**Figure 2B**) with a median survival of 9.7 months for divpenic patients versus 21.7 months for non-divpenic patients. The difference was not statistically different in cohort B (**Figure 2C**).

PROGNOSTIC VALUE OF LYMPHO-DIVPENIA

As shown in **Figure 3A**, within lymphopenic patients divpenia can identify patients with a reduced median OS (median OS =7.6 months for patients with diversity ≤33% compared to median OS =24.4 months for patients with diversity >33%, p=0,018).

However, for non-lymphopenic patients, divpenia was not a prognostic factor (**Figure 3B**).

An interaction between these two variables was demonstrated using a Cox model and the variable [lymphopenia x divpenia] has a stronger impact on survival than the two independently (p=0.001, HR=3.108, CI95% [1.573 - 6.0140]).

Analysis of lymphocyte count and TCR combinatorial diversity on 26 healthy subjects showed a highly homogenous distribution, with non-lymphopenic and non-divpenic subjects (**Figure 4A**). In contrast, for MBC patients, a similar low lymphocyte count, can either be associated with a low TCR diversity or a diverse TCR repertoire. Conversely, normal lymphocyte count can be associated with low TCR diversity or normal diversity. Indeed, patients from cohorts A (**Figure 4B**) and B (**Figure 4C**) were distributed in all four NDL compartments. Interestingly, patients with lymphopenia and divpenia, so called lympho-divpenic patients, had poor OS. For cohort A, median OS was 7.6 months compared to 24.4 for the non-lympho-divpenic patients (p=0.0006) (**Figure 5A & 5B**). For the validation cohort, lympho-divpenia remained a prognostic factor with a median OS of 10.6 months compared to 22.9 for the non-lympho-divpenic patients (p=0.0035) (**Figure 5C & 5D**).

UNIVARIATE AND MULTIVARIATE ANALYSIS FOR THE POOLED COHORTS

We pooled the patients of cohorts A and B. In univariate analysis, lympho-divpenia appears as the most significant predictive factor of poor prognosis (p<10-4) (**supplementary Table 1**) together with PS>1 (p=0.0054), hemoglobin (<11.5 g/dL)(p=0.0005) and lymphopenia (p=0.0011). Divpenia tended towards significance (p=0.0730) (**supplementary Table 1**). Median OS of patients with lympho-divpenia was 8.1 months compared to 23.6 months for non-lympho-divpenic patients (**Figure 6A**).

Interestingly, segregation of patients according to each NDL score separately beside the small size of each part (**Figure 6B**) allowed to demonstrate that lymphodivpenia (n=21) as well as lymphopenia only (n=32) seems to be of poor prognosis in contrast to divpenia alone (n=17) or non lymphopenic nor divpenic patients (n=53).

In multivariate analysis, three factors were independently associated with worse prognosis (more than two-fold increased hazard ratio of death): hemoglobin level

(HR=0.48, p=0,009), triple negative tumors (HR=2.56, p=0.011) and lympho-divpenia (HR=2.52, p=0,005) (**Table 4**).

Discussion

In this study, we confirmed that lymphopenia is a strong prognostic factor for MBC patients before the initiation of the first line chemotherapy. Furthermore, we showed that combining lymphocyte count and combinatorial TCR diversity allowed the identification of a subgroup of patients called lympho-divpenic particularly at risk of early death (≤8 months) that appears refractory to standard chemotherapy regimen and may benefit from innovative treatment.

Immune status is now emerging as an essential biomarker of the biology of the tumor and its microenvironment with a global impact on patient outcomes. On top of the well-documented negative impact of lymphopenia on OS for MBC patients and other advanced solid tumors (7;28;29), these results further demonstrate that TCR diversity is frequently reduced in a subset of MBC patients, and that divpenia may be assessed in the clinic to better define the treatment strategy.

ADDED VALUE OF THE NDL TO SEGREGATE PATIENTS

Lymphocyte count and diversity are the two dimensions in periphery required for an efficient immune response that may be altered in metastatic patients (7;30). While a minimum number of lymphocytes remains obviously required, TCR combinatorial diversity could reflect the capacity of the organism to recognize an antigen.

As diversity parameter had an added value on lymphopenic patients' outcome (**Figure 3A**), we investigated the combined analysis and we showed that NDL score can identify high risk MBC patients. Indeed, low NDL score (lympho-divpenia) identified patients cumulating a low lymphocyte count and a low combinatorial TCR diversity highlighting a profound immunodeficiency. This subgroup of lymphodivpenic patients particularly at risk of early death may benefit from innovative treatment.

Analysis of each NDL score separately despite the small size of each part suggests that lymphopenia alone is of poorer prognosis than divpenia alone and no lymphopenic nor divpenic ones. A larger cohort is required to confirm these preliminary results. For this purpose, a cohort of MBC patients but also metastatic lung carcinoma is currently enrolled in a prospective clinical trial (LYMPHOS1:

NCT01306188) to confirm the prognostic value of lympho-divpenia in diverse clinical situations since we demonstrated that lymphopenia has a negative impact in different solid tumors (soft tissue sarcoma, LNH and colon carcinoma) (7;29).

Studying immune system and so, better understanding the complex biology of cancer, will help to propose a personalized treatment that would limit toxic side effects and improve life expectancy. Therapeutic adaptation and innovation are the main interests of TCR diversity and/or NDL biomarkers. These new biomarkers may be helpful to avoid overtreatment for patients that will not respond, and to better select patient to assess the clinical efficacy of new drug candidates. Otherwise, NDL score will allow identification of at risk patients (lymphodivpenic) for whom chemotherapy or conventional treatments will be deleterious and where it exists a need to develop alternative therapeutic strategies such as i) dose reduction in order limit toxic side effects of chemotherapy, ii) tight clinical care, iii) prophylactic antibiotherapy regimen to reduce the risk of infections in immunodeficient patients. But overall patients with lymphodivpenia will represent candidate for the development of i) new strategies aiming at the reconstitution of a functional immune system before the chemotherapy treatment or ii) targeted therapies instead of chemotherapies.

Different molecules have been developed and evaluated for their ability to favor immune T cells reconstitution. Whereas, IL-2 was known to favor CD4 expansion, two clinical trials in HIV (SILCAAT for extremely lymphopenic HIV patients and ESPRIT for the less lymphopenic HIV patients), failed to demonstrate any clinical benefit, although patients did exhibit increased $CD4^+$ T cell counts (31) but also increased rate of Treg with immunosuppressive functions (32).

In contrast, accumulated evidence issued from clinical trials, indicate the potent lymphopoietic effect of IL-7 (CYT107, Cytheris), on both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells without expansion of Treg that have reduced expression of IL-7Rα receptor (33). Interestingly, in HIV immune non responders patients with persistent low CD4 counts (0,25 Giga/L) treated with HAART therapy for several years, a short 3 weeks cycle of IL-7 increased and maintained their $CD4^+$ count above the >0,5 Giga/L threshold for at least one year (34). Such long lasting effect was also observed in lymphopenic patients, where T cell counts was observed to peak a few weeks after the IL-7 cycle and to remain stable (7;30;35). IL-7 treatment would also favor TCR diversity as recent results in HIV patients demonstrate an increased TCR diversity after IL-7 treatment due to the capacity of IL-7 to raise clonal diversity by increasing the

sensitivity of the TCR, not only to dominant epitopes, but also to sub-dominant epitopes as well (36). The impact of IL-7 (CYT-107) in the reversion of lymphopenia and divpenia in MBC patients is currently under investigation in our institution in a randomized phase II trial (ELYPSE 7 clinical trial, NCT01368107).

ORIGIN OF LYMPHOPENIA AND DIVPENIA

It remains unclear whether lymphopenia and divpenia are the consequence of an aggressive tumor, or at the opposite whether the immunodeficient state favors tumor progression. In both instance lymphopenia and divpenia could depend from characteristics related to tumor (tumor burden, or metastatic sites involved) as well as host such as patient age or polymorphisms.

As the study enrolled only previously untreated patients, lymphopenia or divpenia do not result from previous exposure to cytotoxic agents as described by others (37;38)

In the pooled series, global lymphopenia correlated to patients' age analysed as continuous variable (p=0.04) and PS status (p=0.001) and an inverse correlation exists between TCR diversity and age when tested as continuous variables (p=0.001). Thus the reduced thymic function in elderly (39) may contribute to the reduced number and TCR diversity of circulating lymphocytes in tumor bearing patients. In this context, Mackall et al (38;40) demonstrated the rapid $CD4^+$ T cell pool reconstitution in young patients treated with intensive chemotherapy for the treatment of their tumour. In contrast, adults exhibit deficiencies in this pathway suggesting the rapid T cell regeneration requires residual thymic function.

The quantification of total tumor burden at first relapse remains yet difficult to assess but could be evaluated by the number of metastatic sites involved. Whereas in the pooled cohort, no correlation was observed between lymphopenia and number of metastatic sites involved, divpenia strongly correlated with number of metastatic sites involved (≤3 vs >3) (p=0.000) suggesting association between divpenia and tumor aggressiveness and underlining the independence of these two dimensions of the NDL score.

The influence that polymorphisms could have on the immune system and lymphocyte count and diversity in cancer patients remains unknown. Some data from HIV patients strongly suggest the importance of increased expression or activity of genes (IL-2, IL-2Rβ, IL-2Rγ, IL-15, IL-15Rα) involved in T cell proliferation and others involved in the reduction in intrinsic or extrinsic apoptotic pathways signaling (TRAIL,

Bim, TNF-α and IFNγ) to increase the size of peripheral T cell pool during anti retroviral therapy. Indeed, number of polymorphisms in these genes either alone or in combination and several haplotypes, were found associated with the magnitude of $CD4^+$ T cell recovery (41). Analyses of polymorphisms of such genes on MBC patients in our studies may help in the comprehension of lymphopenia mechanisms.

In addition to reduce thymic function, lymphopenia and divpenia may result either from a destruction of lymphocytes elicited by breast tumor cells expressing pro-apoptotic ligands (42), a blockade of lymphocyte proliferation mediated through inhibitory molecules (PD-L1) expressed by tumor cells (43), or a reduced capacity of lymphocytes to respond to TCR stimulation due to an alteration (decrease or absence) of ζ chain expression in T lymphocytes (44). Soluble factors secreted or induced by tumor cells may also impact systemic lymphopoiesis. Moreover, this lymphopenia could also result from a chronic stimulation of peripheral T cells favored by tumor cells that leads to their depletion by activation induced cell death (AICD)(45). In this context, in HIV infection, mechanisms of lymphopenia have been extensively studied. Authors demonstrated that $CD4^+$ lymphopenia is not due to a direct destruction of infected $CD4^+$ T cells, but mainly results from AICD induced by chronic activation of the immune system by HIV infection (for review (46)).

The mechanism of AICD could also result in the disappearance of expanded specific T cell clones, which may result in the appearance of holes in the TCR diversity. In line with this, 36% of lymphopenic patients (21/58) presented also an altered TCR diversity (lymphodivpenia) (**Figure 4**). Each of these assumptions is not exclusive and mechanisms are probably multi factorial.

Our results demonstrate that diversity and NDL parameters may be useful for the selection of patients in order to adapt their treatment or develop innovation in immunotherapy. Moreover, the comprehension of mechanisms leading to lymphodivpenia will help to propose new immunotherapy approaches or targeted therapies for these most at risk patients.

Acknowledgments

This project has been financially supported by CLARA (Lymphos'1), FUI projects (PLATINE, DIVRESCUE) and an INCa translational program (Breast Immune). Manuarii Manuel is a grant holder of the ANRT with financial support of ImmunID. For his last PhD year, he is financed by an ARC students' fellowship.

Reference List

(1) Blay JY, Chauvin F, Le CA, Anglaret B, Bouhour D, Lasset C et al. Early lymphopenia after cytotoxic chemotherapy as a risk factor for febrile neutropenia. J Clin Oncol 1996 February;14(2):636-43.

(2) Blay JY, Le CA, Mermet C, Maugard C, Ravaud A, Chevreau C et al. A risk model for thrombocytopenia requiring platelet transfusion after cytotoxic chemotherapy. Blood 1998 July 15;92(2):405-10.

(3) Borg C, Ray-Coquard I, Philip I, Clapisson G, Bendriss-Vermare N, Menetrier-Caux C et al. CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. Cancer 2004 December 1;101(11):2675-80.

(4) Ray-Coquard I, Le CA, Rubio MT, Mermet J, Maugard C, Ravaud A et al. Risk model for severe anemia requiring red blood cell transfusion after cytotoxic conventional chemotherapy regimens. The Elypse 1 Study Group. J Clin Oncol 1999 September;17(9):2840-6.

(5) Ray-Coquard I, Borg C, Bachelot T, Sebban C, Philip I, Clapisson G et al. Baseline and early lymphopenia predict for the risk of febrile neutropenia after chemotherapy. Br J Cancer 2003 January 27;88(2):181-6.

(6) Ray-Coquard I, Ghesquiere H, Bachelot T, Borg C, Biron P, Sebban C et al. Identification of patients at risk for early death after conventional chemotherapy in solid tumours and lymphomas. Br J Cancer 2001 September 14;85(6):816-22.

(7) Ray-Coquard I, Cropet C, Van GM, Sebban C, Le CA, Judson I et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. Cancer Res 2009 July 1;69(13):5383-91.

(8) Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006 September 29;313(5795):1960-4.

(9) Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, Gobert M, Treilleux I, Bajard A et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. Cancer Res 2011 August 15;71(16):5423-34.

(10) Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. Blood 1998 December 15;92(12):4778-91.

(11) Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. Clin Cancer Res 2004 November 15;10(22):7466-74.

(12) Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N et al. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. Cancer Res 2011 October 1;71(19):6143-52.

(13) Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res 2009 March 1;69(5):2000-9.

(14) Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 February 26;105(8):3005-10.

(15) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 2010 August 19;363(8):711-23.

(16) Callahan MK, Wolchok JD, Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. Semin Oncol 2010 October;37(5):473-84.

(17) Hesslein DG, Schatz DG. Factors and forces controlling V(D)J recombination. Adv Immunol 2001;78:169-232.

(18) Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature 1983 April 14;302(5909):575-81.

(19) Price DA, West SM, Betts MR, Ruff LE, Brenchley JM, Ambrozak DR et al. T cell receptor recognition motifs govern immune escape patterns in acute SIV infection. Immunity 2004 December;21(6):793-803.

(20) Messaoudi I, Guevara Patino JA, Dyall R, LeMaoult J, Nikolich-Zugich J. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. Science 2002 November 29;298(5599):1797-800.

(21) Welsh RM, McNally JM. Immune deficiency, immune silencing, and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. Curr Opin Microbiol 1999 August;2(4):382-7.

(22) Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. Nat Med 1998 February;4(2):215-21.

(23) Palermo B, Del BD, Sottini A, Serana F, Ghidini C, Gualtieri N et al. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. Cancer Res 2010 September 15;70(18):7084-92.

(24) Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schittek B, Rassner G et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. Br J Dermatol 2002 July;147(1):62-70.

(25) Chen CH, George SL. The bootstrap and identification of prognostic factors via Cox's proportional hazards regression model. Stat Med 1985 January;4(1):39-46.

(26) Dahm PF, Gail MH, Rosenberg PS, Pee D. Determining the value of additional surrogate exposure data for improving the estimate of an odds ratio. Stat Med 1995 December 15;14(23):2581-98.

(27) Marec-Berard P, Blay JY, Schell M, Buclon M, Demaret C, Ray-Coquard I. Risk model predictive of severe anemia requiring RBC transfusion after chemotherapy in pediatric solid tumor patients. J Clin Oncol 2003 November 15;21(22):4235-8.

(28) Capellino AR, Desposorio CR, Hurtado de Mendoza F, Falcon SG, Beltran BE, Lujan R et al. Lymphopenia and breast cancer subtypes as prognostic factors in patients with locally advanced breast cancer. ASCO Meeting 29[15_suppl], e21100. 2011. Abstract

(29) Ceze N, Thibault G, Goujon G, Viguier J, Watier H, Dorval E et al. Pre-treatment lymphopenia as a prognostic biomarker in colorectal cancer patients receiving chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol 2011 November;68(5):1305-13.

(30) Luo W, Liao WJ, Huang YT, Shi M, Zhang Y, Wen Q et al. Normalization of T cell receptor repertoire diversity in patients with advanced colorectal cancer who responded to chemotherapy. Cancer Sci 2011 April;102(4):706-12.

(31) Abrams D, Levy Y, Losso MH, Babiker A, Collins G, Cooper DA et al. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. N Engl J Med 2009 October 15;361(16):1548-59.

(32) Weiss L, Letimier FA, Carriere M, Maiella S, Donkova-Petrini V, Targat B et al. In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2010 June 8;107(23):10632-7.

(33) Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 2006 July 10;203(7):1701-11.

(34) Levy Y, Lacabaratz C, Weiss L, Viard JP, Goujard C, Lelievre JD et al. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. J Clin Invest 2009 April;119(4):997-1007.

(35) Morre M, Beq S. Interleukin-7 and immune reconstitution in cancer patients: a new paradigm for dramatically increasing overall survival. Targeted Oncology. In press 2012.

(36) Sportes C, Hakim FT, Memon SA, Zhang H, Chua KS, Brown MR et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by

preferential expansion of naive T cell subsets. J Exp Med 2008 July 7;205(7):1701-14.

(37) Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAtee N, Zujewski J et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. Blood 1997 November 1;90(9):3789-98.

(38) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. Blood 1994 October 1;84(7):2221-8.

(39) Ferrando-Martinez S, Franco JM, Hernandez A, Ordonez A, Gutierrez E, Abad A et al. Thymopoiesis in elderly human is associated with systemic inflammatory status. Age (Dordr) 2009 June;31(2):87-97.

(40) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. Blood 1997 May 15;89(10):3700-7.

(41) Haas DW, Geraghty DE, Andersen J, Mar J, Motsinger AA, D'Aquila RT et al. Immunogenetics of CD4 lymphocyte count recovery during antiretroviral therapy: An AIDS Clinical Trials Group study. J Infect Dis 2006 October 15;194(8):1098-107.

(42) Zhang B, Sun T, Xue L, Han X, Zhang B, Lu N et al. Functional polymorphisms in FAS and FASL contribute to increased apoptosis of tumor infiltration lymphocytes and risk of breast cancer. Carcinogenesis 2007 May;28(5):1067-73.

(43) Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. Neoplasia 2006 March;8(3):190-8.

(44) Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, Hoffmann TK, Gooding W, Lotze M et al. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. Clin Cancer Res 2001 March;7(3 Suppl):947s-57s.

(45) Agrawal S, Marquet J, Delfau-Larue MH, Copie-Bergman C, Jouault H, Reyes F et al. CD3 hyporesponsiveness and in vitro apoptosis are features of T cells from both malignant and nonmalignant secondary lymphoid organs. J Clin Invest 1998 November 1;102(9):1715-23.

(46) Grossman H. AIDS at 25: a quarter century of medical miracles. MedGenMed 2006;8(2):57.

Figures

		Cohort A (n=66)		Cohort B (n=67)	
		n	%	n	%
Age (years)	**median (range)**	59.9 (36.5-84.1)		56.9 (34.7-79.9)	
Menopause	**no**	35	53.03	19	28.78
	yes	31	46.96	47	71.21
adjuvant chemotherapy	**no**	25	37.87	23	34.33
	yes	41	62.12	44	65.67
Adjuvant hormonotherapy	**no**	37	56.06	35	52.24
	yes	29	43.93	32	47.76
adjuvant Avastin	**no**	-	-	36	58.06
	yes	-	-	26	41.94
PS	**0/1**	51	72.27	42	62.68
	> 1	15	22.72	25	37.32
ER	**no**	15	23.07	21	31.34
	yes	50	76.92	46	68.66
PgR	**no**	20	30.30	33	49.25
	yes	44	66.66	34	50.75
Her2/neu	**no**	46	79.31	52	81.25
	yes	12	20.68	12	18.75
Triple Negative (TNBT)	**no**	60	92.30	52	77.61
	yes	5	7.69	15	22.39

Table 1 : Characteristics of the two independent cohorts

	cohort A				cohort B			
	number	HR	CI (95%)	p value	number	HR	CI (95%)	p value
age (years) < 60 (R)	39			0.542	40			0.759
≥ 60	27	1.207	[0.660 - 2.206]		27	0.907	[0.486 - 1.693]	
menopause no	35			0,139	19			**0,030**
yes	31	1.578	[0.862 - 2.886]		47	2.257	[1.081 - 4.716]	
hemoglobin (g/dL) ≥11,5 (R)	18			**0.002**	20			0.076
< 11.5	47	0.368	[0.198 - 0.685]		46	0.566	0.301 - 1.562]	
number of metastatic sites 1/3 (R)	35			**0.015**	34			0.202
≥ 4	31	2.134	[1.157 - 3.936]		33	1.493	[0.807 - 2.760]	
PNN (Giga/L) ≥ 7,5 (R)	58			0.470	53			**0.001**
< 7,5	7	1.470	[0.517 - 4.178]		13	0.306	[0.151 - 0.621]	
PS 0/1 (R)	51			**0.025**	42			0.105
> 1	15	2.105	[1.091 - 4.060]		25	1.662	[0.899 - 3.073]	
Liver metastases no (R)	18			**0.038**	38			0.672
yes	48	2.266	[1.048 - 4.898]		29	1.140	[0.621 - 2.193]	
Bone metastases no (R)	21			0.626	22			0.568
yes	45	1.182	[0.604 - 2.310]		45	0.831	[0.441 - 1.567]	
Triple negative tumors no (R)	60			0.275	52			0.060
yes	5	1.960	[0.585 - 6.570]		15	1.981	[0.970 - 4.043]	
LDH (Ul/ml) < 600 (R)	41			0.125	44			**0.015**
≥ 600	13	1.779	[0.850 - 3.720]		23	3.500	[1.272 - 9.629]	
TCR Diversity (%) > 33 (R)	44			**0.042**	43			0.643
≤ 33	22	1.907	[1.023 - 3.555]		16	1.183	[0.582 - 2.405]	
lymphocytes (Giga/L) ≥ 1 (R)	38			0,210	35			**0,000**
< 1	28	1.408	[0.802 - 2.685]		30	3.156	[1.720 - 6.547]	
NDL 1 (R)	53			**0.001**	54			**0.006**
> 1	13	3.108	[1.573 - 6.140]		8	3.150	[1.395 - 7.110]	

PNN : neutrophils; LDH: Lactate dehydrogenase; TCR diversity : T cell receptor diversity; NDL : Numeration and diversity of lymphocytes; (R) :Reference modality

Table 2 : Univariate analysis : Cox Model on overall survival on the two cohorts

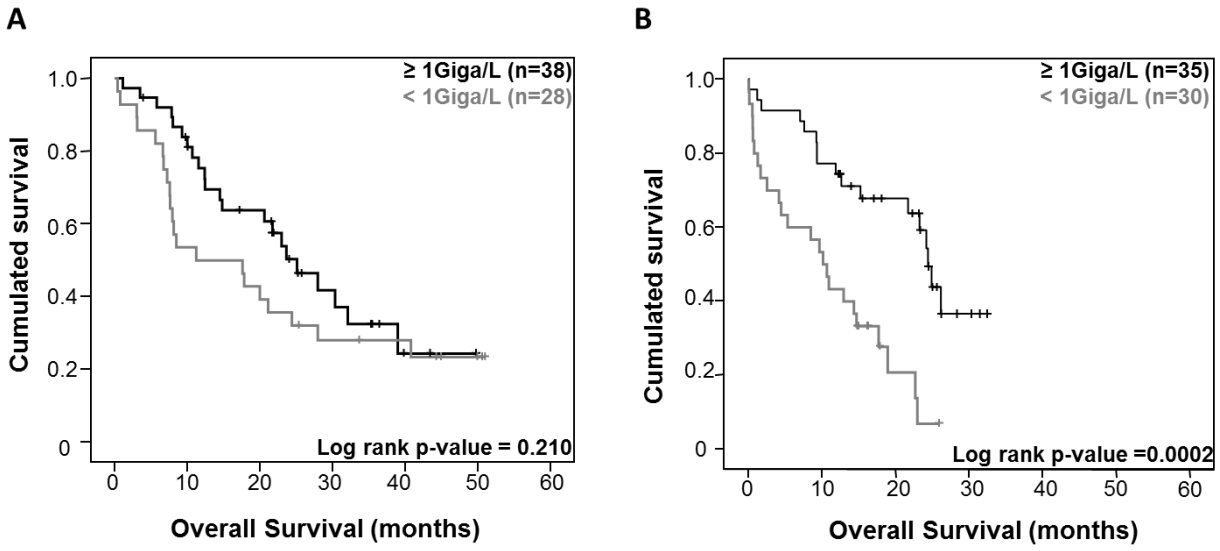


Figure 1: Overall survival of patients enrolled in cohort A (A) and cohort B (B) according to their baseline lymphocytes counts (< 1 Giga/L or ≥ 1Giga/L)

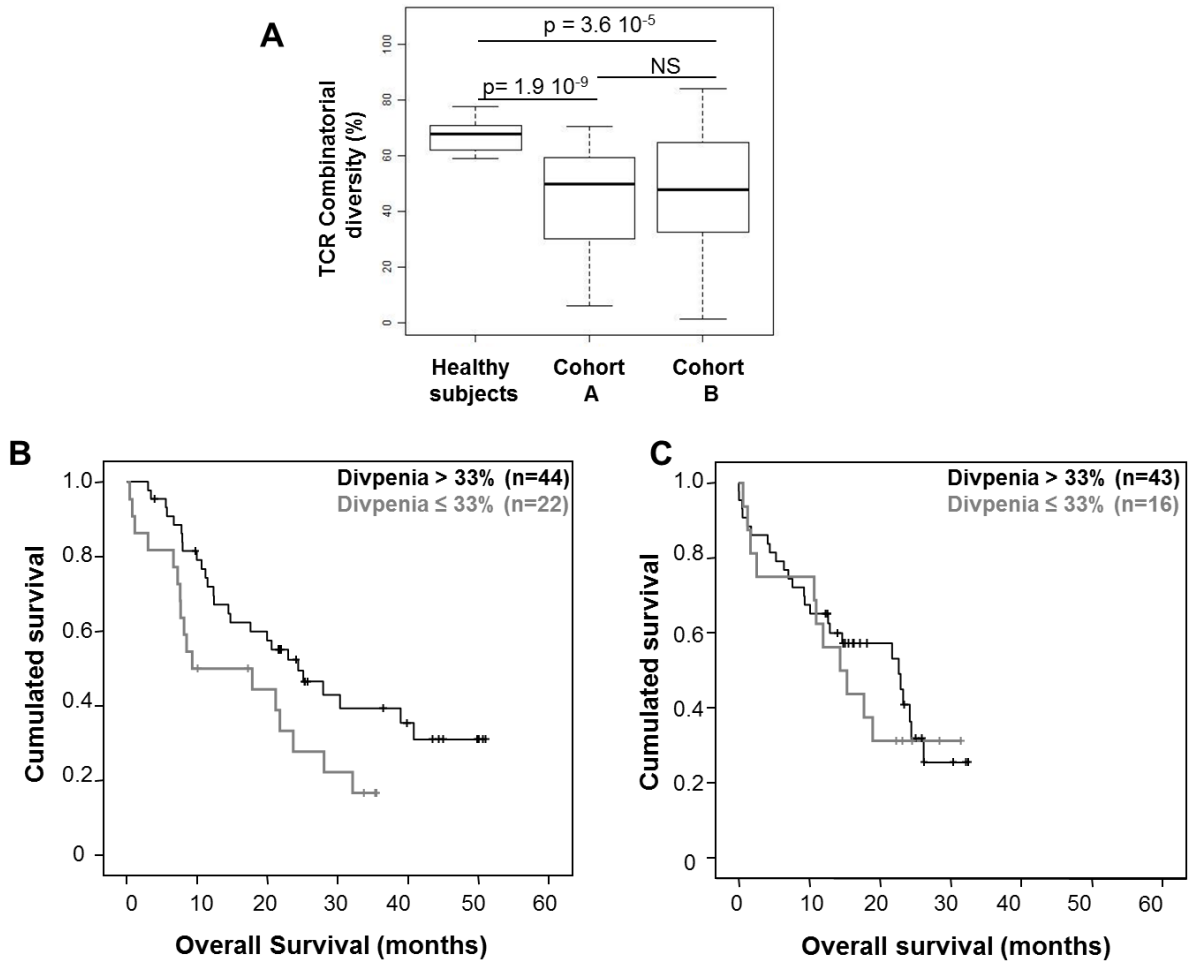


Figure 2: Comparison of TCR diversity in healthy subjects and patients from cohorts A and B (A). Overall survival of patients enrolled in cohort A (B) and cohort B (C) according to their baseline TCR diversity (≤ 33% or > 33%)

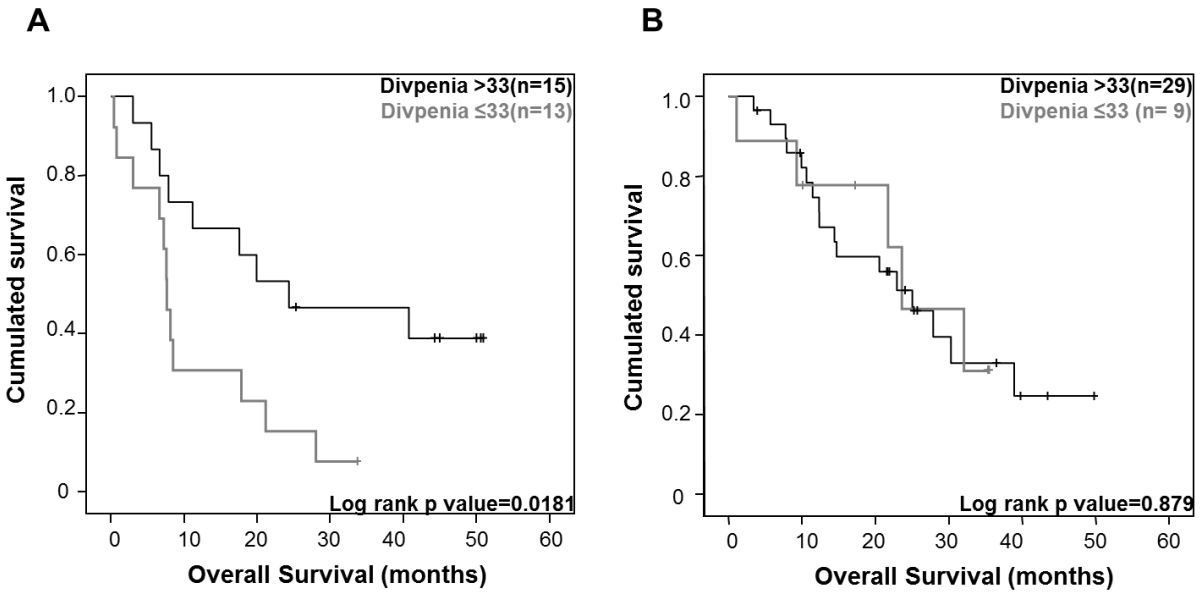


Figure 3: Overall survival according to baseline TCR diversity (≤ 33% or > 33%) in cohort A within lymphopenic patients (A) or non lymphopenic patients (B)

.

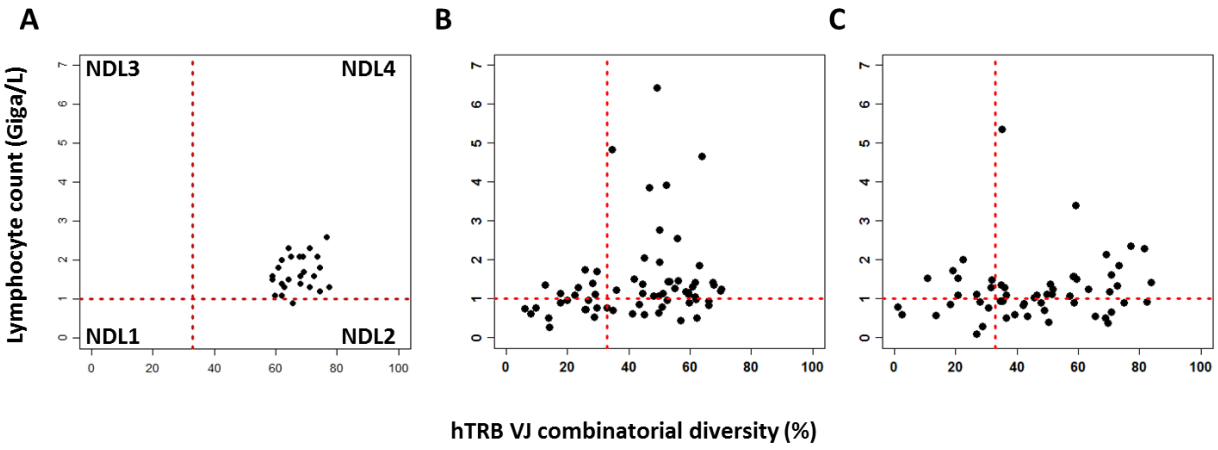


Figure 4: NDL representation on healthy subjects (n=26) (A), cohort A (n=66) (B) and cohort B (n=67) (C)

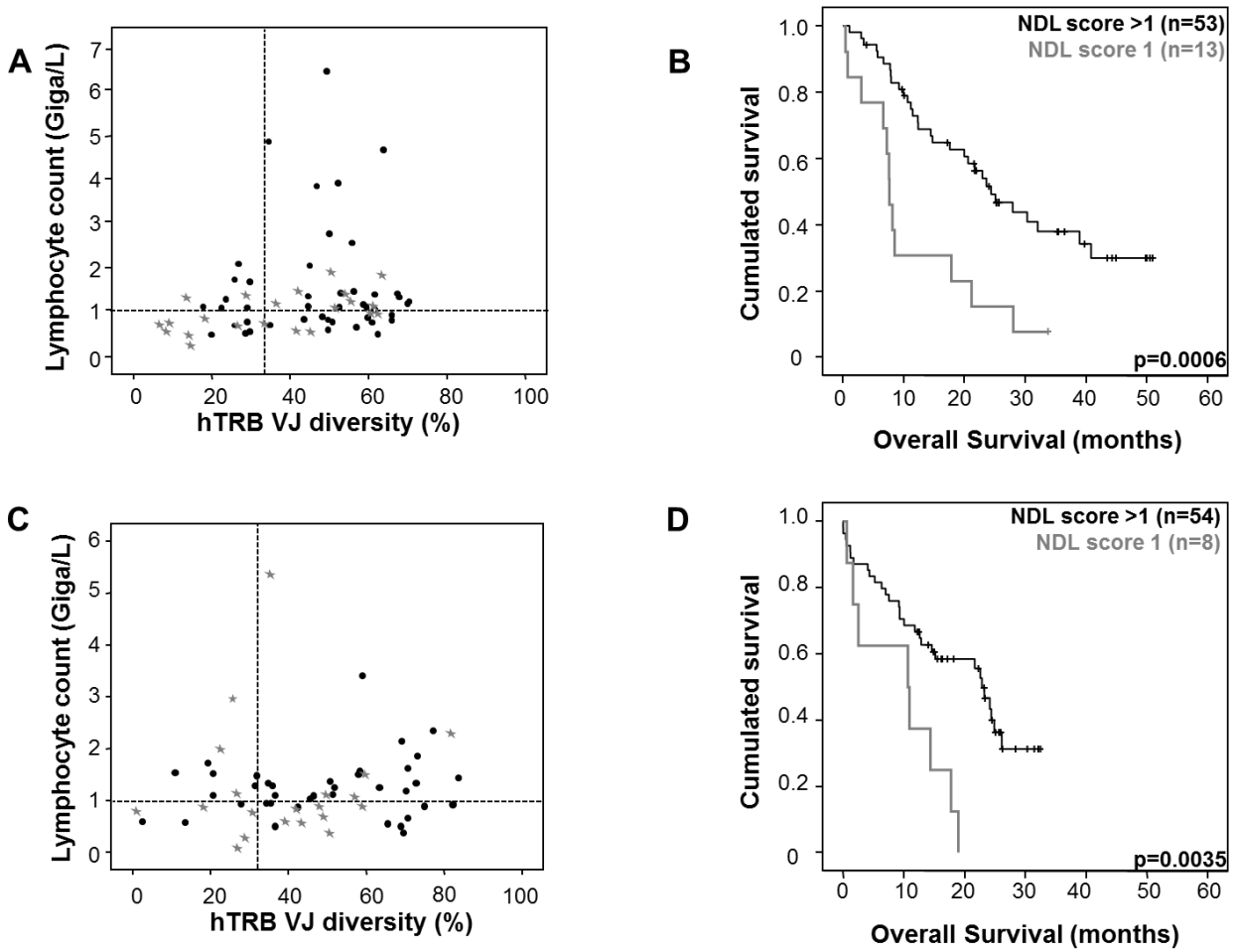


Figure 5: NDL representation on cohort A (n=66) (A) and B respectively (C) (patients in grey deceased before 12 months). Overall survival according to their lymphodivpenic status (NDL score 1) in the cohort A (B) and cohort B (n=67) (D).

	HR	CI 95%	significance (p)
hemoglobin (≥ 11,5 vs < 11.5)(g/L)	0.300	[0.154 - 0.584]	0.000
hepatic metastasis (Yes vs No)	3.608	(1.570 - 8.291]	0.003
NDL (≥ 1 vs < 1)	2.528	[1.450 - 5.912]	0.003

Table 3 : Multivariate analysis in cohort A

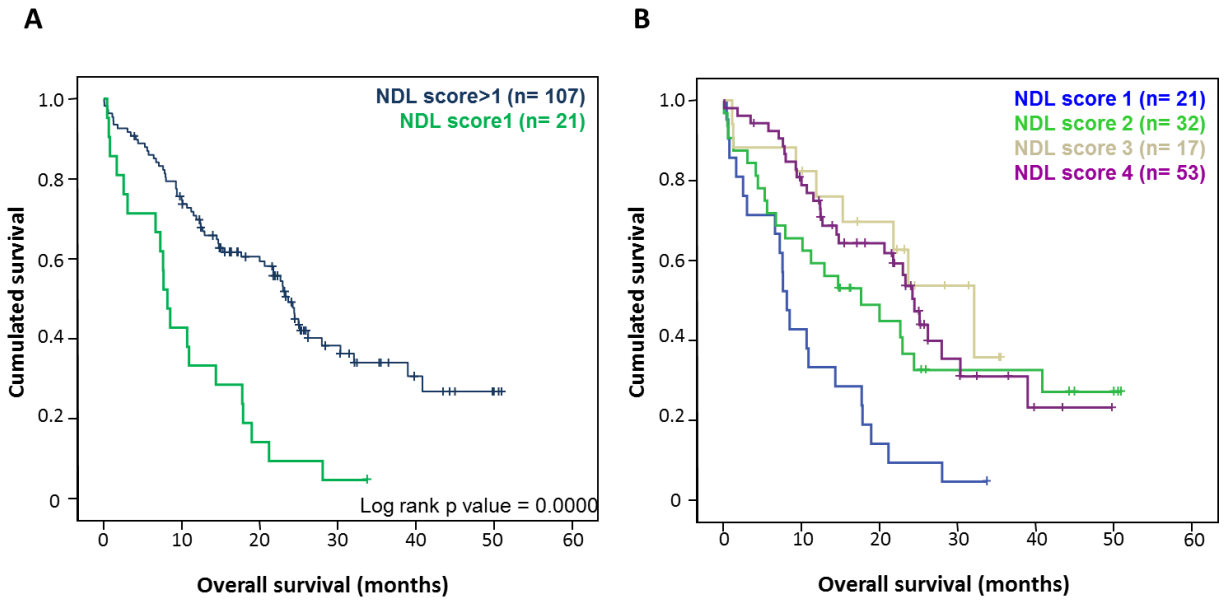


Figure 6: Overall survival according to their lymphodivpenic status (NDL score 1) on the pooled cohort (n=128) (A) Overall survival according to the different NDL scores lymphodivpenia (NDL score 1) or a lymphopenia alone (NDL score 2). Divpenia alone (NDL score 3) neither lymphopenia nor divpenia (NDL score 4). (B)

	HR	CI 95%	significance (p)
hemoglobin (≥ 11,5 vs < 11.5)(g/L)	0.481	[0.277 - 0.834]	0.009
Triple negtive tumors (Yes vs No)	2.563	(1.239 - 5.304]	0.011
NDL (> 1 vs 1)	2.521	[1.332 - 4.771]	0.005

Table 4 : Multivariate analysis in pooled cohort

Article 3

CD4+ lymphopenia is a reliable independent poor prognosis factor in metastatic breast cancer patients according to the line of chemotherapy treatment

La lymphopénie CD4+ est un facteur indépendant de mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique en fonction de la ligne de chimiothérapie.

Auteurs : Trédan Olivier, Manuel Manuarii, Chabaud Sylvie, Clapisson Gilles, Bardin Christine, Rigal Chantal, Biota Catherine, Bachelot Thomas, Bajard Agathe, Pasqual Nicolas, Caux Christophe, Blay Jean-Yves and Ménétrier-Caux Christine.

Article en préparation

8. Article n°3

CD4+ lymphopenia is a reliable independent poor prognosis factor in metastatic breast cancer patients according to the line of chemotherapy treatment

La lymphopénie $CD4^+$ est un facteur indépendant de mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique en fonction de la ligne de chimiothérapie.

Auteurs : Trédan Olivier, Manuel Manuarii, Chabaud Sylvie, Clapisson Gilles, Bardin Christine, Rigal Chantal, Biota Catherine, Bachelot Thomas, Bajard Agathe, Pasqual Nicolas, Caux Christophe, Blay Jean-Yves and Ménétrier-Caux Christine.

Cet article est encore en cours de rédaction mais nous avons décidé de vous présenter les résultats qui viennent compléter le message sur la valeur pronostique des perturbations du système immunitaire dans les cancers solides en phase métastatique.

Problématique : Dans cette étude les perturbations du système immunitaire ont été étudiées, de manière plus précise, au niveau des sous populations lymphocytaires. Il a été mis en évidence par notre équipe qu'une lymphopénie $CD4^+$ <0.45 Giga/L était associée à un risque accru de décès précoce et de neutropénie fébrile (Borg *et al.*, 2004). Dans ce travail, nous avons évalué l'impact pronostique de plusieurs sous populations lymphocytaires ainsi que de certaines cytokines plasmatiques en fonction de l'avancement de l'évolution métastatique des patientes souffrant de cancer du sein.
Les analyses ont été réalisées sur deux cohortes composées de patientes atteintes de cancer du sein en phase métastatique en première ligne thérapeutique (cohorte A : SEMTOF + CTC ; n=103) ou après au moins deux lignes de traitement (cohorte B facteur pronostic trial n=112). Les critères d'exclusion avaient pour objectif d'éviter les perturbations du système immunitaire qui ne seraient pas liées au cancer.
Ce travail nous a permis de confirmer la valeur pronostique de la lymphopénie <1Giga/L et de la lymphopénie sévère <0.7Giga/L sur la survie globale et la survie sans rechute quel que soit le stade métastatique étudié.
En analyse univariée, la lymphopénie $CD4^+$ <0.45Giga/L est quant à elle un facteur de mauvais pronostique dans les deux cohortes. La médiane de survie des patientes lymphopéniques $CD4^+$ est de 10.1 mois et 6.66 mois vs 24.92 mois et 13.11 mois pour les patientes non lymphopéniques, dans les cohortes A et B respectivement. L'étude des sous populations lymphocytaires a également permis de révéler la valeur pronostique de la sous population $CD8^+$ mais pas de la sous population de NK $CD56^+$ dans les deux cohortes. Dans un modèle multivarié avec d'autres paramètres cliniques dont la valeur pronostique a déjà été validée, la lymphopénie $CD4^+$ apparait comme un facteur prédictif indépendant de SG avec la ménopause et la neutropénie dans la cohorte A. Cette valeur pronostique de la lymphopénie $CD4^+$ est confirmée dans la cohorte B même si les autres paramètres prédictifs issus du modèle multivarié sont différents (PS et le taux de LDH) du fait du stade métastatique plus avancé des patientes.

Parmi les cytokines, nous avons mis en évidence une corrélation entre la présence d'IL-7 et une survie globale réduite chez les patientes en première rechute mais pas à un stade plus avancé de la pathologie. D'autre part, il existe une forte corrélation entre lymphopénie sévère et faible taux de CCL22. Tout comme la lymphopénie sévère, le taux de CCL22 circulant est associé à un mauvais pronostique chez les patientes en première rechute. Au sein des cytokines inflammatoires, un taux élevé de TNFα est également associé à un mauvais pronostique lors de la première rechute mais pas dans les phases les plus avancées de la pathologie.

En conclusion, la lymphopénie $CD4^+$ <0.45 Giga/L est un facteur pronostique de la SG dans le cancer du sein en phase métastatique quel que soit la ligne thérapeutique. L'augmentation du taux d'IL-7 circulants pourrait refléter la diminution des lymphocytes circulants qui sont les principaux consommateurs de cette cytokine. D'autre part, un taux élevé de TNFα, une cytokine inflammatoire, est associé à un mauvais pronostique, ce qui vient renforcer l'hypothèse selon laquelle l'inflammation a un impact majeur sur la progression tumorale. Ces résultats soulignent encore une fois l'importance du suivi du système immunitaire dans la prise en charge des patients atteints de cancer solide en phase métastatique.

Article en cours de rédaction

$CD4^+$ lymphopenia is a reliable independent poor prognosis factor in metastatic breast cancer patients according to the line of chemotherapy treatment

Trédan O.[1], Manuel M.[2,5], Chabaud S.[3], Clapisson G.[4], Bardin C.[4], Rigal C.[4], Biota C. [2,4], Bachelot T.[1,2], Bajard A. [3], Pasqual N.[5], Caux C.[2,4], Blay JY[1,2,4] and Ménétrier-Caux C[2,4].

Affiliation

[1] Department of medical oncology, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

[2] Team 11 "Therapeutic targeting of the tumor cell and its immune environment", INSERM U-1052/CNRS 5286, CRCL de Lyon, F-69008 Lyon, France

[3] Biostatistic Unit, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

[4] Immuno-monitoring and Innovation in Immunotherapy Plateform, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec Lyon, 69008, France

[5] ImmunID Technologies, CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

Corresponding author: C. Ménétrier-Caux, CRCL INSERM U-1052/CNRS 5286, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69373 Lyon cedex 08, France.
Phone (33) 4 78 78 27 50 ; Fax(33) 4 78 78 27 20 ; e-mail christine.caux@lyon.unicancer.fr

Acknowledgments: This project has been financially supported by CLARA. M. Manuel is a grant holder of the ANRT with financial support of ImmunID. For his last PhD year, he is financed by an ARC students' fellowship.

Abstract

Background: Prediction of survival for metastatic breast cancer (MBC) patients remains a major clinical challenge. Most studies proposed prognostic scores based on clinical criteria that are often subjective. We already demonstrated that global lymphopenia count is a prognostic factor for overall survival in various populations of patients including MBC patients. In this study, we aim to evaluate the impact of different lymphocyte subsets and the plasma levels of various cytokines and chemokines to improve our immune-based prognostic model.

Methods: We analysed the predictive value of immune parameters in two prospective cohorts of locally advanced MBC at diagnostic of relapse before treatment with first line chemotherapy (Cohort A, n= 103 patients) and advanced MBC patients at time of relapse after at least one line of chemotherapy and who received further chemotherapy (Cohort B, n= 112 patients). Extensive phenotypic analyses were performed on fresh whole blood. Plasma cytokines levels were measured using commercially available Luminex-based multiplex kits. Prognostic value of cytokines were analyzed either individually or after clustering into 3 groups based on biological pathways, group 1: Th1 type response and T-cell proliferation (IL-2, IL-7, IL-15, IFNγ, IL-12p40, IFNα2, GM-CSF); group 2: Th2 type response (IL-10, IL-13, CCL22), and group 3: inflammatory type response (IL-1β, IL6, IL-17, TNFα).

Results: In the cohort A, $CD4^+$ T cell levels <0.45 Giga/L (52.4% of patients) were associated with worse OS (HR=2.518 [CI95%=1.512-4.191], p=0.0004). In the cohort B, 48% of patients had received one previous line of chemotherapy; 52% had received more than one. $CD4^+$ T cell levels <0.45 Giga/L (70.3% of patients) were also associated with worse OS (HR=1.697 [CI95%=1.036-2.779], p=0.036). Importantly, the impact of $CD4^+$ lymphopenia on OS was significantly higher in cohort A (10.10 months median OS for $CD4^+$ lymphopenic patients vs 24.92 months for the others) than in

cohort B (6.66 months median OS for $CD4^+$ lymphopenic patients *vs* 13.11 months for the others).

In cohort A, high plasmatic levels of IL-7 and TNFα (>3^{rd} quartile) and low CCL22 (<1^{st} quartile) were associated with poor OS in univariate analysis. In more advance patients (cohort B), inflammatory cytokine cluster, was a prognostic factor for OS (HR=1.10 [CI95%=1.02-1.17], p=0.009).

In multivariate analysis $CD4^+$ lymphopenia (<0.45 Giga/L) remained independent prognostic factor of OS in the two cohorts (cohort A: HR=2.632 [CI95%=1.543-4.490], $p<10^{-4}$ and cohort B: HR=2.137 [CI95%=1.204-3.792], p=0.009 respectively) together with neutropenia ($p<10^{-4}$) and menopause (p=0.026) for cohort A and LDH >600 UI/ml (p<10-4) and PS>1 (p=0.026) for cohort B.

Conclusions: Combination of lymphocyte $CD4^+$ count with PS and biological covariates is an effective strategy to predict OS of MBC patients whatever the line of chemotherapy. This identification of patients refractory to standard of care will allow to propose innovative therapy to these patients.

Introduction

Prognostic determinants of patients with metastatic breast cancer (MBC) can facilitate the design of clinical trials and help the physician discuss treatment options with the patients and their families. In early-stage disease, several histological parameters are clinically useful to predict the risk of relapse and the risk of death. In the metastatic setting, the results of different prognostic studies are often inconsistent or contradictory [1-4]. While age, performance status (PS) and site of metastasis [3-5] are most consistently associated with outcome, it remains difficult to predict the course of disease in individual patients. Prognostic factors of the initial primary tumour or disease-free interval (DFI) may help to predict survival for metastatic disease [1, 3, 4]. Due to the heterogeneity in survival among 1st line or more advanced MBC patients, it is a need to characterize prognostic factors for identifying most at risk patients to adapt their therapeutic strategy [6]. In an attempt to enhance predictive power, we developed various scoring systems integrating combinations of clinical and biological factors [5, 7-16]. Thus, lymphopenia has been shown to be an independent prognostic factor for mortality in several tumour types including MBC [5, 10, 13, 15, 17]. One of our main interests was to determine the prognostic value of low level of specific lymphocyte subpopulations in the setting of first-line and subsequent chemotherapy for advanced cancer. Indeed, we had previously demonstrated that a $CD4^+$ count of less than 0.45 Giga/L was associated with febrile neutropenia and raised risk of death within 31 days of chemotherapy in a mixed population of lymphoma, myeloma and solid tumour patients [10] and toxicity of chemotherapies in solid tumors including MBC [15].

The purpose of the present study was to determine the validity of $CD4^+$ lymphopenia as an independent prognostic factor for MBC patients, as well as to assess the prognostic value of other lymphocyte sub-type counts. Furthermore, we aimed to assess other circulating immune parameters, specifically cytokines. In patients at 1st relapse (cohort A) but not in more advanced one (cohort B), either low CCL22 levels, high IL-7 or TNFα levels were of poor prognosis for OS in univariate analysis, whereas inflammatory cytokines appeard as good prognosis in more advanced ones.

Methods

Patients

We retrospectively analysed the results of two prospective trials conducted successively by our group of investigators to assess the predictive value of biological parameters for MBC patients at 1st line of chemotherapy (Cohort A) or more advanced MBC patients (Cohort B). The first cohort (A) consisted of 103 patients >18 years old with histologically proven MBC treated with first-line chemotherapy between November 2005 and May 2010. The second cohort (B) consisted of 112 patients >18 years old with histologically proven MBC who had relapsed after at least one line of chemotherapy and who received further chemotherapy between December 2000 and October 2005.

Patients with a declared HIV disease or not covered by the French health insurance system were excluded. Written informed consent was obtained from each patient. The institutional ethics committee approved each study protocol before implementation: on March 16, 2004 for cohort A, and on March 17, 2000 for cohort B.

Data collection

Age, Eastern Cooperative Group PS, time since diagnosis of the initial breast cancer (disease-free interval—DFI), tumour stage, histology, ER, PR, HER2/neu status, number of positive lymph nodes, number and sites of metastases, prior chemotherapy or endocrine treatment (including the adjuvant setting), and the nature of the metastatic treatment were collected.

In cohort A, blood samples were drawn before any chemotherapy was administered. In cohort B, blood was taken 3 to 4 weeks after the last administration of chemotherapy from the previous line of treatment.

Phenotypic analysis

Phenotype of peripheral blood lymphocyte subsets was performed on 100µL whole blood samples collected on EDTA. 5.10^5 to 1.10^6 cells were stained with PE conjugated

anti-CD4 antibody (Becton-Dickinson, Pont de Claix, France). After red cell lysis, cells were washed in PBS and analyzed on flow cytometer (FacScan, BD Biosciences). Percentage of $CD56^+$ NK cells, $CD8^+$ T cells, $CD4^+$ T cells as well as memory ($CD4^+CD45RO^+$) or naïve ($CD4^+CD4^+45RA^+$) subsets (for cohort A only) among lymphocytes was quantified using Cellquest software (BD Biosciences) and absolute number of each cell subset was calculated.

In both cohorts, patients were divided according to their absolute number of T cells subsets: for global lymphopenia (<1 Giga/L vs ≥ 1 Giga/L), for $CD4^+$ level (< 0.45 Giga/L *vs* ≥ 0.45 Giga/L). Similar analyses were performed for $CD8^+$ levels (<0.35 Giga/L *vs* ≥0.35 Giga/L) and $CD56^+$ levels (<0.19 Giga/L *vs* ≥ 0.19 Giga/L), according to previous studies (10, 15, 18).

Plasma cytokines quantification:

EDTA Blood samples were collected and stored at -80°C after centrifugation. Plasma cytokines levels have been measured using commercially available Luminex-based multiplex kits (Millipore). The impact of some of cytokines analyzed independently (IL-7, CCL22) on OS was performed using cut-off values (3^{rd} quartile for IL-7 and 1^{st} quartile for CCL22).

Survival analysis

The primary endpoint of this study was to assess different lymphocyte phenotype levels as well as circulating cytokines as prognostic scores for overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in MBC patients. OS was defined as the time from inclusion to date of death or date of last follow-up for patients alive at last contact. PFS was defined as the time from inclusion to date of progression. Survival distributions in prognostic groups were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences between groups were compared using log-rank tests.

Univariate analysis

To evaluate the impact on survival of clinical and biological factors known to be relevant in cancer prognosis, potential prognostic factors (including lymphocyte counts) were

included in univariate Cox proportional hazard regression models and were retained as prognostic factors with a p= 0.10 level of significance. All statistical analyses were performed using the procedure of SAS v.9.2 (Cary) package and SPSS V12.0 package (IBM SPSS).

Methods for the cytokine clustering

In addition, we analyzed all the cytokines after their clustering into 3 groups based on biological pathways i) group 1: Th1 response and T-cell proliferation (IL-2, IL-7, IL-15, IFNγ, IL-12p40, IFNα2, GM-CSF), ii) group 2: Th2 response (IL-10, IL-13, CCL22) and group 3: inflammatory response (IL-1β, IL-6, IL-17, TNFα). In this context, to avoid having to define a hypothetic cut-off for each component, cytokines were analyzed as quantitative parameters. After standardization to overcome the normality assumptions, three summary variables corresponding to each of the three cytokine groups were derived from the initials fourteen parameters. The 3 cytokine scores were created for each patient by summing the products of each normalized component and it's β coefficient estimated in an univariate Cox model.

Multivariate analysis

Candidate prognostic factors with a 0.10 level of significance were retained for the multivariate model analysis. To select independent prognostic variables, a backward selection procedure at the p = 0.05 level of significance was implemented.

Results

Patients' characteristics

In cohorts A and B, 64/103 (62%) and 53/112 (55%) patients respectively received adjuvant chemotherapy for the treatment of the primary tumour. The median time since diagnosis of the initial breast cancer was 3.10 and 3.6 years respectively. In cohort B, 48% of patients had received one prior line of chemotherapy in the metastatic setting and 52% more than one. The median OS and PFS were respectively 17.67 and 6.85 months for cohort A and 7.67 and 3.61 months for cohort B (**Figure S1**).

Table 1 described the patients and tumour characteristics in the two cohorts. The median of age of these two cohorts were 57 years [range: 34-84] and 56 years [range: 32-78] for cohort A and B respectively). Cohort A consisted in 72.8%, ER^+, 58.25% PgR^+, 11.84% Her2/neu amplified patients and 17.48% patients with triple negative (TN) breast cancer. Cohort B consisted in 59.8%, ER^+, 56.25% PgR^+, 23.1% Her2/neu amplified patients and 22.6% patients with TN tumors. Median range of follow up was 17.67 months in the cohort A *vs* 7.44 months in the cohort B.

In univariate analysis (**Table 2**), in the cohort A, PNN < 7.5 Giga/L ($p < 10^{-4}$), TN (p=0.043), haemoglobin <11.5g/dL (p=0.005), LDH ≥ 600 UI/L (p=0.033), menopause (p=0.007) and number of metastatic sites (p=0.056) were found of poor prognosis for OS, whereas only PS>1 ($p<10^{-4}$), haemoglobin (p=0.008) and LDH ($p<10^{-4}$) appeared as poor prognosis for OS in advanced MBC (cohort B).

Gobal lymphopenia is of poor prognosis factor for OS and PFS

In this study, the incidence of lymphopenia (<1Giga/L) was 42.7% for cohort A and 51.9% for cohort B. As previously reported in breast carcinoma (10, 15), Manuel *et al* in press), lymphopenia was associated in cohort A with a PS >1 (54.5% of lymphopenic patients had a PS>1 compared to only 15.25% of non lymphopenic; p=0.001, khi-deux de Pearson). Similar association was observed in cohort B (p=0.036).

Overall survival

In cohort A, univariate analysis revealed that lymphopenia was strongly associated to OS with a poor survival for patients with low lymphocyte count (<1Giga/L) compared to

the others (median OS: 9.61 months *vs* 24,92 months ; log rank p value=0.000) (**Figure 1A**). This was confirmed with patients with severe lymphopenia (<0.7Giga/L) (**Figure 1B**) (median OS of 8.43 months *vs* 22.62 months; log rank p value =0.006). In cohort B, global lymphopenia and severe lymphopenia, were associated with poorer OS (median: 5.83 months *vs* 12.59 months; log rank p value = 0.011 and median survival 4.49 months *vs* 9.02 months; log rank p value =0.000 respectively) (**Figure 1C, 1D**).

Progression-free survival

On cohort A, TN tumours (p=0.005), number of metastatic sites (p=0.022), neutropenia (<7.5 Giga/L) (p=0.000), global lymphopenia (1 Giga/L) (p=0.017) but not severe lymphopenia were associated with poorer PFS (**Table S1, Figure S2A & S2B**). In contrast in cohort B, only haemoglobin (<11.5 g/dL) (p=0.014) and severe lymphopenia (<0.7Giga/L) (p=0.003) correlated to PFS in univariate analysis (**Table S1, Figure S3A & S3B**).

$CD4^+$ lymphopenia is an independent prognosis factor for OS and PFS

Phenotypic analysis revealed that 52.4% of cohort A and 69.5% of cohort B presented a $CD4^+$ lymphopenia that was only associated with a PS >1 in univariate analysis (cohort A : $p<10^{-4}$, cohort B: p=0.001). In cohort A, where a extensive phenotypic analysis was performed we observed that $CD4^+$ lymphopenia was associated with a reduced percentage of naïve $CD4^+CD45RA^+$ T cells whereas percentage of memory ones were not strongly affected (**Figure S4**).

Overall survival

In univariate analysis, $CD4^+$ lymphopenia appeared as a highly significant poor prognosis factor for OS (median= 10.10 *vs* 24.92 months, p=0.0002) in cohort A (**Figure 2A**), this being confirmed to a lower extend in cohort B (median survival: 6.66 months *vs* 13.11 months; log rank p value =0.033) (**Figure 2C**).

Interestingly, as we recently reported in an old retrospective cohort with more than 10 years follow up [18], severe $CD4^+$ lymphopenia (<0.2 Giga/L), that represents 16.5% in cohort A, segregated patients with very poor prognosis as severe $CD4^+$ lymphopenic patients have a median of survival of 2.52 months compared to the others for whom

median survival rises 22.62 months ($p<10^{-4}$)(**Figure 2B**). In contrast, whereas 24.27% of severe $CD4^+$ lymphopenic patients were also observed in more advanced MBC (cohort B), they did not evolve differently from the others (p=0.104) (**Figure 2D**).

Progression-free survival

In cohort A, $CD4^+$ lymphopenia (<0.45 Giga/L (p=0.059) and <0.2 Giga/L (p=0.008)) were predictors of poorer PFS in univariate analysis whereas (**Table S1, Figure S2D & S2E**), only severe $CD4^+$ lymphopenia appeared associated with reduced relapse free survival in cohort B (**Table S1, Figure S3E**).

$CD8^+$ lymphopenia impacts OS in the two cohorts of MBC patients

As $CD19^+$, $CD8^+$ and $CD56^+$ T cell levels were found significantly lower in metastatic patients who experienced febrile neutropenia after chemotherapy treatment [(10)], we tested their impact in our series. In cohort A, $CD8^+$ lymphopenia (**Figure 3A)** (median 13.57 months *vs* 23.16 months; log rank p value =0.023) but not $CD19^+$ appeared as poor prognosis factor in univariate analysis (**Figure 3B**). In advanced MBC $CD8^+$ lymphopenia remained of poor prognosis (median =6.72 months vs 12.59 months; log rank p value =0.017) (**Figure 3D**) together with $CD19^+$ lymphopenia (median 5.87 months *vs* 10.79 months; log rank p value =0.0143)(**Figure 3E**). In contrast $CD56^+$ lymphopenia did not affect survival in both cohorts (**Figure 3C and 3F**).

$CD4^+$ lymphopenia is an independent factor of poor prognosis in OS and PFS

The relevance of $CD4^+$ lymphopenia as an independent biomarker for OS was assessed on these two cohorts by inclusion in a multivariate model together with significant clinical and biological parameters. For cohort A, $CD4^+$ lymphopenia was included together with menopause, PS, liver metastasis, number of metastatic sites, haemoglobin, TN tumours and PNN count but not LDH, despite its prognostic value in univariate analysis, as 29 values were missing. For cohort B, $CD4^+$ lymphopenia was included together with haemoglobin, PS, number of metastatic sites and LDH in the multivariate model.

For cohort A, three factors were associated with a significantly poorer prognosis and with an increased hazard ratio of death: menopause (p= 0.026, HR=1.878, CI 95% [1.080-3.266]), neutropenia ($p<10^{-4}$, HR=4.20, CI 95% [2.20-8]) and $CD4^+$ lymphopenia ($p<10^{-4}$, HR=2.632, CI 95% [1.543-4.490]) (**Table 3A**). For cohort B, along with poor PS (PS>1)(p=0.026, HR=1.87, CI 95% [1.079-3.245]) and high LDH levels ($p<10^{-4}$, HR=3.33, CI 95% [1.877-5.908]), $CD4^+$ lymphopenia (p=0.009, HR=2.137, CI 95% [1.204-3.792]) appeared as independent factors of poor prognosis for OS (**Table 3B**).
Similar analyses were performed to assess the impact of global lymphopenia and CD4 lymphopenia on PFS on the two cohorts (**Table S2A & S2B**). In cohort A, the variable CD4 lymphopenia was included together with clinical variables in a multivariate analysis. $CD4^+$ lymphopenia (HR=2.318 [1.336-4.022] p=0.003) together with neutropenia HR=4.65 [2.487-8.069] were associated to an increased risk of progression (**Table S2A**). In cohort B, neither severe lymphopenia nor $CD4^+$ lymphopenia, were predictive of reduced PFS in a multivariate analysis including LDH (600UI/L) and haemoglobin (>11.5g/dL) (**Table S2B**).

Prognostic value of plasma cytokines levels

IL-7

Whereas median IL-7 plasmatic levels in healthy donors plasma is 10.1pg/ml (6.5-15.7pg/ml) [(19)], in cohort A, 27.7% patients have detectable levels of IL-7 in their plasma (6.2-181pg/ml) and the presence of high plasmatic IL-7 levels (> 3^{rd} quartile: 40pg/ml) was associated, in univariate analysis, with a reduced survival (median OS = 9.25 months compared to 21.7 months for the others) (**Figure 4A**). This observation was not verified in more advanced patients (cohort B) where the levels of IL-7 were lower with only 13% positive patients.

CCL22

Intriguingly among plasmatic chemokines and cytokines analysed, median plasmatic CCL22 levels were increased in MBC patients either at first relapse (cohort A median= 420.5 pg/ml)) or more advanced disease (cohort B median= 923 pg/ml) compared to

healthy donors (median = 228 pg/ml) (20) or primary BT patients (n=60, unpublished results) (median = 378.9 pg/ml). Interestingly, in cohort A, low CCL22 levels (<1st quartile = 342.22 pg/ml) correlated, in univariate analysis, with a poor prognosis of OS (**Figure 4C**) (median=8.43 months compared to 17.61 months) whereas no impact was detectable in more advanced patients (data not shown).

This could result from the strong correlation between CCL22 and global and severe lymphopenia at the periphery in cohort A (p=0.001 and p=0.022 respectively) (**Figure 5A and 5B**) and with total (p=0.034) (**Figure 5F**) and severe CD4 lymphopenia (<0.2 Giga/L, p=0.009) (**Figure 5H**) in advanced patients (cohort B).

Inflammatory cytokines

Among inflammatory cytokines subgroup, high TNFα plasmatic levels (>3rd quartile) appeared associated with a poor prognosis in cohort A (median= 10.1 months for ≥ 3rd quartile *vs* 21.7 months for < 3rd quartile) but not in cohort B.

We analysed together the cytokines and chemokines quantified after pooling them into three groups (group 1 Th1 response, group 2: Th2 response and group 3: inflammatory response). Whereas none of these groups appeared significant in cohort A, in more advanced MBC patients, inflammatory cytokines (IL-6, TNFα, IL-17, IL-1β) appeared of poor prognosis for OS in univariate analysis with a major impact of IL-6 (**Figure 6**).

Discussion

Yet being able to make a reasonable judgement about prognosis is important in allowing patient and clinician together to make an informed decision about optimum management. Our group has developed different prognostic scores using biochemical variables. Lymphopenia has been associated with a higher incidence of febrile neutropenia and risk of early death after chemotherapy. Low lymphocyte $CD4^+$ levels have been associated with increased risk of febrile neutropenia and early death after chemotherapy in several types of cancer [10].

The analysis of two prospective cohorts, confirmed that global lymphopenia (< 1 Giga/L) as well as severe lymphopenia (<0.7 Giga/L) are of poor prognosis for OS in MBC patients whatever the line of treatment [5, 15, 17]. However, the impact on OS was much greater in patients at 1^{st} line chemotherapy (cohort A) than in patients $>2^{nd}$ line (cohort B).

The $CD4^+$ subset was the major T cell subset decreased during the evolution of the metastatic disease (median count of absolute $CD4^+$ lymphocytes = 4.3 Giga/L in cohort A *vs* 3.3 Giga/L in cohort B, p=0.043) whereas the global lymphocyte count and the other subsets ($CD8^+$ and $CD56^+$) were not differently affected in the 2 cohorts (**Figure S5**). Consequently, the CD4/CD8 ratio also decreased in advanced stage of the metastatic disease (not shown).

An increased proportion of $CD4^+$ lymphopenic (<0.45 Giga/L) patients appeared during the evolution of the MBC disease: in cohort A gathering patients at the metastatic stage and prior chemotherapy treatment, 52% were $CD4^+$ lymphopenic whereas 71% were detected in cohort B. Moreover, within the cohort B including more advanced patients, the number of previous lines of chemotherapy impacted the percentage of $CD4^+$ lymphopenic patients (**Figure S6**) with more $CD4^+$ lymphopenia within 2^{nd} line and $>3^{rd}$ line (76 and 80%) whereas this percentage was reduced (43.2%) in patients at 3^{rd} line) that could, in part result, either from toxicity of the chemotherapy regimen prescribed depending upon the stage of the disease or from the physical deterioration of the patients (> 3^{rd} line).

Within lymphocytes subsets, whereas $CD56^+$ lymphopenia did not have any impact on survival (OS or PFS), $CD8^+$ lymphopenia (<0.35 Giga/L) correlated with a poorer OS and PFS in univariate analysis in the two cohorts whereas $CD19^+$ B cell lymphopenia was of poor prognosis only in more advanced patients. However, these variables are no more significant after inclusion in a multivariate analysis model. In contrast, $CD4^+$ lymphopenia or severe $CD4^+$ lymphopenia (<0.2 Giga/L) appeared as independent predictive factor for OS in patients at 1^{st} line metastasis and to a lower extent in more advanced patients suggesting the major role of $CD4^+$ T cells to fight against tumor or opportunistic infections.

Interestingly the degree of quantitative alteration of lymphocyte subsets was a major predictor of survival as all MBC patients from cohort A (16.5%) with a severe $CD4^+$ lymphopenia (<0.2 Giga/L) deceased before 22.5 months with a median OS of 2.52 months compared to >22.5 months for the others. In contrast, in more advanced MBC (cohort B) whereas higher incidence of severe $CD4^+$ lymphopenic patients was observed (24.27%), they did not evolve differently whatever their line of chemotherapy treatment. But, in depth analysis highlighted that, within patients without chemotherapy regimen at adjuvant phase, severe $CD4^+$ lymphopenia was associated with a very poor prognosis (all patients are deceased before 10 months in cohort B) (**Figure S7A and S7B**) suggesting that the most vulnerable patients with severe $CD4^+$ lymphopenia did not survive to their first line chemotherapy treatment. In line with this, on cohort A (1^{st} line), the impact of severe lymphopenia was observed even in patients who received adjuvant chemotherapy (**Figure S7C and S7D**).

The importance of $CD4^+$ T cells in anti-tumour immune response was revealed only last ten years [(21)]. $CD4^+$ T cells could either favour cellular immune response either by cytotoxic effect of $IFN\gamma$ on tumour cells *via* macrophages activation or through the activation of NK cells and the differentiation of specific $CD8^+$ cytotoxic T cells (Th1 subset) or promote humoral immunity by activating B lymphocytes and inducing their secretion of immunoglobulins. The role of $CD4^+$ T cells on these two axes of immune response could explain the more important impact of this $CD4^+$ subpopulation on OS. Accordingly, Peron *et al* recently demonstrated the negative impact of $CD4^+$

lymphopenia on long term survival on an old series of patients with metastatic disease including breast carcinoma, sarcoma and lymphoma and the better evolution of patients with increased $CD4^+$ levels under chemotherapy [18].

As AICD and reduced thymic function have been suggested as possible mechanisms of lymphopenia observed on metastatic patients in periphery [17] we tested this hypothesis on cohort A in which memory and naive $CD4^+$ T cells have been analysed. Memory $CD4^+$ subset percentage did not differ within lymphopenic and non lymphopenic patients suggesting that AICD, known to favour memory T cells depletion by chronic activation leading to their progressive and irreversible death, is probably not the main mechanism involved in the lymphopenia observed.

In contrast, we observed a significant reduction of the naïve $CD4^+CD45RA^+$ T cells proportion within $CD4^+$ lymphopenic population suggesting that the generation of new naïve $CD4^+$ T cells is altered likely as a consequence of reduced thymic function or recruitment. However, there was no correlation between this $CD4^+$ lymphopenia and patients' age analysed as dichotomic or continuous variable. This deficit in naïve $CD4^+$ T cells could also result from an alteration of homeostatic cytokines involved in T cell expansion like IL-7 either at the IL-7Rα level on T cells or plasmatic circulating IL-7 levels. 27.7% of patients from cohort A have detectable free plasmatic IL-7 levels higher than in healthy donors and presence of IL-7 correlated in univariate analysis with a reduced survival as in cohort A whereas only 13% of patients in cohort B have detectable levels that did not impact their survival. Moreover, in cohort A, IL-7 was detectable in 41% (7/17) of severe $CD4^+$ lymphopenic patients whereas only 25% (21/84) were positive in the non lymphopenic ones. In line with this, in HIV patients low $CD4^+$ T cells absolute numbers were associated with high plasmatic IL-7 levels [22] that may result either from a lack of T cells consumption or an overproduction of the cytokine. Taken together these results suggest that lymphopenia do not result from an IL-7 pathway alteration.

In contrast in more advanced MBC patients (cohort B), the pool of inflammatory cytokines (IL-6, TNFα, IL-17, IL1β = group 3) appeared of poor prognosis for OS. This could be related to Coussens *et al* results [23] demonstrating the major impact of

inflammation in tumour progression through the increased invasiveness and angiogenesis.

Interestingly, CCL22 plasmatic levels were gradually increasing from healthy subjects and primary tumours, 1st relapse (cohort A) to advanced tumours (cohort B) suggesting it may reflect the tumour burden. Indeed, we recently described that in the primary breast tumours, transformed cells produced high CCL22 levels within tumour environment [24] that favour recruitment of CCR4^{+} Treg leading to a reduced OS [25].

Despite this association between CCL22 plasmatic levels and tumour burden, low plasmatic CCL22 concentrations (<1st quartile 342pg/ml) is associated to poor prognosis. This might be linked to the observed correlation in cohort A between low CCL22 levels and low lymphocytes counts (**Figure 5A**).

However, CCL22 could also be produced by immune cells (macrophages and dendritic cells) in the periphery [26, 27]. As CCL22 contribute to CCR4^{+}CD4^{+} naïve T cells thymic emigration [28], these increased plasma CCL22 levels detected in advanced tumours could also result from a host homeostatic mechanism to counterbalance the tumour-induced lymphopenia.

Taken together our data suggest that the quantitative alteration of immune cells subsets in the periphery and more particularly the CD4^{+} lymphopenia has a dramatic impact on the survival of MBC patients and defines a subpopulation of patients in need of innovative therapeutic strategies. A clinical trial exploring pre-treatment correction of lymphopenia, with IL-7 before starting chemotherapy is underway at our Institution. Modulation of plasmatic levels of chemokines and cytokines likely reflect both the alterations induced by tumour or microenvironment and host compensatory mechanisms to restore CD4 T cell numbers.

References

1 Chang,J., Clark,G.M., Allred,D.C., Mohsin,S., Chamness,G. and Elledge,R.M. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor, Cancer, *97:* 545-553, 2003.

2 Insa,A., Lluch,A., Prosper,F., Marugan,I., Martinez-Agullo,A. and Garcia-Conde,J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients, Breast Cancer Res.Treat., *56:* 67-78, 1999.

3 Largillier,R., Ferrero,J.M., Doyen,J., Barriere,J., Namer,M., Mari,V., Courdi,A., Hannoun-Levi,J.M., Ettore,F., Birtwisle-Peyrottes,I., Balu-Maestro,C., Marcy,P.Y., Raoust,I., Lallement,M. and Chamorey,E. Prognostic factors in 1,038 women with metastatic breast cancer, Ann.Oncol., *19:* 2012-2019, 2008.

4 Ryberg,M., Nielsen,D., Osterlind,K., Skovsgaard,T. and Dombernowsky,P. Prognostic factors and long-term survival in 585 patients with metastatic breast cancer treated with epirubicin-based chemotherapy, Ann.Oncol., *12:* 81-87, 2001.

5 Tredan,O., Ray-Coquard,I., Chvetzoff,G., Rebattu,P., Bajard,A., Chabaud,S., Perol,D., Saba,C., Quiblier,F., Blay,J.Y. and Bachelot,T. Validation of prognostic scores for survival in cancer patients beyond first-line therapy, BMC.Cancer, *11:* 95, 2011.

6 Dawood,S., Broglio,K., Ensor,J., Hortobagyi,G.N. and Giordano,S.H. Survival differences among women with de novo stage IV and relapsed breast cancer, Ann.Oncol., *21:* 2169-2174, 2010.

7 Bachelot,T., Ray-Coquard,I., Catimel,G., Ardiet,C., Guastalla,J.P., Dumortier,A., Chauvin,F., Droz,J.P., Philip,T. and Clavel,M. Multivariable analysis of prognostic factors for toxicity and survival for patients enrolled in phase I clinical trials, Ann.Oncol., *11:* 151-156, 2000.

8 Bachelot,T., Ray-Coquard,I., Menetrier-Caux,C., Rastkha,M., Duc,A. and Blay,J.Y. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients, Br.J.Cancer, *88:* 1721-1726, 2003.

9 Blay,J.Y., Chauvin,F., Le,C.A., Anglaret,B., Bouhour,D., Lasset,C., Freyer,G., Philip,T. and Biron,P. Early lymphopenia after cytotoxic chemotherapy as a risk factor for febrile neutropenia, J.Clin.Oncol., *14:* 636-643, 1996.

10 Borg,C., Ray-Coquard,I., Philip,I., Clapisson,G., Bendriss-Vermare,N., Menetrier-Caux,C., Sebban,C., Biron,P. and Blay,J.Y. CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer, Cancer, *101:* 2675-2680, 2004.

11 Penel,N., Delord,J.P., Bonneterre,M.E., Bachelot,T., Ray-Coquard,I., Blay,J.Y., Pascal,L.B., Borel,C., Filleron,T., Adenis,A. and Bonneterre,J. Development and validation of a model that predicts early death among cancer patients participating in phase I clinical trials investigating cytotoxics, Invest New Drugs, *28:* 76-82, 2010.

12 Ray-Coquard,I., Le,C.A., Rubio,M.T., Mermet,J., Maugard,C., Ravaud,A., Chevreau,C., Sebban,C., Bachelot,T., Biron,P. and Blay,J.Y. Risk model for severe anemia requiring red blood cell transfusion after cytotoxic conventional chemotherapy regimens. The Elypse 1 Study Group, J.Clin.Oncol., *17:* 2840-2846, 1999.

13 Ray-Coquard,I., Ghesquiere,H., Bachelot,T., Borg,C., Biron,P., Sebban,C., LeCesne,A., Chauvin,F. and Blay,J.Y. Identification of patients at risk for early death after conventional chemotherapy in solid tumours and lymphomas, Br.J.Cancer, *85:* 816-822, 2001.

14 Ray-Coquard,I., Borg,C., Bachelot,T., Sebban,C., Philip,I., Clapisson,G., Le,C.A., Biron,P., Chauvin,F. and Blay,J.Y. Baseline and early lymphopenia predict for the risk of febrile neutropenia after chemotherapy, Br.J.Cancer, *88:* 181-186, 2003.

15 Ray-Coquard,I., Cropet,C., Van,G.M., Sebban,C., Le,C.A., Judson,I., Tredan,O., Verweij,J., Biron,P., Labidi,I., Guastalla,J.P., Bachelot,T., Perol,D., Chabaud,S., Hogendoorn,P.C., Cassier,P., Dufresne,A. and Blay,J.Y. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas, Cancer Res., *69:* 5383-5391, 2009.

16 Seve,P., Ray-Coquard,I., Trillet-Lenoir,V., Sawyer,M., Hanson,J., Broussolle,C., Negrier,S., Dumontet,C. and Mackey,J.R. Low serum albumin levels and liver metastasis are powerful prognostic markers for survival in patients with carcinomas of unknown primary site, Cancer, *107:* 2698-2705, 2006.

17 Manuel,M., Tredan,O., Bachelot,T., Clapisson,G., Courtier,A., Parmentier,G., rabeony,T., Grives, ,A., Perez,S., Mouret,J.F., Perol,D., Chabaud,S., Ray-Coquard,I., Labidi-Galy,S.I., Heudel,P., Blay,J.Y., Caux,C., Pasqual,N. and Menetrier-Caux,C. Lymphopenia Combined with low TCR Diversity (divpenia) predictspoor Overall Survival in Metastatic Breast Cancer Patients, Onco Immunology, 2012 (in press)

18 peron,J., Cropet,C., Ray-Coquard,I., Clapisson,G., Philip,I., Borg,C., Cassier,P., Labidi-Galy,S.I., Tredan,O., Bachelot,T., Sebban,C., Biron,P. and Blay,J.Y.CD4 lymphopenia : a major prognostic factor for long term survival in cancer patients, ASCO Meeting, 29 2012 e21145(Abstract)

19 Clendenen,T.V., Arslan,A.A., Lokshin,A.E., Idahl,A., Hallmans,G., Koenig,K.L., Marrangoni,A.M., Nolen,B.M., Ohlson,N., Zeleniuch-Jacquotte,A. and Lundin,E. Temporal reliability of cytokines and growth factors in EDTA plasma, BMC.Res.Notes, *3:* 302, 2010.

20 Flytlie,H.A., Hvid,M., Lindgreen,E., Kofod-Olsen,E., Petersen,E.L., Jorgensen,A., Deleuran,M., Vestergaard,C. and Deleuran,B. Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis, Cytokine, *49:* 24-29, 2010.

21 Ossendorp,F., Toes,R.E., Offringa,R., van der Burg,S.H. and Melief,C.J. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity, Immunol.Lett., *74:* 75-79, 2000.

22 Napolitano,L.A., Grant,R.M., Deeks,S.G., Schmidt,D., De Rosa,S.C., Herzenberg,L.A., Herndier,B.G., Andersson,J. and McCune,J.M. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis, Nat.Med., *7:* 73-79, 2001.

23 DeNardo,D.G., Barreto,J.B., Andreu,P., Vasquez,L., Tawfik,D., Kolhatkar,N. and Coussens,L.M. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages, Cancer Cell, *16:* 91-102, 2009.

24 Faget,J., Biota,C., Bachelot,T., Gobert,M., Treilleux,I., Goutagny,N., Durand,I., Leon-Goddard,S., Blay,J.Y., Caux,C. and Menetrier-Caux,C. Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells, Cancer Res., *71:* 6143-6152, 2011.

25 Gobert,M., Treilleux,I., Bendriss-Vermare,N., Bachelot,T., Goddard-Leon,S., Arfi,V., Biota,C., Doffin,A.C., Durand,I., Olive,D., Perez,S., Pasqual,N., Faure,C., Ray-Coquard,I., Puisieux,A., Caux,C., Blay,J.Y. and Menetrier-Caux,C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome, Cancer Res., *69:* 2000-2009, 2009.

26 Godiska,R., Chantry,D., Raport,C.J., Sozzani,S., Allavena,P., Leviten,D., Mantovani,A. and Gray,P.W. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells, J.Exp.Med., *185:* 1595-1604, 1997.

27 Vulcano,M., Albanesi,C., Stoppacciaro,A., Bagnati,R., D'Amico,G., Struyf,S., Transidico,P., Bonecchi,R., Del Prete,A., Allavena,P., Ruco,L.P., Chiabrando,C., Girolomoni,G., Mantovani,A. and Sozzani,S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo, Eur.J.Immunol., *31:* 812-822, 2001.

28 Bleul,C.C. and Boehm,T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus, Eur.J.Immunol., *30:* 3371-3379, 2000.

FIGURES

Table 1: Characteristics of the two cohorts analyzed

		Cohort A (n=103)		Cohort B (n=112)	
		n	%	n	%
Age (median; range) (years)		57.1 (34.7 - 84.1)		55.9 (31.9 - 78)	
Menopause	no	38	37.25		
	yes	64	62.75		
Adjuvant chemotherapy	no	39	37.86	41	36.61
	yes	64	62.14	71	63.39
Adjuvant hormonotherapy	no	56	54.37	52	55.91
	yes	47	45.63	41	44.09
Number of previous chemotherapy treatment	1	n.a.	-	51	49.04
	2	n.a.	-	25	24.04
	≥ 3	n.a.	-	28	26.92
ECOG Performance status (PS)	0/1	70	67.96	59	52.68
	> 1	33	32.04	53	47.32
ER	no	28	27.18	39	40.20
	yes	75	72.82	58	59.8
PgR	no	43	41.75	42	43.75
	yes	60	58.25	54	56.25
Her2/neu amplifiaction	no	79	83.16	70	76.92
	yes	16	11.84	21	23.08
Triple Negative	no	85	82.52	72	77.42
	yes	18	17.48	21	22.58

n.a. = non applicable

Table 2: Univariate analysis on OS on cohort A and cohort B

		cohort A				cohort B			
		number	HR	CI (95%)	p value	number	HR	CI (95%)	p value
Age (years)	< 60 (R)	60			0.722	75			0.577
	≥ 60	43	1.09	[0.67 - 1.782]		37	0.886	[0.580 - 1.354]	
Hemoglobin (g/dL)	≥ 11,5 (R)	70			**0.005**	63			**0,008**
	< 11,5	32	2.02	[1.23 - 3.31]		49	1,729	[1.152 - 2.594]	
PNN (Giga/L)	≥ 7,5 (R)	88			**0.000**	20			0.208
	< 7,5	14	4.137	[2.222 - 7.705]		92	0,728	[0.454 - 1.193]	
PS	0/1(R)	70			**0.067**	59			**0.000**
	> 1	33	0.596	[0.968 - 2.631]		53	3.125	[2.014 - 4.849]	
Liver metastasis	no (R)	48			**0.043**	43			0.408
	yes	55	1.067	[1.016 - 2.675]		67	1.188	[0.790 - 1.788]	
Bone metastatis	no (R)	34			0.688	61			0.612
	yes	69	1.114	[0.657 - 1.889]		49	1.109	[0.744 - 1.654]	
Number of metastatic sites	1-3 (R)	54			**0.056**	59			0.127
	≥ 4	49	1.631	[0.988 - 2.693]		53	1.444	[0.901 - 2.314]	
Triple negative tumors	no (R)	85			**0.043**	72			0.649
	yes	18	1.904	[1.020 - 3.554]		21	1.128	[0.671 - 1.896]	
LDH (UI/L)	< 600 (R)	62			**0.033**	51			**0,000**
	≥ 600	12	2.09	[1.062 - 4.130]		42	3.17	[1.964 - 5.119]	
Menopause	no (R)	38			**0.007**				
	yes	64	2.095	[1.219 - 3.599]					
Lymphopenia (Giga/L)	≥ 1 (R)	59			**0.000**	49			**0.012**
	< 1	44	3.036	[1.84 - 5.01]		53	1.717	[1.127 - 2.614]	
Severe lymphopenia	≥ 0.7 (R)	80			**0.007**	71			**0.001**
(Giga/L)	< 07	23	2.09	[1.622 - 3.641]		32	2.19	[1.405 - 3.413]	
CD4 lymphopenia	≥ 0.45 (R)	49			**0.000**	30			**0.036**
(Giga/L)	< 0.45	54	2.518	[1.512 - 4.191]		71	1.697	[1.036 - 2.779]	
Severe CD4 lymphopenia	≥ 0.2 (R)	86			**0.000**	78			**0,107**
(Giga/L)	< 0.2	17	5.37	[2.875 - 9.725]		25	1.467	[0.921 - 2.338]	

Figure 1 : Analysis of GLOBAL LYMPHOPENIA on cohorts A and B

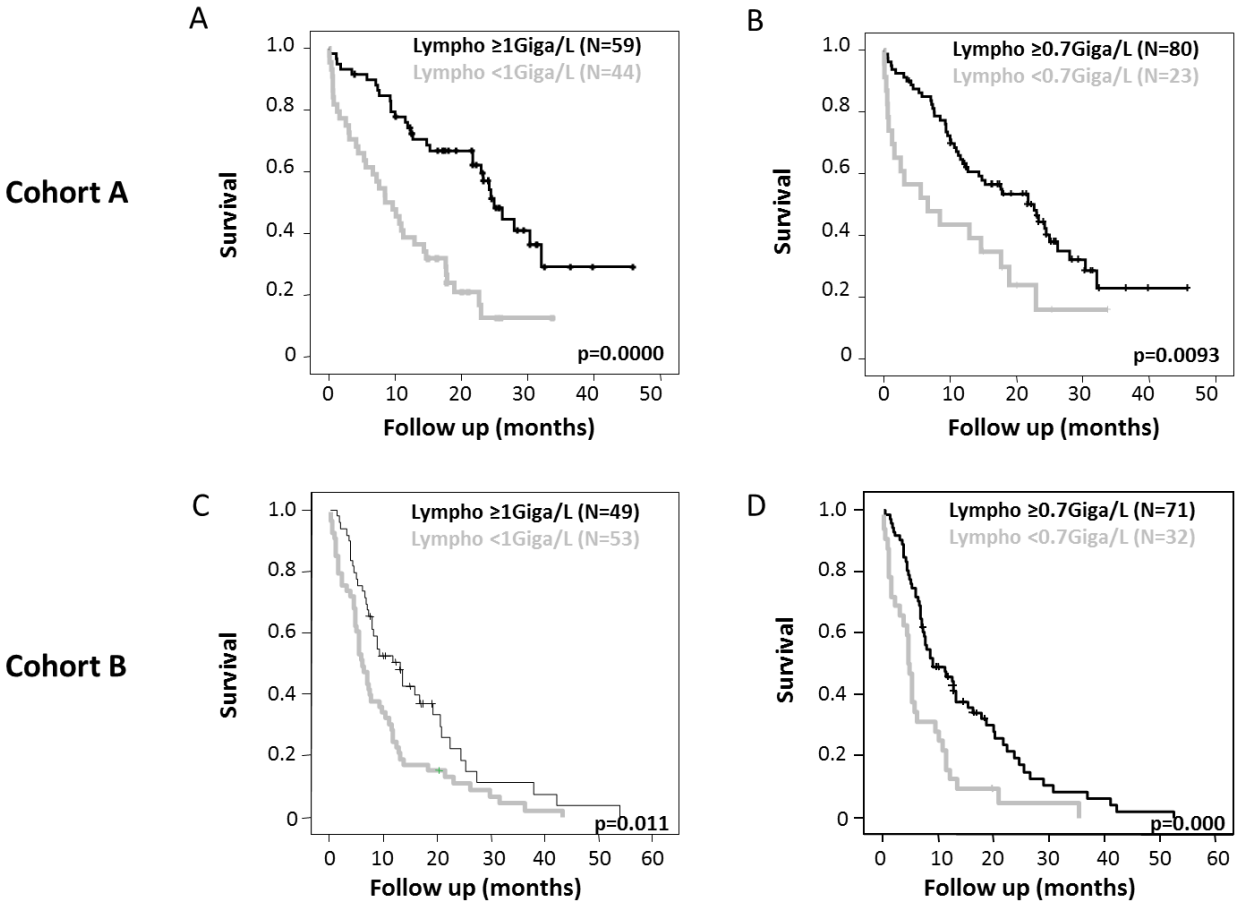


Figure 2 : Analysis of $CD4^+$ and severe $CD4^+$ lymphopenia on cohorts A and B

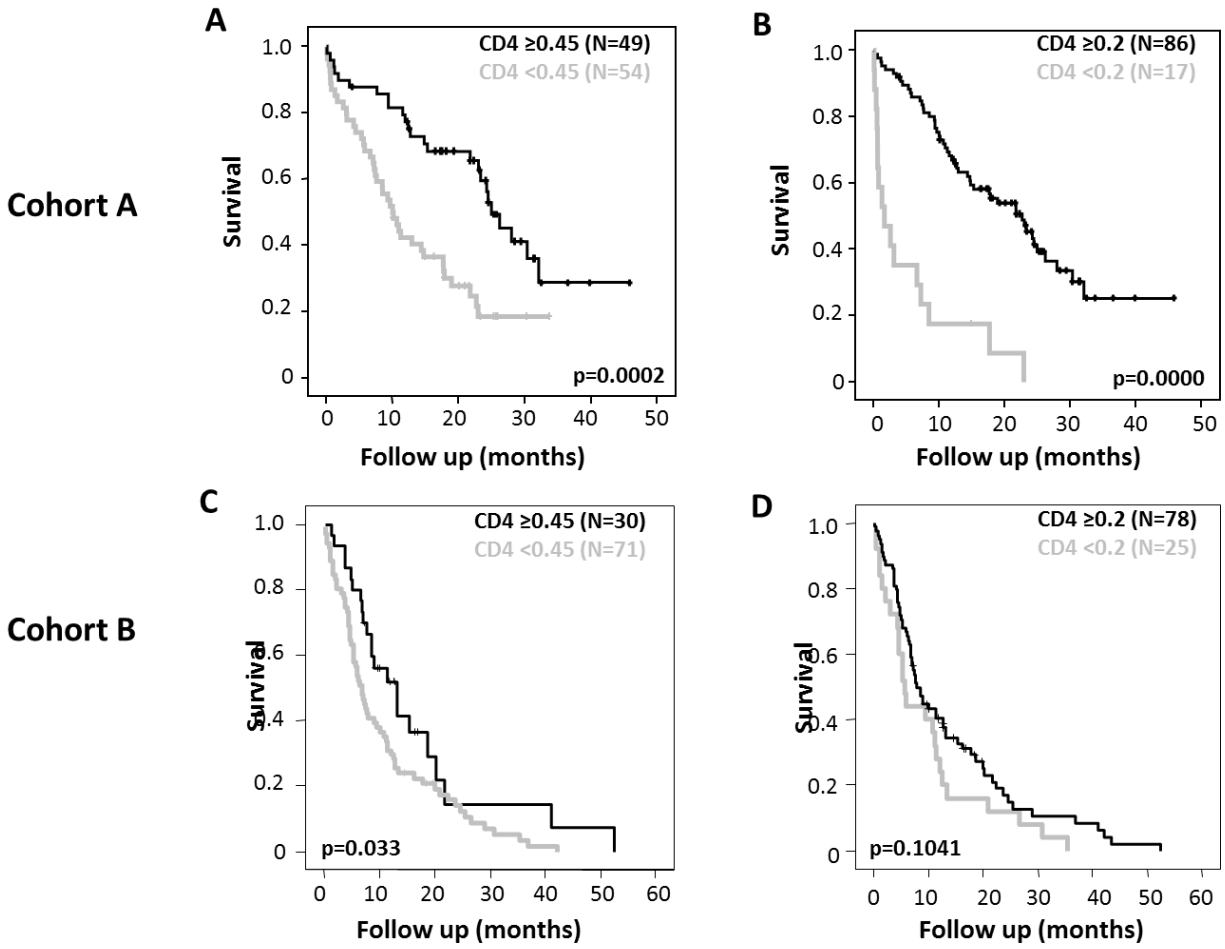


Figure 3 : Analysis of $CD8^+$, $CD19^+$and $CD56^+$ lymphopenia on cohorts A and B

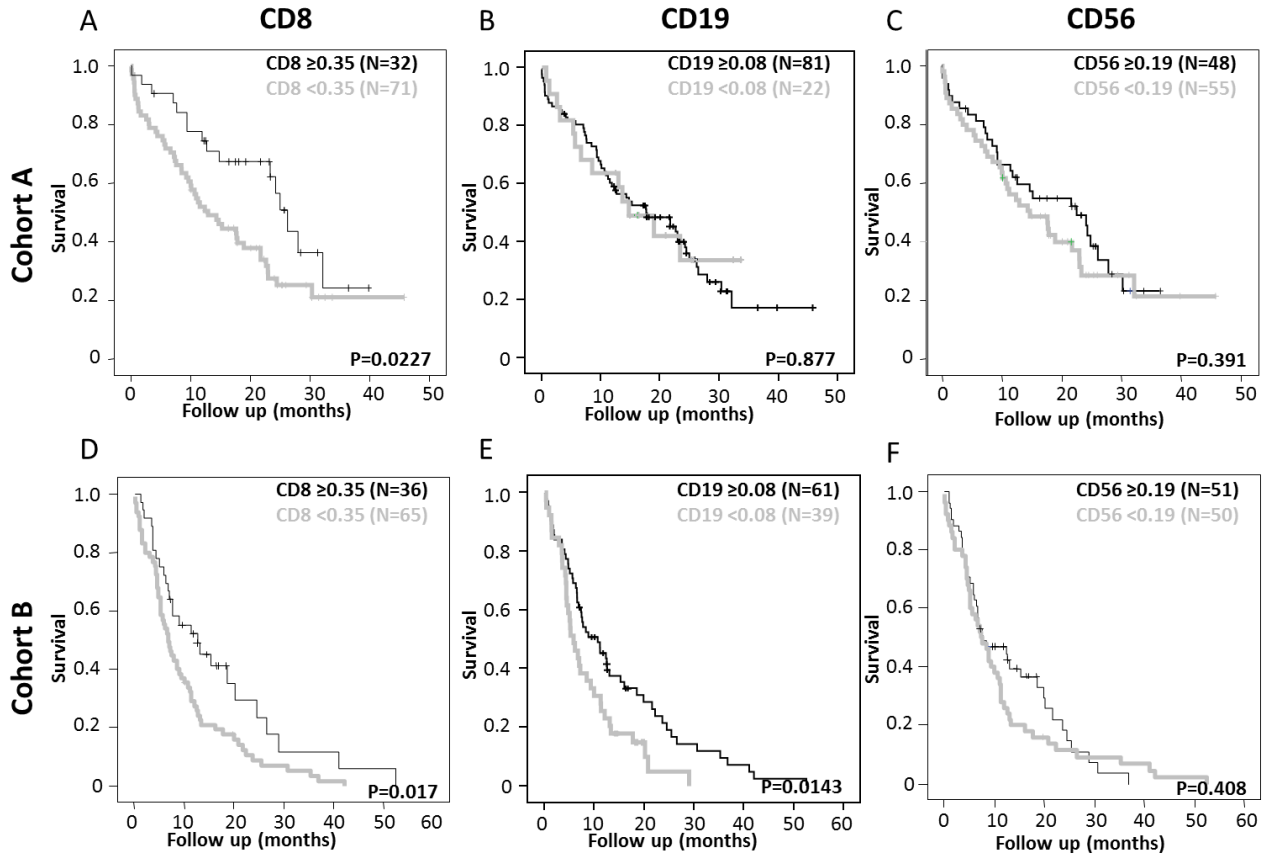


Table 3A: Multivariate analysis on OS on Cohort A

	HR	CI 95%	Significance (p)
menopause (Yes vs No)	1.878	[1.080 - 3.266]	0.026
neutropenia (<7.5 vs ≥7.5) (Giga/L)	4,201	[2,202 - 8]	0.000
CD4+ Lymphopenia (<0.45 vs ≥ 0.45) (Giga/L)	2.632	[1.543 - 4.490]	0.000

Table 3B: Multivariate analysis on OS on Cohort B

	HR	CI 95%	Significance (p)
PS (0/1 vs >1)	1.871	[1.079 - 3.245]	0.026
LDH (<600 vs ≥ 600) (UI/L).	3.330	[1.877 - 5.908]	0.000
CD4+ Lymphopenia (<0.45 vs ≥ 0.45) (Giga/L)	2.137	[1.204 - 3.792]	0.009

Figure 4 : Cytokine impact on OS in cohort A : A) IL-7 impact segregated on 3rd quartile, B) TNFa impact segregated on 3rd quartile and C) CCL22 impact segregated on 1st quartile

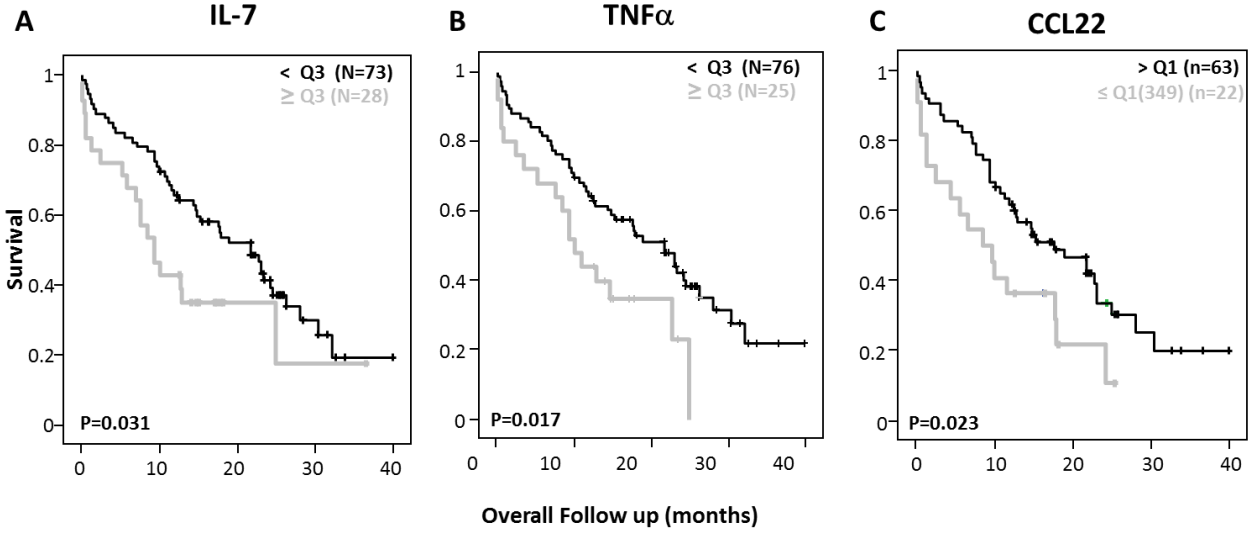


Figure 5 : CCL22 levels according to Lymphopenia and $CD4^+$ lymphopenia in cohort A and cohort B

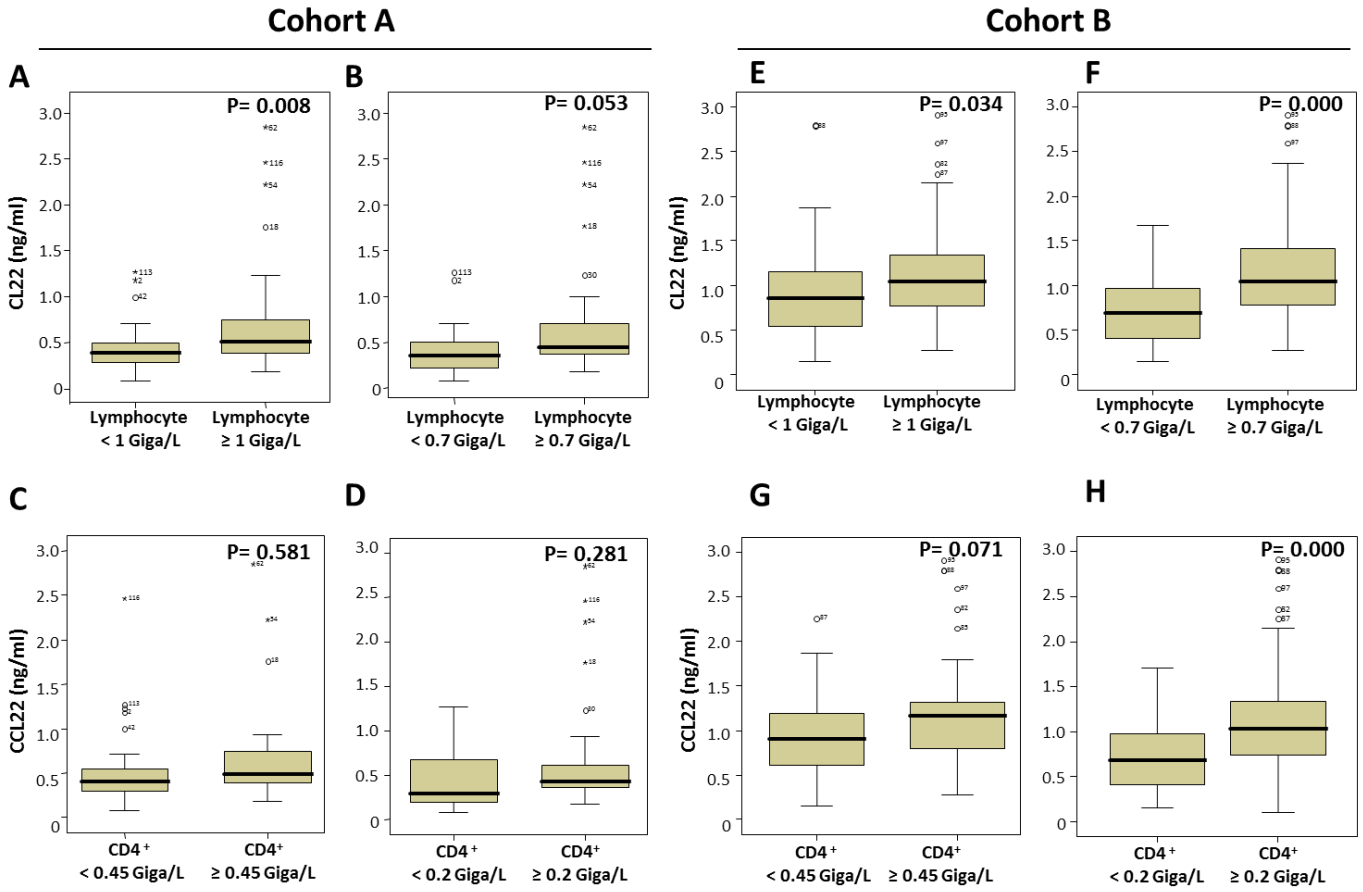
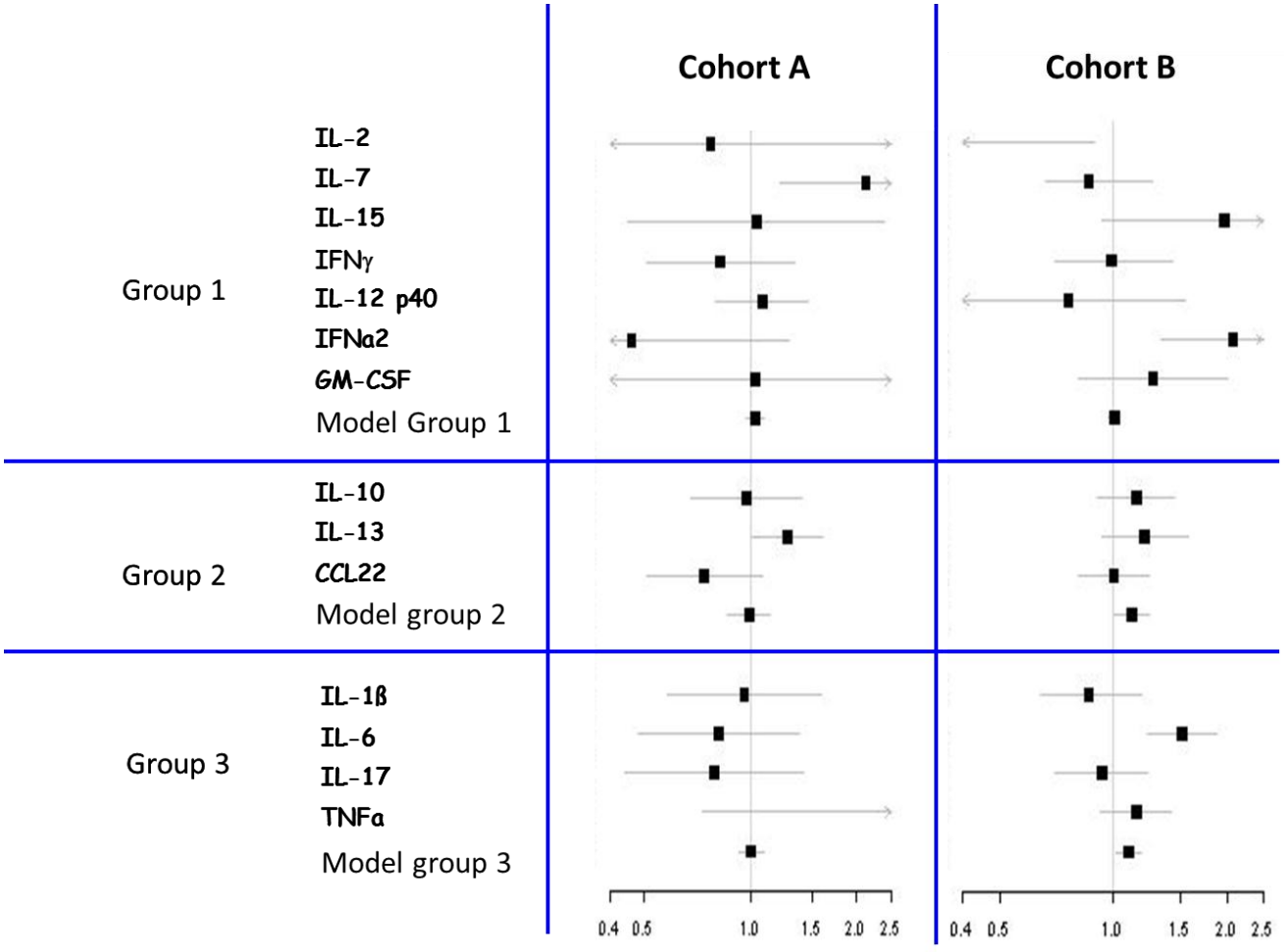


Figure 6 : Impact of Cytokines analysed in pool on OS in cohort A and B *(first draft need to be confirmed)*



SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1 : Comparison of cohort A and B in OS and PFS

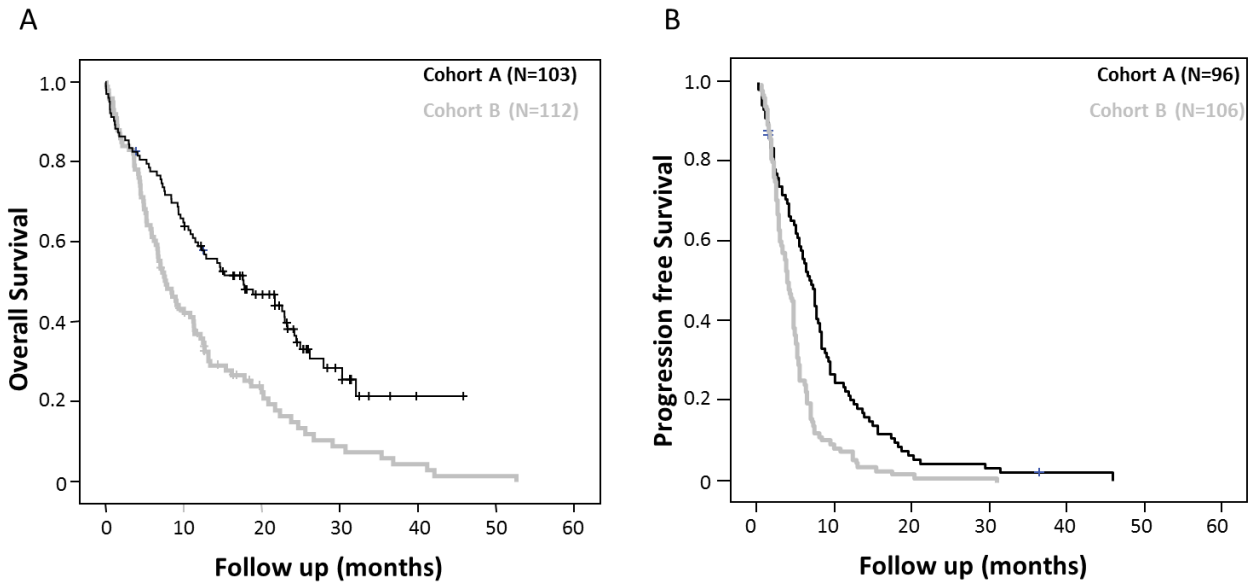


Table S1: Univariate analysis on PFS on cohort A and cohort B

		cohort A				cohort B			
		number	HR	CI (95%)	p value	number	HR	CI (95%)	p value
Age (years)	< 60 (R)	60			0.332	75			0.477
	≥ 60	43	0.809	[0.528 - 1.841]		37	0.860	[0.567 - 1.304]	
Hemoglobin (g/dL)	≥ 11,5 (R)	70			0.184	63			**0.014**
	< 11,5	32	1.367	[0.862 - 2.375]		49	1.641	[1.104-2.439]	
PNN (Giga/L)	≥ 7,5 (R)	14			**0.000**	12			0.417
	< 7,5	88	4,444	[2,380 - 8.264]		64	1.233	[0.744 - 2.043]	
PS	0/1(R)	70			0,403	59			0.245
	> 1	33	1.214	[0.771 - 1.910]		53	1.257	[0,855 - 1.847]	
Liver metastasis	no (R)	54			0.433	43			0.807
	yes	49	1.181	[0.779 - 1.789]		67	0.951	[0.637 - 1.421]	
Bone metastatis	no (R)	34			0.989	61			0.450
	yes	69	1.003	[0.645 - 1.561]		49	0.861	[0.583 - 1.270]	
Number of metastatic sites	1-3 (R)	54			**0.022**	86			0.257
	≥ 4	49	1.664	[1.077 - 2.572]		26	1.299	[0.826 - 2.043]	
Triple negative tumors	no (R)	85			**0.005**	72			0.597
	yes	18	2.170	[1.257 - 3.146]		21	1.145	[0.693 - 1.894]	
LDH (UI/L)	< 600 (R)	62			0.307	51			**0.103**
	≥ 600	12	1.430	[0.720 - 2.842]		42	1.435	[0.929 - 2.216]	
Menopause	no (R)	38			0.302				
	yes	64	1.250	[0.818 - 1.910]					
Lymphopenia (Giga/L)	≥ 1 (R)	59			**0.017**	46			0.171
	< 1	44	1.670	[1.096 - 2.545]		50	1.327	[0.885 - 1.989]	
Severe lymphopenia	≥ 0.7 (R)	80			0.575	66			**0.003**
(Giga/L)	< 07	23	1.157	[0.695 - 1.925]		31	1.943	[1.250 - 3.020]	
$CD4^+$ lymphopenia	≥ 0.45 (R)	49			**0.030**	29			0.183
(Giga/L)	< 0.45	54	1.588	[1.045 - 2.413]		66	1.351	[0.868 - 2.104]	
Severe $CD4^+$ lymphopenia	≥ 0.2 (R)	86			**0.003**	73			**0.041**
(Giga/L)	< 0.2	17	2.435	[1.354 - 4.378]		24	1.636	[1.021 - 2.622]	

Figure S2 : PFS analysis on Cohort A

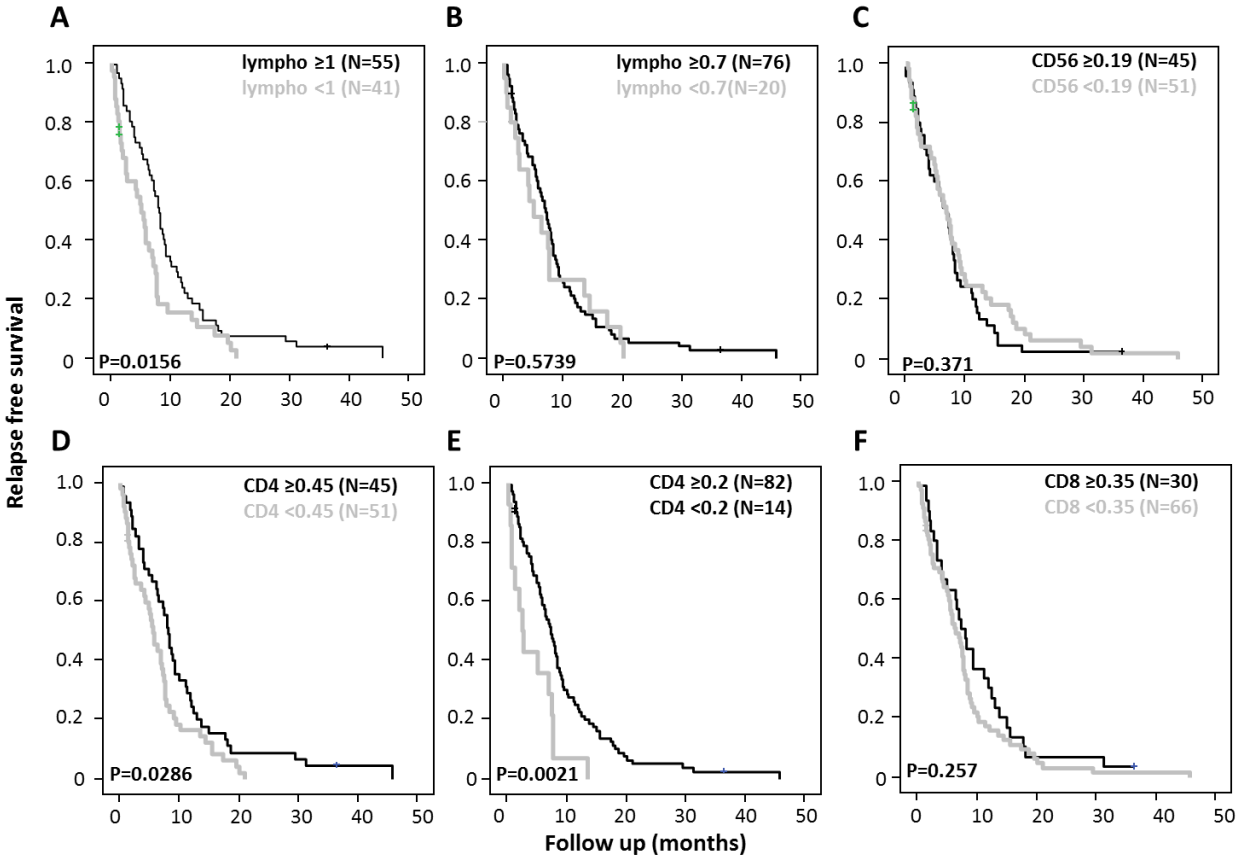


Figure S3 : PFS analysis on Cohort B

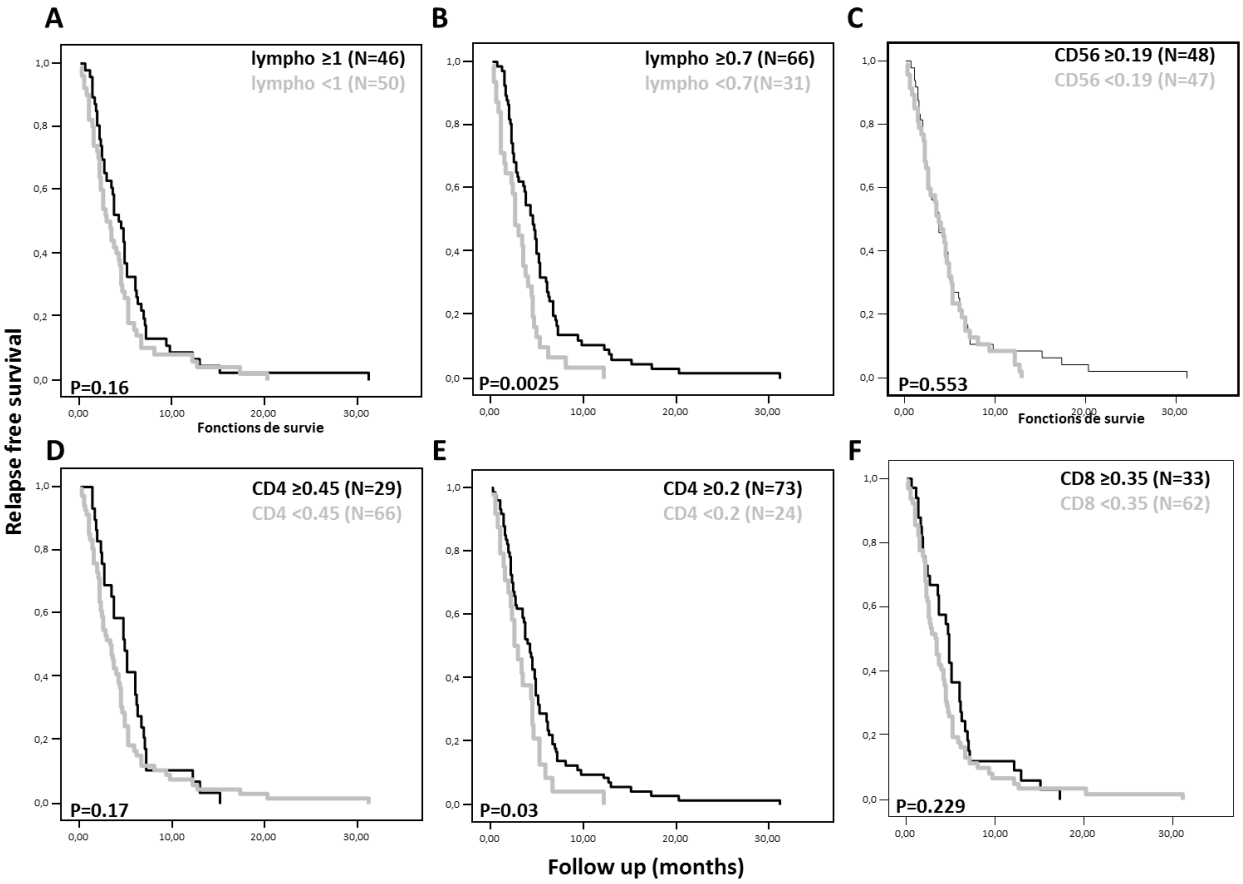


Figure S4 : % of CD45RA^{+} naive CD4+ cells is reduced within lymphopenic patients in Cohort A

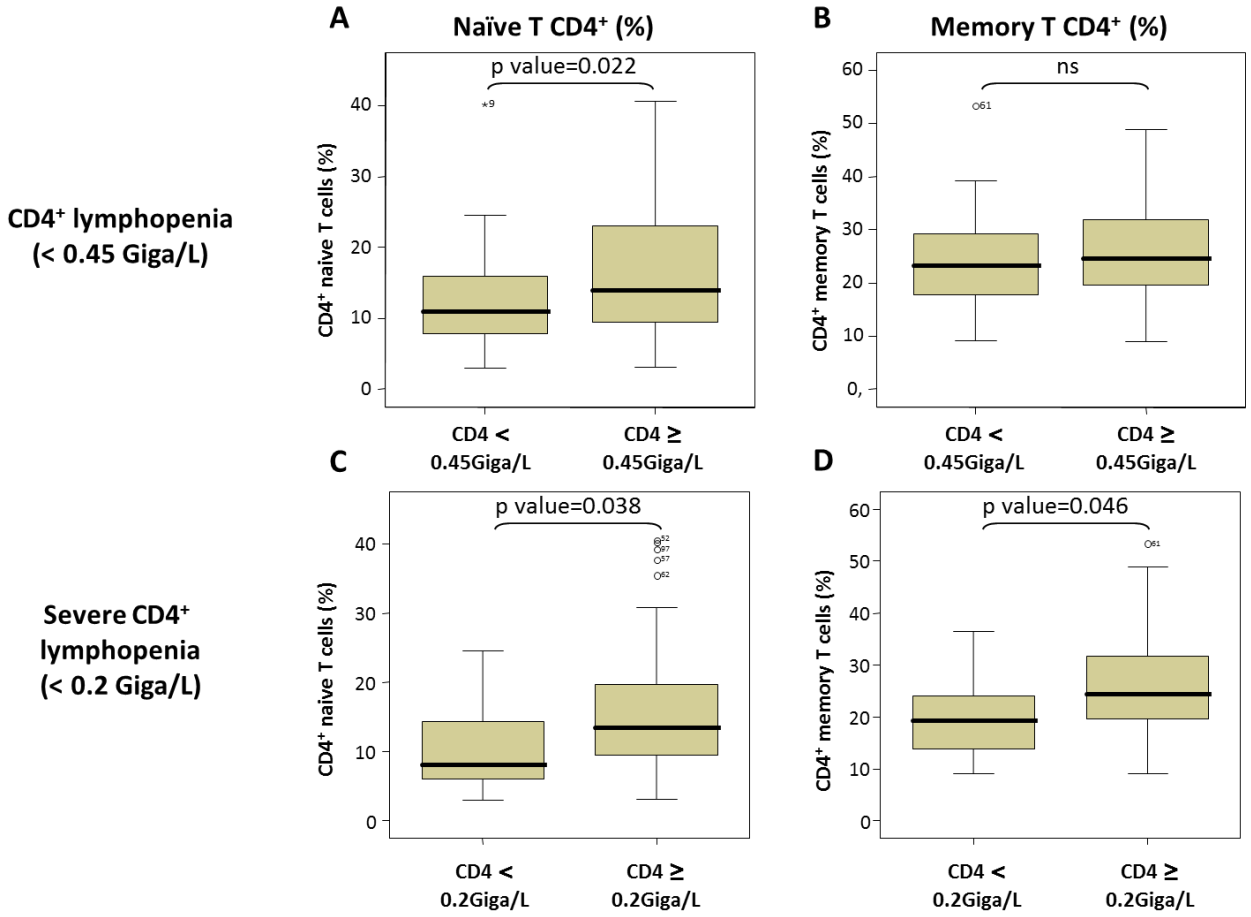


Table S2A : Multivariate analysis on PFS on Cohort A

	HR	CI 95%	Significance (p)
neutropenia (<7.5 vs ≥7.5) (Giga/L)	4,651	[2.487 - 8.069]	0.000
$CD4^+$ Lymphopenia (<0.45 vs ≥0.45) (Giga/L)	2.318	[1.336 - 4.022]	0.003

Table S2B : Multivariate analysis on PFS on Cohort B

	HR	CI 95%	Significance (p)
Hemoglobin (≥ 11.5 vs <11.5) (g/dL)	1.683	[1.062 - 2.666]	0.027

Figure S5 : Comparison of absolute number of the different subpopulations between Cohort A and Cohort B

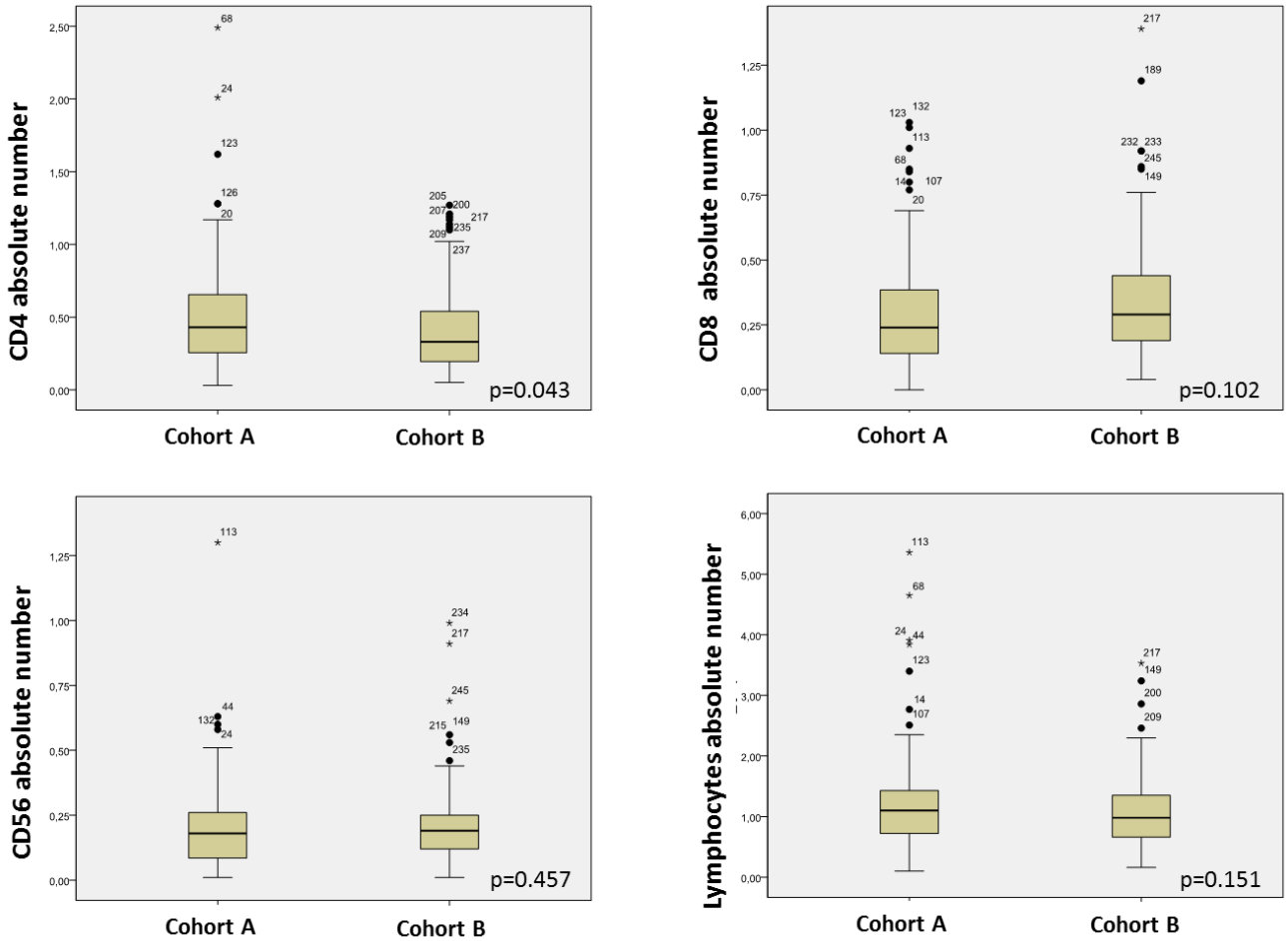


Figure S6 : Comparison of absolute number of the different subpopulations according to the number of lines of chemotherapy at inclusion

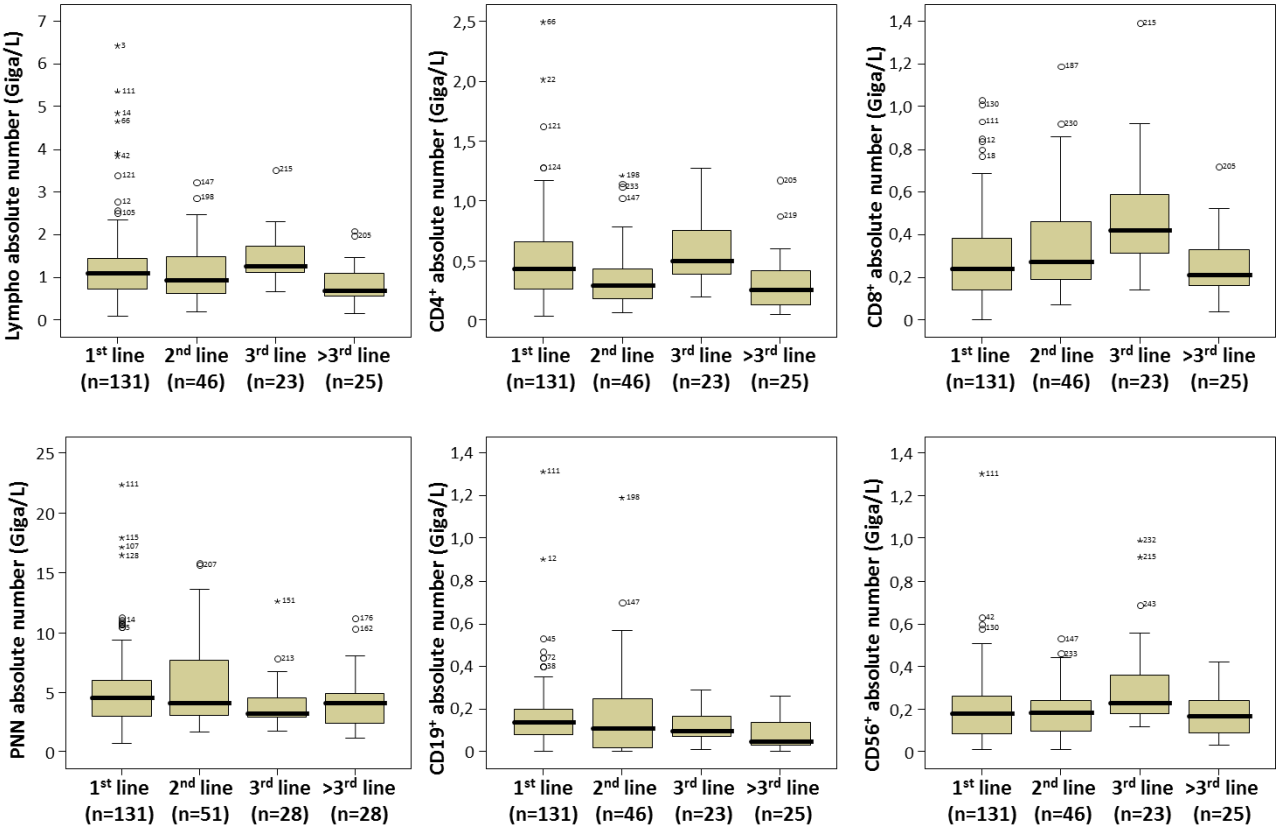
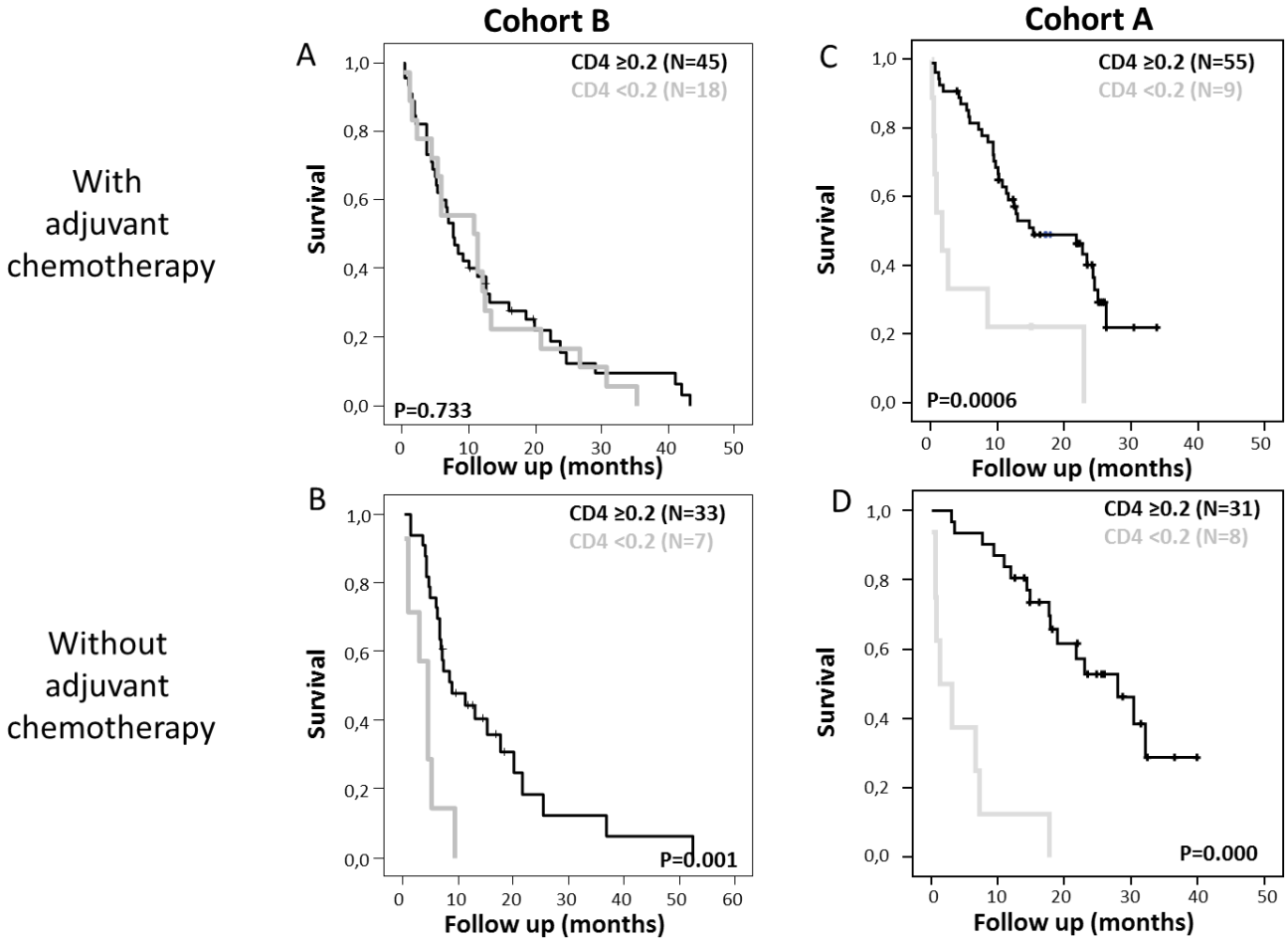


Figure S7 : Impact of severe $CD4^+$ lymphopenia (CD4<0.2 Giga/L) according to an adjuvant chemotherapy treatment on cohort B (A, B) and A (C, D)



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

9. Impact pronostic des différents paramètres immunitaires

9.1. Impact de la lymphopénie dans la survie des patientes en situation métastatique

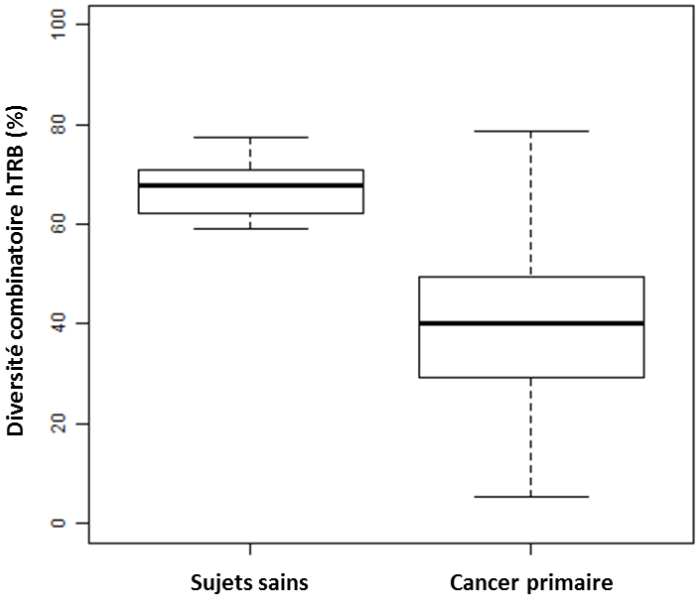
Nous avons mis en évidence la valeur pronostique de la lymphopénie <1 Giga/L sur la SG chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, étendant ainsi les données de l'équipe et de la littérature (Ceze *et al.*, 2011; Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)). La lymphopénie <1Giga/L est un facteur de mauvais pronostique dans la cohorte B de l'**article n°2** et cette valeur pronostique est conservée indépendamment de la ligne de thérapie (**article n°3**). Une classification basée sur une lymphopénie sévère <0.7 Giga/L (Ray-Coquard *et al.*, 2003) est également un facteur de mauvais pronostique sur la SG et vient confirmer les résultats de notre équipe (Ray-Coquard *et al.*, 2003).

9.2. La Diversité : un nouveau niveau d'analyse dans le cancer du sein

Lorsque l'on compare la diversité combinatoire de patientes atteintes de cancer du sein métastatique en première rechute avec des donneurs sains matchés en âge, on observe une grande variabilité de diversité TCR (de 1.09% à 83,7%) avec une moyenne de 44.1% chez les patientes alors que chez les donneurs sains, la diversité est très homogène avec une moyenne de 67.8% (entre 59% et 77.5%) (**Figure 4 article n°2**). Chez les patientes cancéreuses, cette divpénie est associée ou non à une lymphopénie.

Nous avons eu l'opportunité en parallèle d'analyser avant tout traitement la diversité combinatoire TCR de patientes atteintes de cancer du sein localisé opérées entre 2005 et 2008 pour lesquelles un échantillon cellulaire était stocké au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CLB. L'objectif initial de cette étude était de déterminer si la diversité et l'homogénéité des répertoires TCR pouvait être utilisée comme indicateur précoce du risque d'hypersensibilité et de toxicité à un traitement de chimiothérapie adjuvante afin de sélectionner les patientes à risque auxquelles proposer une alternative thérapeutique moins toxique. Nous avons eu la surprise de mettre en évidence même au stade de la tumeur primaire une grande hétérogénéité de diversité combinatoire TCR des LT en périphérie (**Figure D-1**) et ce malgré une numération lymphocytaire normale (**Figure D-2**). Ces résultats suggèrent qu'il existe bien une perturbation du SI adaptatif qui n'est pas observable par la numération cellulaire. Nous n'avons cependant pas réussi à mettre en évidence de relation entre la divpénie, la taille de la tumeur et ou un risque d'épisode toxique.

Figure D-1: distribution de la diversité chez des sujets sains et des patientes atteintes de cancer du sein en phase primaire.



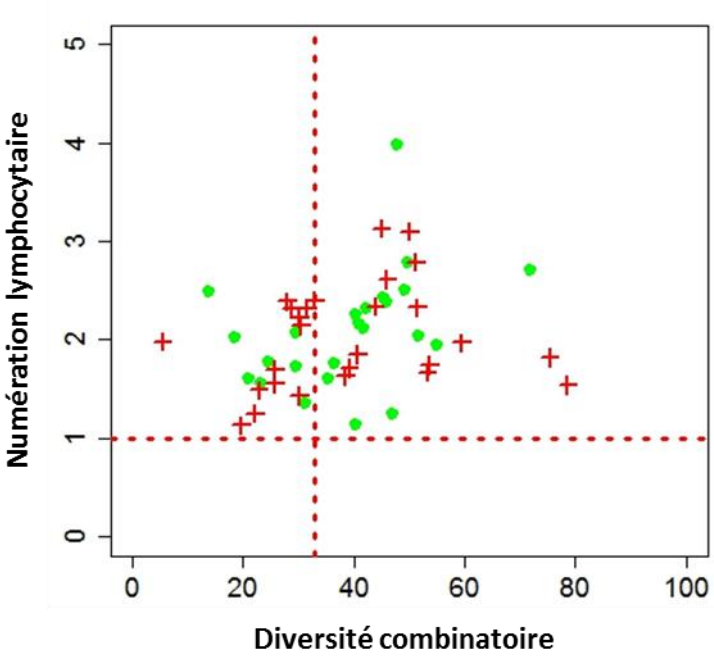
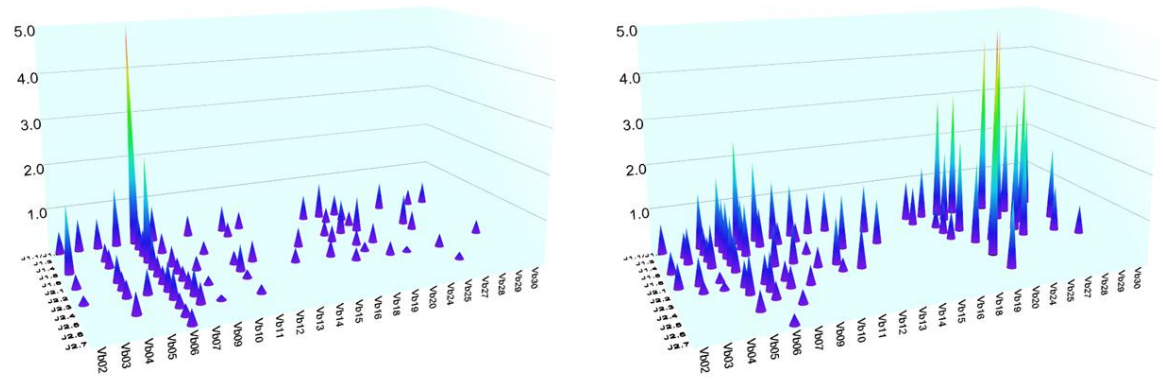


Figure D-2 : Distribution des patientes atteintes d'un cancer du sein primaire sur un graphique NDL. En rouge, les patientes ayant subi un choc toxique ; en vert, les patientes n'ayant pas subi de choc toxique.

Il serait intéressant d'analyser la corrélation entre la présence d'une divpénie et l'intervalle libre avant la rechute métastatique avec comme hypothèse sous-jacente qu'un SI peu diversifié pourrait avoir du mal à enrayer la progression tumorale. Une étude de plus grande envergure serait nécessaire pour éclaircir le rôle de ces perturbations importantes de la diversité du TCR. La démonstration de la valeur pronostique de la divpénie dans le cancer du sein primaire pourrait être évaluée dans une étude rétrospective comparant la diversité TCR avant chirurgie de patientes ayant rechuté avant deux ans et de patientes n'ayant pas rechuté avant 5 ans.

Dans le cancer du sein métastatique, nous avons mis en évidence la valeur pronostique de la diversité combinatoire sur la survie globale (**cohorte A, article n°2**). Les patientes divpéniques présentaient une médiane de survie de 12 mois inférieure à la médiane de survie des patientes non divpéniques. Aucune valeur prédictive n'a pu être établie sur la SSP.
Il est intéressant de noter, que des études récentes dans le cancer colorectal avancé montrent une meilleure homogénéisation de la diversité du TCR observée par immunoscope au niveau systémique chez des patients en rémission suggérant qu'un suivi dynamique du répertoire pourrait avoir une valeur pronostique en clinique (Luo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2010).

Le biomarqueur « divpénie » dans sa première version exprimée en pourcentage n'utilise que la partie « émergée de l'iceberg ». Pour une même diversité, la contribution des réarrangements au sein du répertoire peut être totalement différente (**Figure D-3**). L'utilisation préférentielle d'un réarrangement, ou au contraire sa disparition constituent une information disponible actuellement non exploitée.



<u>Figure D-3</u> : différence de distribution des réarrangements à diversité égale chez deux patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique.

Afin de comparer la distribution des réarrangements entre l'Homme et un modèle murin humanisé, nous avons récemment adapté une approche statistique développée par le Pr Adrien SIX permettant d'intégrer, dans l'interprétation de la diversité combinatoire des TCR, les variations de contribution de chacun des réarrangements (**article n°1**). Cette méthode basée sur le calcul d'un index de perturbation nous a permis d'établir qu'il existe un recouvrement significatif (>40%) entre le répertoire présent chez l'homme et un répertoire murin humanisé avec les progéniteurs $CD34^+$ du même individu démontrant que l'environnement (la souris) ne module que partiellement la diversité combinatoire du TCR. De plus, la forte représentation de certains réarrangements V-J chez l'Homme et les souris humanisées suggère un mécanisme de sélection identique indépendamment du génotype du donneur et de l'historique immunologique du sujet.
Les variations observées au sein des réarrangements pour une même diversité suggère qu'il serait important d'analyser ce nouveau niveau de complexité des différents répertoires dans les cohortes sein métastatiques analysées au niveau NDL (cohorte poolée) (**article n°2**) afin

de mettre en évidence de nouvelles signatures et ainsi affiner la classification en établissant un degré de perturbation du répertoire par rapport à un sujet sain du même âge. Cette nouvelle classification pourrait permettre de reclasser certaines patientes pour lesquelles il n'existait pas de corrélation entre diversité et SG et ainsi améliorer la valeur pronostique et prédictive du bio-marqueur.

9.3. Une lymphopénie de la sous population CD4+ a un impact délétère très important quel que soit le stade d'évolution métastatique

Une lymphopénie $CD4^+$ <0.45Giga/L proche d'un niveau observé chez les patients atteints du VIH, a été identifiée en tant que marqueur pronostique de décès précoce et de toxicité liée à la chimiothérapie dans certaines tumeurs solides dont le cancer du sein métastatique (Borg *et al.*, 2004). En analyse univariée, nous avons mis en évidence que la lymphopénie $CD4^+$ <0.45Giga/L était également un facteur de mauvais pronostique sur la SG chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, quelle que soit le nombre de rechute (**article n°3**). En analyse multivariée, la lymphopénie $CD4^+$ <0.45Giga/L confirme sa valeur pronostique sur la SG indépendamment de la ligne de thérapie, suggérant un rôle majeur de cette sous population lymphocytaire dans la réponse anti-tumorale. De plus, une lymphopénie $CD4^+$ sévère (<0.2 Giga/L) est également un facteur indépendant de mauvais pronostic en première ligne métastatique mais pas dans les phases plus avancées de la maladie. D'autre part, une lymphopénie $CD8^+$ <0.35Giga/L est également de mauvais pronostique quelle que soit la ligne de thérapie, mais cette valeur pronostique n'est pas conservée dans un modèle multivarié.

9.4. Le NDL un nouveau paramètre composite permettant d'appréhender de façon plus large les perturbations du SI en périphérie

Le NDL est un facteur pronostic indépendant en analyse multivariée permettant la caractérisation d'une sous-population de patientes à fort risque de décès

Les deux paramètres « quantités de lymphocytes » et « % de diversité TCR » étant en interaction, mais l'un apportant un élément supplémentaire à l'autre, nous avons construit le score NDL qui est un score composite des deux précédents. Ce score NDL permet d'identifier précisément les patientes immuno-supprimées à haut risque. En effet, le score NDL 1 qui identifie les patientes cumulant une faible numération lymphocytaire et une faible diversité combinatoire du TCR apparait comme un bio-marqueur indépendant de mauvais pronostic pour la survie globale des patientes dans **l'article n°2,** ce qui souligne l'impact négatif d'une immunodéficience aiguë en périphérie. Ce sous-groupe de patientes avec un score NDL1 est particulièrement à risque de mort prématurée sans doute du fait de leur non réponse aux traitements de chimiothérapie standards. Cette population serait celle pouvant bénéficier de traitements innovants utilisant des thérapies favorisant la stimulation du SI (immunothérapie, voir § 3.2.4).

Impact des différents scores NDL

Comme nous avons pu le voir dans **l'article n°2**, si le score NDL1 a un impact délétère pour la survie des patientes par rapport aux autres NDL (NDL>1), lorsque l'on étudie la SG associée à chaque sous population de NDL on observe que les groupes de patientes avec un score NDL 3 (divpénie sans lymphopénie) et un score NDL 4 ont des courbes de survie quasiment superposables alors que la courbe score NDL 2 (lymphopénie sans divpénie), au moins au cours de 11 premiers mois de suivi, est proche de celle du score NDL 1 puis se détache très significativement indiquant une différence de survie en fonction du niveau de diversité chez les patients lymphopéniques (**Figure D-4**). Ceci suggère que la lymphopénie seule serait plus discriminante que la divpénie seule. Mais ces résultats restent préliminaires sur une petite cohorte et nécessitent une confirmation qui sera possible lors de l'analyse de la cohorte prospective de 95 patientes atteintes de cancer du Sein en première rechute métastatique actuellement en fin de recrutement dans l'étude clinique LYMPHOS1 (Projet PoC du CLARA, NCT01306188).

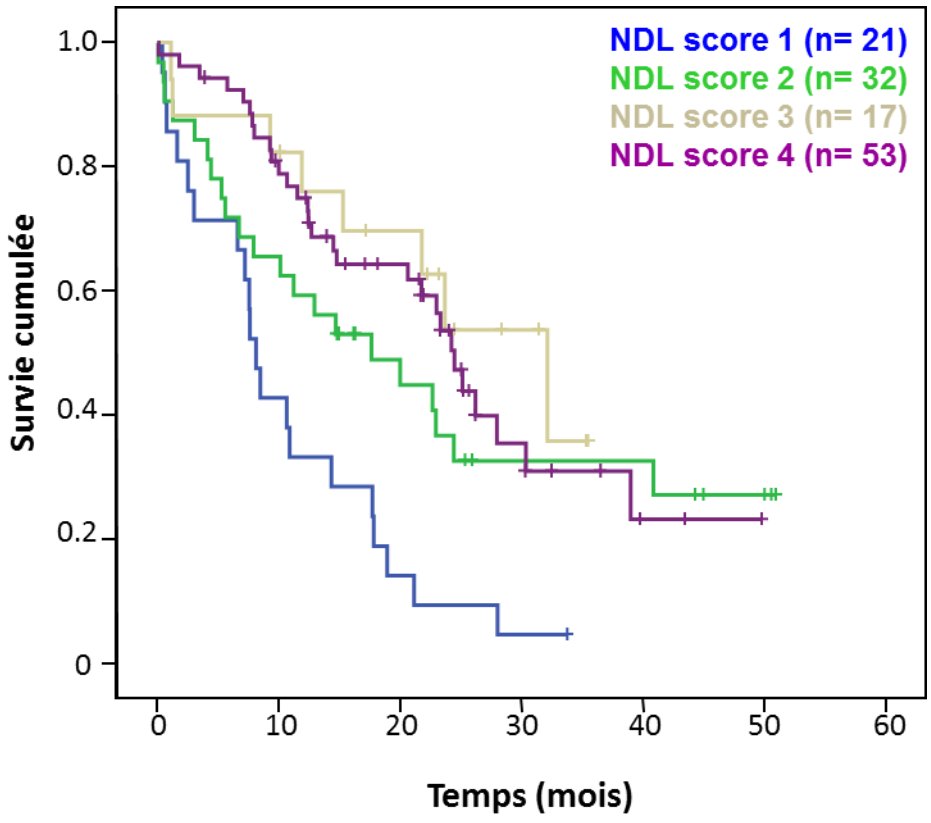
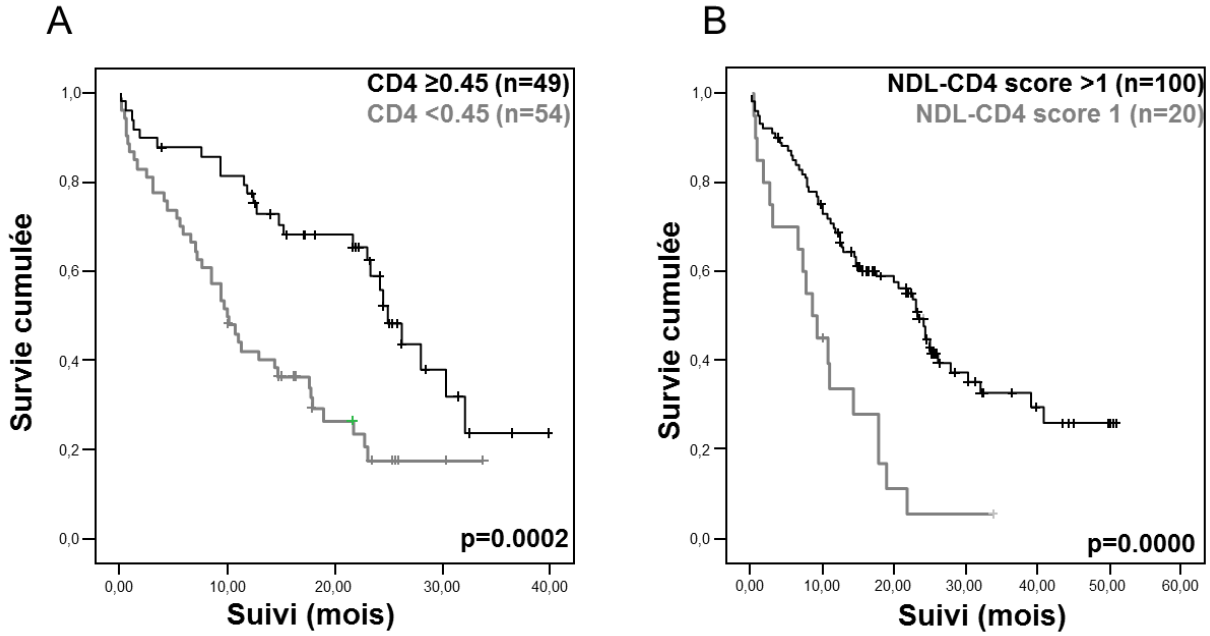


Figure D-4 : Survie globale en fonction du score NDL.

Impact du NDL-CD4

Le score NDL peut être créé en utilisant des données de sous populations T. Nous avons profité des données de l'**article n°2** dans lequel pour la cohorte A (1ère rechute) nous avions les données de lymphocytes $CD4^+$ et les données de diversité pour créer le score NDL-CD4 et analyser son impact sur la SG et SSP des patientes. Comme le montre la **Figure D-5**, le NDL CD4 score 1 (**B**) comme la lymphopénie CD4 (**A**), sur la cohorte « poolée » permettent de caractériser une sous population de patientes à risque accru de décéder de leur pathologie (**A, B**). Néanmoins, lorsque l'on met ces deux paramètres dans un modèle multivarié, la lymphopénie $CD4^+$ efface le NDL-CD4. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces données ont été obtenues sur cohorte restreinte et ces résultats nécessitent d'être confirmés dans le cadre de l'étude prospective citée ci-dessus.



<u>Figure D-5</u> : survie globale en fonction de la lymphopénie $CD4^+$ <0.45 Giga/l (A) ou du score NDL $CD4^+$ (B)

9.5. Importance de la combinaison des extrêmes pour mieux sélectionner les patientes à risque et Importance de la notion de forte diversité comparable aux donneurs sains

Nous avons tiré profit de la cohorte poolée en première rechute métastatique (**article n°2**) pour analyser plus en avant le devenir des patientes ayant une lymphopénie et/ou une divpénie sévères (Figure D-6). Il est intéressant de noter que parmi les patientes ayant une diversité très faible (≤ 20%, 12% des patientes (n = 15/125)), 60% sont mortes avant 12 mois (log rank p-value = 0,003) (**Figure D-6A**). Les patientes fortement lymphopéniques (<0,7 Giga/L, 21,37% (n = 28/131)) ont également un risque accru de décès avec une augmentation du taux de mortalité de 50% (14/28 sont morts avant 12 mois (log rank p-value = valeur 0,0097) (**Figure D-6B**). Ceci contraste fortement le devenir des patientes sans lymphopénie sévère, ni divpénie pour lesquelles le taux de décès avant 12 mois est de 32%.

La réunion de ces deux groupes soit diversité ≤ 20% soit lymphopénie <0.7 Giga/L (n=36) distingue une sous-population à sur-risque (50% de décès avant 12 mois vs 32% dans la contrepartie (log rank p-value = valeur 0,0016) (**Figure D-6C**). Par ailleurs, si l'on combine les patientes atteintes de divpénie sévère ou de lymphopénie et celles ayant un Score NDL de 1, on obtient encore une meilleure stratification des patientes à risque (survie médiane = 9,25 mois *vs* 24,43 mois, respectivement, la valeur log rank p-value = 0,0001) (**Figure D6-D**).

A l'opposé, un résultat remarquable nous indique que les patientes avec une diversité TCR proche des valeurs des donneurs sains (16,8%) (> 65%, n = 21/125) sont particulièrement protégés indépendamment de leur numération puisque seulement 4,76% décèdent avant 12 mois (**Figure D-7**).

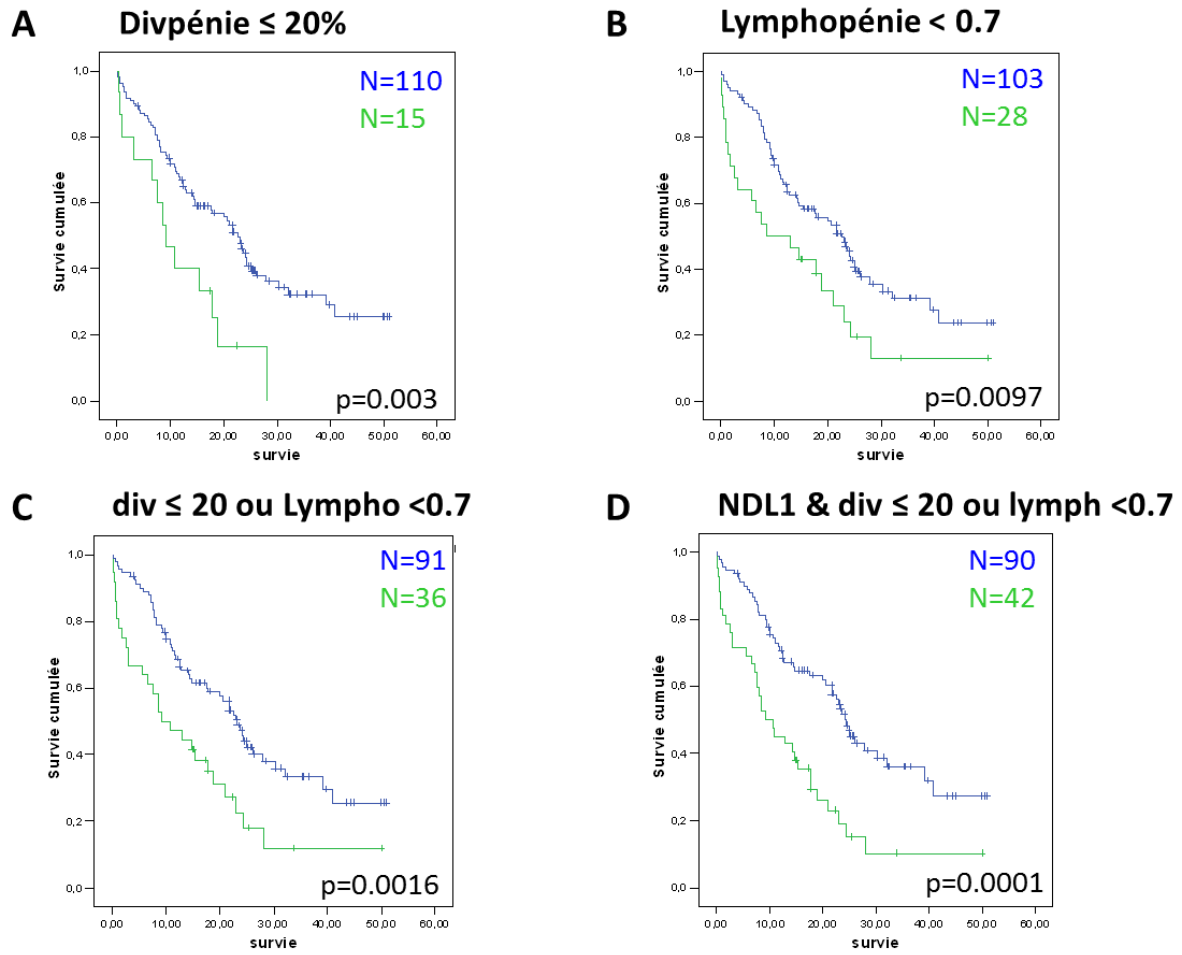


Figure D-6 : Courbe de survie en fonction A) d'une divpénie sévère (≤20%) ; B) d'une lymphopénie sévère (<0.7 Giga/L) ; C) de la combinaison de la divpénie (≤20%) ou de la lymphopénie (<0.7 Giga/L) sévère ; D) de la combinaison du NDL1 et d'une divpénie (≤20%) ou de la lymphopénie (<0.7 Giga/L) sévère.

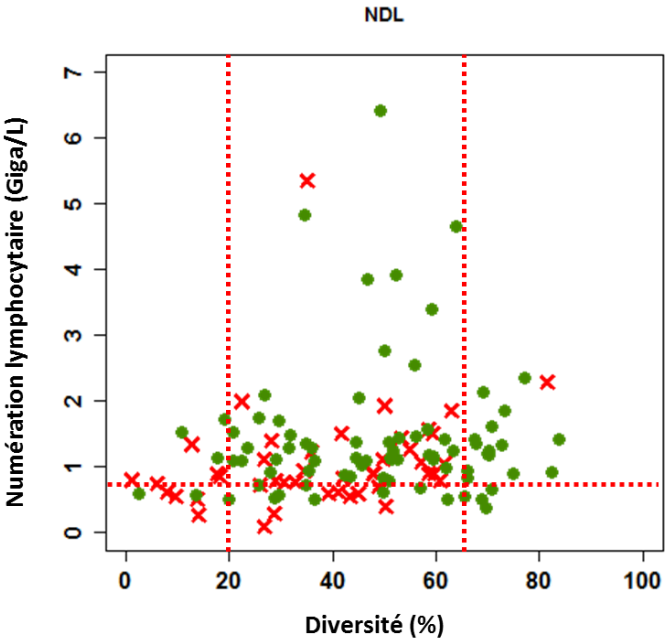


Figure D-7 : Représentation NDL avec deux seuils de diversité à 20% et 65% et un seuil de lymphopénie sévère à 0.7 Giga/L). Les points verts indiquent les patientes en vie à 12 mois, les croix rouges indiquent les patientes décédées à 12 mois.

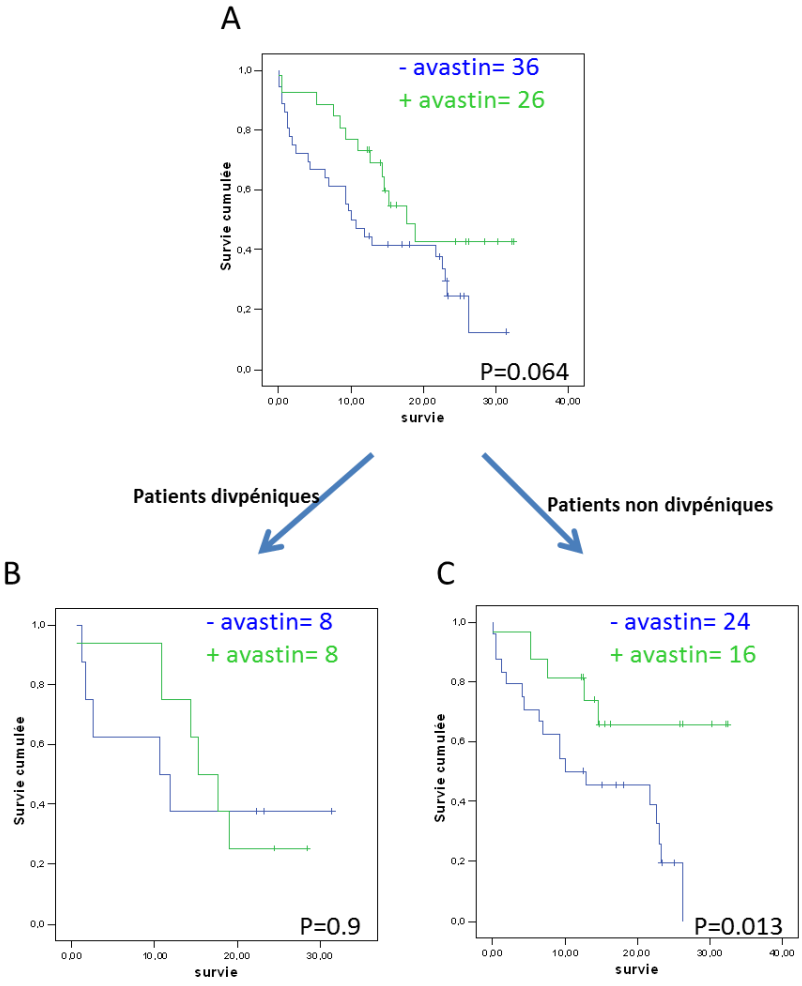
10. Validation de nouvelles stratégies thérapeutiques : Exemple d'importance de diversité <33% dans la mise en évidence de patientes qui ne bénéficient pas du traitement avec un inhibiteur de l'angiogénèse (Avastin)

L'adaptation thérapeutique et l'innovation sont les principaux intérêts de l'analyse de la diversité TCR et/ou du bio-marqueur NDL. Etudier les perturbations du SI pourrait permettre de proposer un traitement personnalisé qui limiterait les effets secondaires toxiques et améliorerait l'espérance de vie.

Dans ce contexte, le bevacizumab (Avastin®), AcM humanisé qui inhibe le VEGF-A **(**vascular endothelial growth factor A) et donc l'angiogénèse, est cliniquement approuvé, en association avec une chimiothérapie dans le traitement des patientes atteintes de cancer du sein métastatique.

Toutefois, en raison d'un trop faible rapport bénéfice/risque**,** la FDA et l'organisme Santé Canada ont décidé en Novembre 2011 de retirer l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) du bevacizumab dans l'indication du cancer du sein métastatique. Il y a donc un besoin urgent d'identifier de nouveaux bio-marqueurs permettant la sélection des patientes qui pourraient bénéficier du traitement.

Dans la cohorte B étudiée dans **l'article n°2** 38,8% (26/67) des patientes recrutées ont été traitées avec une combinaison de chimiothérapie et de bevacizumab. Les résultats préliminaires obtenus montrent l'absence d'impact du bevacizumab sur la SG sur l'ensemble de la cohorte (**Figure D-8A**).



<u>Figure D-8</u> : survie globale des patientes de la cohorte B atteintes de cancer du sein métastatique en fonction du traitement avastin (A). Identification du bénéfice de la thérapie avastin chez les patientes de cette cohorte divpéniques (B) ou non divpéniques (C).

Par contre, si l'on analyse l'efficacité du traitement en fonction de la diversité on observe des résultats très différents. En effet, les patientes divpéniques ne bénéficient de ce traitement ciblé (p = 0,9) (**Figure D-8B**) alors que chez les patientes non divpéniques, celles qui ont reçu le bevacizumab (n = 16/40) ont une espérance de vie très supérieure (survie médiane = non atteinte) par rapport aux autres (n = 24/40) (médiane de survie globale = 10,1 mois, p = 0,013) (avec 5 /16 décès (31%) dans la chimiothérapie + Avastin vs 18/24 (75%) dans la chimiothérapie seule) (**Figure D-8C**). Dans ce cas de figure, la diversité combinatoire permettrait donc d'identifier une sous population qui bénéficierait d'un traitement incluant le bevacizumab. Ce nouveau bio-marqueur prédictif pourrait permettre d'éviter de traiter des patientes qui ne répondent pas, et de mieux sélectionner les patientes pour évaluer l'efficacité clinique de nouveaux candidats médicaments.

11. Origine des déficiences en lymphocytes ou en diversité

La question qui se pose est de savoir si le développement de la tumeur est une conséquence de la lymphopénie ou si inversement c'est la lymphopénie qui résulte de la progression de la tumeur.

A l'heure actuelle, il est difficile d'évaluer le rôle de la chimiothérapie adjuvante sur le statut lymphopénique lors de la rechute et une étude des intervalles libres est nécessaire pour éclaircir ce point. La mise en évidence d'une lymphopénie (< 1 Giga/L) chez 44 % des patientes en première ligne métastatique non prétraitées (**article n°2**) suggère un impact minime d'une exposition préalable à des agents de chimiothérapie comme cause de cette lymphopénie. Il est par ailleurs intéressant d'observer que cette lymphopénie est retrouvée chez 51% des patientes ayant subi plusieurs lignes de traitements par chimiothérapie et ne semble pas strictement dépendante du nombre de lignes ou de la toxicité des chimiothérapies (**article n°3**).

Elle pourrait être associée à la tumeur (localisation des métastases ou la masse tumorale) ou encore aux caractéristiques propres à l'hôte comme l'âge de la patiente ou l'existence de polymorphismes sur des gènes importants pour l'homéostasie lymphocytaire.

Altérations dues à l'hôte :

- **L'âge**

Les données obtenues sur chacune des cohortes de **l'article n°2** excluent l'âge des patientes comme étant la cause de la lymphopénie puisque le nombre absolu de lymphocytes totaux ne corrèle pas avec l'âge analysé en variable dichotomique (<60 ans *vs* >60 ans). Néanmoins, l'analyse sur la cohorte poolée en utilisant l'âge en variable continue montre que la lymphopénie globale est plus marquée chez les patientes les plus âgées ce qui est cohérent avec la notion d'immuno-sénescence ou de « syndrome de la personne âgée » qui associe l'âge à une réduction du nombre absolu de lymphocytes circulants et une augmentation de la proportion de Treg circulants (pour revue (Gravekamp, 2011)). Néanmoins, nous n'avons pas observé de différence significative dans les proportions de Treg ($CD4^+CD25^{high}$) circulants parmi les LT $CD4^+$ entre patientes lymphopéniques et non lymphopéniques ou en fonction de

l'âge des patientes sur la cohorte poolée suggérant l'absence d'influence directe des Treg dans ce processus de lymphopénie.

- **L'état général de la patiente**

Ces altérations du nombre absolu de lymphocytes et de la diversité pourraient refléter un état général des patientes qui peut être visualisé cliniquement par le niveau du PS. L'analyse de la cohorte « poolée » (**article n°2**) montre que la réduction de diversité n'est pas significativement associée à une altération du PS (Performance Status) (p=0.09) même si la fréquence de patientes très divpéniques (<20%) est plus importante parmi des patientes ayant un PS>1 (22% vs 7%). Par contre, la lymphopénie globale et plus particulièrement la lymphopénie $CD4^+$ sont fortement corrélées à un PS >1 ($p<10^{-4}$) **(article n°2 et article n°3**) chez les patientes en première rechute, cette corrélation devient beaucoup moins importante chez les patientes en situation avancée (**article n°3**) pour la lymphopénie globale (p=0.035) voire même non significative pour la lymphopénie $CD4^+$ (p= 0.121).
La lymphopénie observée pourrait également résulter d'une stimulation chronique des LT périphériques favorisée par les cellules tumorales conduisant à leur déplétion par mort cellulaire induite par l'activation (AICD) (Agrawal *et al.*, 1998). La constriction de la diversité combinatoire que nous observons chez les patientes les plus à risque présente des similarités par rapport au phénomène d'épuisement des LT du SI que l'on peut rencontrer en cas d'infection chronique (HIV, HCV, HBV).

-**L'existence de polymorphismes**

Les perturbations du SI pourraient également avoir pour origine l'existence de polymorphisme sur certains gènes impliqués dans la prolifération des LT (ex : IL-2, IL-2Rβ) ou encore des gènes impliqués dans l'inhibition des voies d'apoptose (ex : TRAIL, Bim, TNFα) comme cela a pu être mis en évidence dans le VIH (Haas *et al.*, 2006).

Altérations dues à la tumeur :

- **La masse tumorale**

La quantification de la masse tumorale lors de la 1ère rechute reste difficile à évaluer du fait de l'absence de localisation unique. Contrairement aux phases plus avancées de la pathologie (> 2nde rechute) ou les patientes ont des suivis réguliers, les patientes en 1ère rechute ne viennent consulter que suite à des signes alarmants suggérant l'existence d'un masse tumorale importante. Nous n'avons pas observé néanmoins de corrélation entre le nombre de sites métastatiques (témoin imparfait de la charge tumorale) ou la localisation des métastases (gravité de la pathologie) et la lymphopénie globale ou la lymphopénie $CD4^+$ (<0.45 Giga/L) (**article n°2 et article n°3**) suggérant que cette dernière n'est pas directement responsable de la lymphopénie.

- **L'impact du mécanisme d'AICD**

L'épuisement des LT est caractérisé par un dysfonctionnement suivi d'une élimination physique de LT spécifiques d'un Ag donné lors d'une exposition prolongée à cet Ag dans le cas d'une infection chronique à laquelle pourrait s'apparenter le cancer. Ce mécanisme pourrait être en partie à l'origine de la lymphopénie qui serait donc une conséquence de la progression tumorale. Lors d'une infection chronique, cet épuisement des LT $CD8^+$ se caractérise par une perte de fonctions de manière progressive et hiérarchique (Fuller et Zajac, 2003; Virgin *et al.*, 2009; Wherry et Ahmed, 2004; Wherry *et al.*, 2003). Les premières fonctions touchées sont la production d'IL-2 et de la capacité d'expansion, puis la capacité de production de TNF. Dans certains cas, les LT $CD8^+$ peuvent perdre leurs fonctions cytotoxiques (sécrétion d'IFN-γ, dégranulation). Le stade final est la délétion des cellules spécifiques de l'Ag (Moskophidis *et al.*, 1993; Wherry *et al.*, 2003; Zajac *et al.*, 1998).
Après une infection aigue, une des propriétés clé des LT $CD8^+$ mémoires générés, est leur capacité à persister sans stimulation antigénique grâce à l'effet homéostatique des cytokines IL-7 et IL-15. Des études chez la souris ont montré qu'au cours d'une infection chronique, les LT $CD8^+$ spécifiques sont incapables de persister car ils n'expriment que faiblement CD122 (chaine β des récepteurs à l'IL-2 et IL-15) et CD127 (chaine α du récepteur à l'IL-7) (Shin et Wherry, 2007) et deviennent dépendants de leur Ag et du signal induit par l'interaction TCR-Ag pour se maintenir à long terme (Shin *et al.*, 2007). Tout comme les LT $CD8^+$, les LT $CD4^+$ spécifique de l'Ag perdent également leur fonction effectrice au cours de l'infection (Brooks *et al.*, 2005; Kaufmann *et al.*, 2007; Oxenius *et al.*, 1998; Urbani *et al.*, 2006) même si les dysfonctionnements de cette sous population sont beaucoup moins caractérisés.

Ce mécanisme d'épuisement pourrait conduire à la disparition des LT spécifiques issus de l'expansion clonale, et ainsi participer à l'apparition de trous dans la diversité du TCR. En accord avec cette hypothèse, une partie des patientes lymphopéniques présentent également une altération de la diversité de leurs TCR (NDL score 1) (**article n°2**). Ce mécanisme à lui seul n'est cependant pas suffisant pour expliquer la baisse de la diversité globale observée aboutissant à une divpénie sévère.

- **L'immuno-suppression**

Au moins trois mécanismes immunitaire complémentaires peuvent être à l'origine de l'épuisement des LT : les récepteurs de surface inhibiteurs (tel que PD-1), les facteurs solubles tel que l'IL-10, et les cellules immuno-régulatrices (Treg). L'expression des ligands de PD-1, PD-L1 and PD-L2, a été observée sur une grande variété de pathologies tumorales. Une forte corrélation entre l'expression du ligand de PD-1 à la surface des cellules tumorales et un mauvais pronostic a été rapporté dans le cancer de l'ovaire (Hamanishi *et al.*, 2007), le mélanome (Hino *et al.*, 2010), les cancers urothéliaux (Nakanishi *et al.*, 2007), le cancer du pancréas (Nomi *et al.*, 2007), le cancer de l'œsophage (Ohigashi *et al.*, 2005), du rein (Thompson *et al.*, 2004), du sein (Ghebeh *et al.*, 2006) et les carcinomes gastriques (Wu *et al.*, 2006). Un niveau d'expression élevé de PD-1 est observé dans les TIL (Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Fourcade *et al.*, 2009; Mumprecht *et al.*, 2009), et le blocage par PD-1 de cellules de sang périphérique augmente la fréquence de cellules productrices de cytokines de type Th1 *in-vitro* (Fourcade *et al.*, 2009).

Chacune de ces hypothèses n'est, bien évidemment, pas exclusive et les mécanismes de la lymphopénie et de la divpénie sont probablement multifactoriels. Chaque facteur est une cible potentielle pour reconstituer une réponse immunitaire efficace et comme nous le verrons plus tard certaines stratégies thérapeutiques pourraient permettre de réverser les deux pans de cette altération du SI périphérique (voir paragraphe stratégies thérapeutiques).

12. Comment prendre en compte le score NDL pour adapter le traitement de cette population à risque ?

12.1. L'adaptation thérapeutique

Si la lymphopénie peut représenter un marqueur de santé globale des patients comme le suggère une étude chez la souris dans laquelle une sous population de LT $CD4^+$ jouerait un rôle de protection contre la cachexie (Wang *et al.*, 2008; Zhao et Davies, 2010), il devrait être possible d'adapter la stratégie thérapeutique de manière précoce sur la base du score NDL. En effet, lors de la survenue d'événements toxiques graves (ex : infections, diarrhées, neutropénie) lors du traitement de chimiothérapie en situation métastatique, le médecin a le choix entre procéder à une réduction de la posologie, ou prescrire un facteur de croissance des PNN (G-CSF) associée à une antibiothérapie afin de maintenir la dose de chimiothérapie. L'étude du statut immunitaire de la patiente et l'identification des patientes score NDL 1 lui permettrait d'anticiper la survenue de ces événements toxiques graves et ainsi de prescrire un traitement prophylactique permettant la poursuite du protocole thérapeutique sans réduction de dose ni report de cure favorisant ainsi les chances de succès de la thérapie.

Les différents types de chimiothérapies utilisées en routine clinique en cancérologie ont des toxicités connues et variées. Au cours de l'étude clinique en première ligne métastatique (**article n°2**), au sein de la cohorte A (n=66), 29 patientes ont été traitée par paclitaxel (Taxol) et 26 par docetaxel (Taxotere). Ces molécules appartiennent toutes les deux à la famille des taxanes, mais le taxotere présente une meilleur efficacité couplée à une toxicité plus élevée (Radaideh et Sledge, 2008). Afin de définir s'il était possible d'identifier le bénéfice de l'une ou l'autre thérapie sur la base du statut NDL nous avons analysé l'impact de ces deux chimiothérapies sur la survie globale en fonction du score NDL 1 vs score NDL>1. Les données préliminaires sur un nombre restreint de patientes (Figure D-9) montrent que les patientes NDL1 traitées par docetaxel décèdent plus vite que les patientes traitées par paclitaxel alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les deux traitements chez les patientes ayant un score NDL > 1. Ceci suggère que les patientes NDL1 plus fragiles vont moins bien résister à un traitement agressif de chimiothérapie et que la connaissance de ce statut NDL1 pourrait permettre de modifier le protocole thérapeutique au profit d'une chimiothérapie plus douce (Xeloda ou paclitaxel).

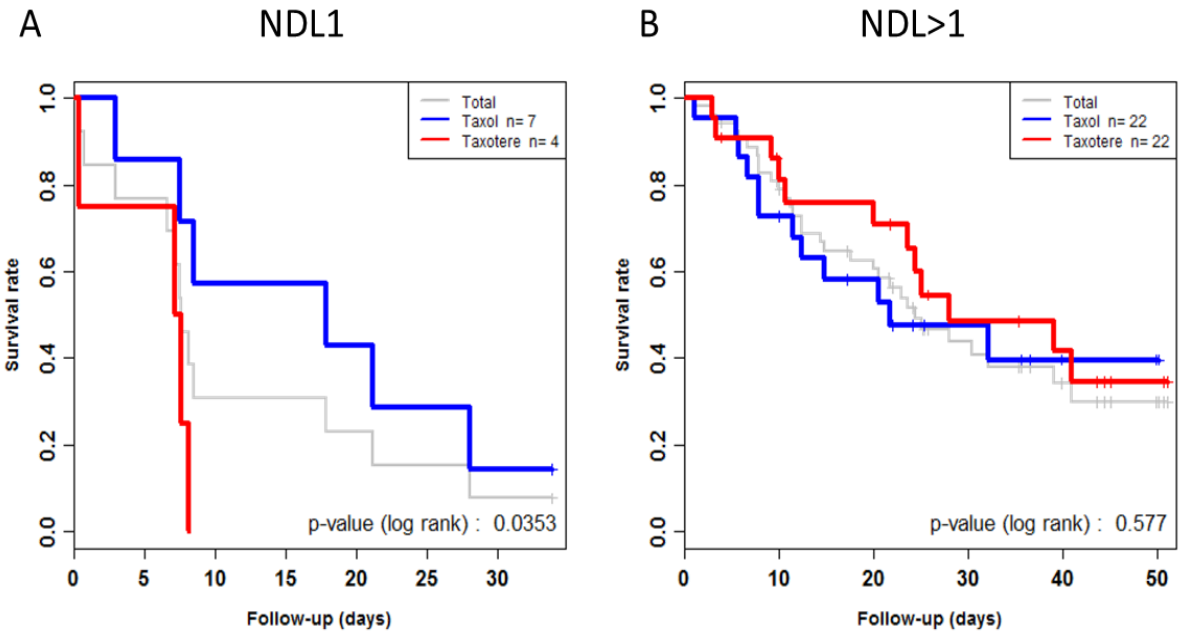


Figure D-9 : Survie des patientes de la cohorte A atteintes d'un cancer du sein métastatique en fonction du traitement Taxol ou Taxotère chez les patientes NDL1 (A) ou NDL>1 (B).

Deux approches thérapeutiques peuvent être envisagées suite à l'identification d'une perturbation du SI :

12.2. L'immuno-reconstitution

Suite à l'identification d'une lympho-divpénie, l'approche thérapeutique la plus rationnelle consiste à favoriser la prolifération des LT. Plusieurs essais ont utilisé l'IL-2 (Lissoni *et al.*, 2005; Schwartzentruber *et al.*, 2011) pour tenter de reconstituer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace mais malgré des résultats encourageants, cette stratégie de par sa toxicité forte et sa propension à favoriser la prolifération des Treg (Wei *et al.*, 2007) ne semble pas adaptée.

Par contre, de nombreuses preuves issues d'essais cliniques (>200 patients recrutés) conduits par la société Cytheris, qui développe l'Interleukine 7 humaine recombinante en clinique sous le nom d'IL7/CYT107, indiquent l'effet lymphopoïétique de l'IL-7, qui augmente à la fois les LT $CD4^+$ et les LT $CD8^+$. Les LT $CD4^+$ générés en présence d'IL-7 sont des T conventionnels présentant une fonction « helper » dans la mesure où l'IL-7 possède une capacité limitée à faire proliférer les Treg qui n'expriment pas le récepteur à l'IL-7 (Jaleco *et al.*, 2003; Melchionda *et al.*, 2005). Elle offre donc une opportunité unique de favoriser la mise en place d'une réponse immune anti tumorale efficace au détriment de la réponse inhibitrice médiée par les Treg. Des données issues d'essais cliniques chez les patients VIH non répondeurs traités pendant plusieurs années par thérapie HAART mais dont le taux de $CD4^+$ était resté <0.25 Giga/l, ont montré qu'un cycle de 3 semaines d'IL-7 suffit pour augmenter leur numération de LT $CD4^+$ au-dessus du seuil critique de 0.5 Giga/L et de maintenir cette numération au moins un an après ce premier cycle de traitement (Levy *et al.*, 2009). Un tel

effet a également été observé chez des patients atteints de tumeurs solides avancées présentant une lymphopénie (<1Giga/l), ou le nombre absolu de lymphocytes augmente fortement quelques semaines après la cure d'IL-7 (Sportes *et al.*, 2010).

Par ailleurs, dans une étude récente chez des patients infectés par VIH, le traitement par IL-7 induit une forte augmentation de la diversité combinatoire du TCR (article en préparation, collaboration Cytheris). L'augmentation de diversité est favorisée chez les patients présentant une divpénie sévère, alors qu'elle est moins prononcée chez les patients présentant une divpénie modérée. Ces résultats ont participé à démontrer l'apport qualitatif de l'IL7/CYT107 sur la reconstitution d'un large répertoire lymphocytaire.

Au vu de ces différentes données de la littérature, l'IL-7 apparait donc comme un candidat prometteur pour contrebalancer à la fois la lymphopénie et la divpénie identifiés comme facteur de risque dans le cancer du sein métastatique. Une étude clinique prospective de Phase IIa (ELYPSE 7,NCT01368107) qui a pour objectif principal de valider la capacité de l'IL-7 (CYT-107) à restaurer la lymphopénie et à reconstituer un répertoire TCR diversifié avant ou pendant le traitement de chimiothérapie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique en seconde rechute et présentant une lymphopénie globale est actuellement en cours en collaboration entre les structures cliniques du CLB, l'IGR et de l'institut Curie et les sociétés ImmunID et Cytheris.

12.3. Les thérapies ciblant les molécules immunosuppressives/ modulatrices

L'inhibition de la voie CTLA-4 est également une piste étudiée en cancérologie. La fonction inhibitrice de la réponse immunitaire de ce récepteur le désigne comme une cible de choix pour une thérapie ciblée. L'ipilimumab, AcM humanisé dirigé contre CTLA-4 est utilisé dans le traitement du mélanome. La liaison de l'ipilimumab au récepteur bloque l'activité du CTLA-4, améliorant l'activité immunitaire en prolongeant l'activation des LT dirigés contre la tumeur. Deux études cliniques récentes ont démontré une amélioration de la survie globale chez une partie des patients (environ 15%) ayant bénéficié du traitement dans une stratégie vaccinale (Hodi *et al.*, 2010) ou couplé à une chimiothérapie (Robert *et al.*, 2011), mais surtout une rémission complète de certains patients atteints de cette maladie jusqu'alors incurable. Néanmoins de plus en plus d'études indiquent que l'anti-CTLA-4 augmente également le nombre de Treg qui expriment eux aussi CTLA-4. La réponse clinique pourrait donc dépendre d'un fragile équilibre entre stimulation des Treg et stimulation des LT effecteurs.

Nous avons abordé plus haut rapidement les différentes voies d'inhibition du SI exploitées par la tumeur qui pourraient conduire à une lympho-divpénie. Ces voies d'inhibition représentent autant de cibles potentielles. PD-1 est exprimé par les LT infiltrant les tumeurs, un traitement par anti-PD-1 constituerait aussi une stratégie toute indiquée pour réactiver la réponse anti tumorale. A l'heure actuelle, deux AcM humanisés anti-PD-1 (ONO-4538/MDX-1106 et CT011) sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques pour le traitement du cancer et des infections HCV. Un essai de phase I avec ONO-4538/MDX-1106 a été réalisé sur 39 patients souffrant de cancer du poumon non à petites cellules, de cancer du rein, de cancer

colorectal, de mélanome ou de cancer de la prostate) (Brahmer *et al.*). Une réponse complète a été observée chez un patient atteint d'un cancer colorectal et deux réponses partielles ont été retrouvées chez des patients atteints d'un cancer du rein et d'un mélanome. Lors d'un essai de phase I à dose unique, une rémission complète et des bénéfices cliniques ont été observés chez 1/3 des patients (n=17) (Berger *et al.*, 2008).

Des observations récentes ont révélé que d'autre facteurs inhibiteurs que PD-1 comme LAG-3 (gène 3 d'activation des lymphocytes) (Blackburn *et al.*, 2009), TIM-3 (Ig mucin 3 des cellules T) (Fourcade *et al.*, 2010; Golden-Mason *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2010; Sakuishi *et al.*, 2010), ainsi que d'autres, étaient co-exprimés sur les LT « épuisés » au cours d'une infection chronique ou au cours de la progression tumorale. Une partie des TILs co-exprimant PD-1 et TIM-3 présentent une phénotype épuisé dans un modèle de tumeur chez la souris (Sakuishi *et al.*, 2010) et chez des patients souffrant de mélanome avancé (Fourcade *et al.*, 2010). De plus, un ciblage combiné des voies de signalisation PD-1 et TIM-3 s'avère plus efficace pour contrôler la croissance tumorale que le ciblage d'une seule de ces voies (Sakuishi *et al.*, 2010). Cette approche renforce l'hypothèse que de nombreux récepteurs inhibiteurs coopèrent et contribuent de manière indépendante à l'épuisement des LT pendant la croissance tumorale, suggérant que l'épuisement des LT est un phénomène réversible qui pourrait être contré par un ciblage thérapeutique simultané des nombreuses voies de signalisation des récepteurs inhibiteurs.
Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les patients répondeurs seraient ceux dont les LT effecteurs auraient le plus bénéficié de la stimulation, et ceux disposant d'une diversité immunitaire suffisante, disponible avant le traitement. De ce fait, nous pouvons suggérer que de par leur nombre limité de LT spécifique de la tumeur, les patients lympho-divpéniques (score NDL 1) répondraient moins bien au traitement alors que les patients présentant une bonne diversité de TCR et une bonne numération lymphocytaire seraient de meilleurs répondeurs.

Le NDL constitue donc un élément d'évaluation important pour la validation de ces stratégies thérapeutiques sur des populations homogènes de patientes ayant le maximum de chances de répondre (score NDL 4).

13. Utilisation des paramètres immunitaires dans les pratiques cliniques

13.1. Eléments immunitaires analysés en clinique : absence de corrélation entre taux de PNN et taux de lymphocytes

Nous avons eu un aperçu tout au long de ce manuscrit des interactions complexes entre la tumeur et le SI, notamment l'immunité adaptative. Pourtant, aujourd'hui encore, l'utilisation du SI dans la prise en charge d'un patient atteint de cancer se limite à la mesure du taux de PNN et à la prescription d'antibiotiques et de G-CSF pour prévenir le risque de neutropénie et d'infection.

Nos résultats indiquent un très faible recouvrement entre les patientes lymphopéniques et neutropéniques (2.25%), et entre les patientes divpéniques et neutropéniques (1.5%) dans le cancer du sein métastatique (Figure D-10) suggérant l'indépendance de ces bio-marqueurs de l'immunité innée et adaptative. D'autre part nous observons que les patientes neutropéniques représentent seulement 2,5% de la cohorte alors que les patientes lympho-divpéniques représentent environ 15% de la population, indiquant que ce biomarqueur permettrait d'aider à orienter le traitement d'une part significative des patientes atteints du cancer du sein en phase métastatique.

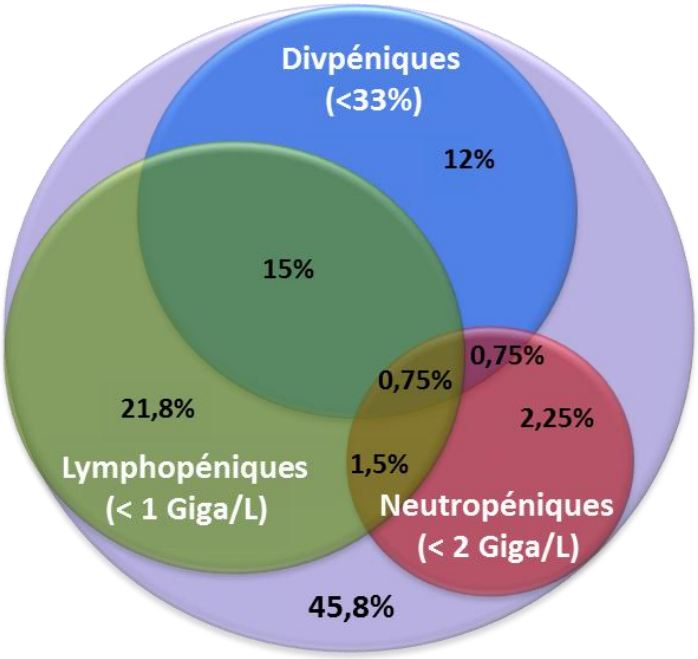


*Figure D-10 : recouvrement entre neutropénie, lymphopénie et divpénie chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique (**article n°2**).*

Le SI adaptatif n'est toujours pas utilisé malgré la démonstration de sa valeur pronostique en périphérie dans plusieurs types de tumeurs solides (Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)). Nous pensons que ces nouveaux résultats venant consolider la valeur prédictive de l'efficacité d'un traitement apportent un argument supplémentaire à l'utilisation de ce biomarqueur lors du suivi thérapeutique des patientes.

Ces aspects du SI pourraient jouer un rôle complémentaire dans la protection des patientes, reflétant leur capacité à répondre à une chimiothérapie cytotoxique tout en préservant leurs capacités de défense contre les pathogènes. Le médecin devrait pouvoir tirer profit de ces informations pour adapter sa stratégie thérapeutique. Ceci est d'autant plus vrai qu'un panel de thérapies ciblant l'immunité adaptative est en cours d'investigation avec des résultats plus qu'encourageants.

13.2. Etude médico économique

Notre étude **(article n°2)** a permis de caractériser un facteur pronostique permettant l'identification d'un sous-groupe de patientes à la fois lymphopéniques et divpéniques (score NDL 1) à risque de décès précoce. Il reste nécessaire de définir comment exploiter ce nouveau bio-marqueur pour améliorer la prise en charge des patientes.

La lymphopénie globale mais aussi la lymphopénie $CD4^+$ sont identifiées comme des facteurs pronostiques de la survie globale dans le cancer du Sein en situation métastatique précoce (**article n°2 et n°3**) ou plus avancée (**article n°3**) mais aussi dans différentes pathologies tumorales solides (sarcome, NHL, colon) depuis plusieurs années (Blay *et al.*, 1996; Ceze *et al.*, 2011; Ray-Coquard *et al.*, 2009(a)), et n'est pourtant toujours pas prise en compte dans les pratiques cliniques lors de la prise en charge des patientes, et ce, malgré l'accessibilité du bio-marqueur en routine.

Pourquoi ne pas tirer profit de ces marqueurs pronostiques forts ?

D'une part, aujourd'hui le praticien n'a pas de stratégie thérapeutique spécifique pour traiter ces altérations du statut immunitaire car les causes réelles de ces altérations ne sont pas strictement démontrées. D'autre part, si l'on positionne la lymphopénie et la divpénie comme des marqueurs généralistes, ils sont en compétition avec des facteurs pronostics existants largement utilisés en routine clinique comme le PS. Les résultats de **l'article n°2** ont démontré que le score NDL est indépendant du PS et qu'il apporte donc une information supplémentaire et non redondante qui justifierait son utilisation.

Le coût de réalisation score NDL est-il justifié par le bénéfice que peut en attendre la patiente ?

Ce bénéfice peut être mesuré par une étude médico-économique sur la base de données cliniques observationnelles, puis dans un 2^e temps interventionnelles. Dans cette optique, il nous faut être capable d'orienter la stratégie thérapeutique en fonction de la stratification des patientes sur la base du score NDL et prouver le bénéfice de cette adaptation thérapeutique. Ce bénéfice peut être mesuré sur la base d'une amélioration de l'espérance de vie, de la qualité de vie, en diminution du risque infectieux, en diminution du nombre de jours d'hospitalisation et donc d'une manière générale en économie de cout de santé.

Dans notre cas, deux stratégies peuvent être envisagées pour justifier l'utilisation du score NDL :

- L'utilisation du test en tant que compagnon diagnostique

Le score NDL permet de mettre en évidence une perturbation de la population lymphocytaire T qui se caractérise par une diminution de la quantité absolue de LT ainsi que par une diminution de la diversité de leur TCR. Le score NDL pourrait permettre d'identifier les patientes qui bénéficieront d'un traitement par l'IL-7 qui comme nous l'avons montré plus haut permet de rétablir à la fois le nombre et la diversité des lymphocytes à un niveau proche des sujets sains. Il pourrait aussi être utilisé pour les traitements par anti CTLA-4 ou anti PD1.

- L'utilisation du test en tant que marqueur généraliste de l'état de santé de la patiente.

Dans ce cas de figure le test ne permettrait pas d'identifier spécifiquement une cible thérapeutique mais plutôt de mettre en évidence un dysfonctionnement global dangereux pour la patiente. La stratégie thérapeutique pourrait alors consister à proposer un suivi clinique plus rapproché des patientes à risque, ou privilégier des chimiothérapies moins cytotoxiques chez les patientes lympho-divpéniques. L'aspect « immuno-déficience » mise en évidence par notre test pourrait orienter le traitement vers une antibiothérapie prophylactique « large spectre » permettant de limiter le risque de surinfection pendant la phase critique des cycles de traitements.

De plus, afin que le test soit recommandé par les autorités de santé dans les « guide lines » de prise en charge des patientes, il faut i) que sa réalisation permette soit une augmentation de la durée de vie des patientes, soit une économique de santé en évitant le surtraitement des patientes pour lesquelles ce traitement pourrait être trop toxique afin d'améliorer leur qualité de vie. C'est dans ce contexte que la société ImmunID et le CLB travaillent à la construction d'études interventionnelles permettant d'évaluer l'adaptation thérapeutique la plus efficace pour permettre aux patientes lymphodivpéniques de bénéficier de la meilleure prise en charge. Cette étape est un pré-requis pour que la lymphodivpénie devienne un outil utilisé par les cliniciens.

14. Conclusion générale

Nos études cliniques ont permis de confirmer l'état de l'art sur la lymphopénie dans les cancers solides en phase métastatique et nous avons mis en évidence un nouveau bio-marqueur dont l'utilisation en routine clinique pourrait permettre aux médecins d'adapter la stratégie thérapeutique. Dans le cancer du sein primaire, des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer l'hétérogénéité de la diversité combinatoire alors que dans le cancer du sein métastatique, la lympho-divpénie est un marqueur de mauvais pronostic de la SG. Ce bio-marqueur offre l'opportunité de proposer à la patiente un panel d'adaptations thérapeutiques innovantes ciblant ou non le système immunitaire.

Alors qu'une étude clinique est en cours pour valider la valeur pronostique de la lympho-divpénie, nous mettons en place une étude interventionnelle dans laquelle le score NDL oriente la stratégie thérapeutique : les patientes lympho-divpéniques reçoivent un traitement à base d'IL-7 dont l'objectif est de reconstituer le système immunitaire avant ou pendant la chimiothérapie.

Finalement, des études sont en cours pour affiner l'exploitation du bio-marqueur et l'interprétation des résultats de diversité combinatoire et permettre une meilleur interprétation des perturbations de la diversité et donc une meilleure ségrégation des patients à risque.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Adotevi O., Pere H., Ravel P., *et al.* (2010), A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. *J Immunother,* **33**, 9, pp. 991-8.

Agrawal S., Marquet J., Delfau-Larue M. H., *et al.* (1998), CD3 hyporesponsiveness and in vitro apoptosis are features of T cells from both malignant and nonmalignant secondary lymphoid organs. *J Clin Invest,* **102**, 9, pp. 1715-23.

Ahmadzadeh M., Johnson L. A., Heemskerk B., *et al.* (2009), Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood,* **114**, 8, pp. 1537-44.

Alexandre J., Rey E., Girre V., *et al.* (2007), Relationship between cytochrome 3A activity, inflammatory status and the risk of docetaxel-induced febrile neutropenia: a prospective study. *Ann Oncol,* **18**, 1, pp. 168-72.

Allemand H. (2008), Baisse de l'incidence des cancers du sein en 2005 et 2006 en France : un phénomène paradoxal. *Bull du cancer,* **vol 95**, n°1, pp.

Alves N. L., Hooibrink B., Arosa F. A., *et al.* (2003), IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood,* **102**, 7, pp. 2541-6.

Anderson D. M., Kumaki S., Ahdieh M., *et al.* (1995), Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem,* **270**, 50, pp. 29862-9.

Andersson A., Srivastava M. K., Harris-White M., *et al.* (2011), Role of CXCR3 ligands in IL-7/IL-7R{alpha}-Fc-mediated antitumor activity in lung cancer. *Clin Cancer Res,* **17**, 11, pp. 3660-72.

Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., *et al.* (2007), Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med,* **13**, 9, pp. 1050-9.

Arstila T. P., Casrouge A., Baron V., *et al.* (1999), A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science,* **286**, 5441, pp. 958-61.

Aude-Garcia C., Attinger A., Housset D., *et al.* (2000), Pairing of Vbeta6 with certain Valpha2 family members prevents T cell deletion by Mtv-7 superantigen. *Mol Immunol,* **37**, 16, pp. 1005-12.

Bachelot T., Gomez F., Biron P., *et al.* (2002), A phase I/II study of 4 monthly courses of high-dose cyclophosphamide and thiotepa for metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer,* **87**, 10, pp. 1079-85.

Badoual C., Hans S., Fridman W. H., *et al.* (2009), Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer. *J Clin Oncol,* **27**, 19, pp. e5-6; author reply e7.

Badoual C., Hans S., Rodriguez J., *et al.* (2006), Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res,* **12**, 2, pp. 465-72.

Balachandran V. P., Cavnar M. J., Zeng S., *et al.* (2011), Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med,* **17**, 9, pp. 1094-100.

Balkwill F., Charles K. A., Mantovani A. (2005), Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell,* **7**, 3, pp. 211-7.

Basak G. W., Zapala L., Wysocki P. J., *et al.* (2008), Interleukin 15 augments antitumor activity of cytokine gene-modified melanoma cell vaccines in a murine model. *Oncol Rep,* **19**, 5, pp. 1173-9.

Bates G. J., Fox S. B., Han C., *et al.* (2006), Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol,* **24**, 34, pp. 5373-80.

Belot A., Grosclaude P., Bossard N., *et al.* (2008), Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique,* **56**, 3, pp. 159-75.

Ben Ahmed M., Belhadj Hmida N., Moes N., *et al.* (2009), IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol,* **182**, 11, pp. 6763-70.

Berard M., Brandt K., Bulfone-Paus S., *et al.* (2003), IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol,* **170**, 10, pp. 5018-26.

Berger C., Berger M., Hackman R. C., *et al.* (2009), Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood,* **114**, 12, pp. 2417-26.

Berger R., Rotem-Yehudar R., Slama G., *et al.* (2008), Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res,* **14**, 10, pp. 3044-51.

Beslija S., Bonneterre J., Burstein H., *et al.* (2007), Second consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol,* **18**, 2, pp. 215-25.

Beslija S., Bonneterre J., Burstein H. J., *et al.* (2009), Third consensus on medical treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol,* **20**, 11, pp. 1771-85.

Birkeland S. A., Storm H. H., Lamm L. U., *et al.* (1995), Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer,* **60**, 2, pp. 183-9.

Blackburn S. D., Shin H., Haining W. N., *et al.* (2009), Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol,* **10**, 1, pp. 29-37.

Blay J. Y., Chauvin F., Le Cesne A., *et al.* (1996), Early lymphopenia after cytotoxic chemotherapy as a risk factor for febrile neutropenia. *J Clin Oncol,* **14**, 2, pp. 636-43.

Blay J. Y., Le Cesne A., Mermet C., *et al.* (1998), A risk model for thrombocytopenia requiring platelet transfusion after cytotoxic chemotherapy. *Blood,* **92**, 2, pp. 405-10.

Bogue M., Gilfillan S., Benoist C., *et al.* (1992), Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **89**, 22, pp. 11011-5.

Borg C., Ray-Coquard I., Philip I., *et al.* (2004), CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. *Cancer,* **101**, 11, pp. 2675-80.

Boshoff C., Weiss R. (2002), AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer,* **2**, 5, pp. 373-82.

Brahmer J. R., Drake C. G., Wollner I., *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol,* **28**, 19, pp. 3167-75.

Brahmer J. R., Drake C. G., Wollner I., *et al.* (2010), Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol,* **28**, 19, pp. 3167-75.

Brien J. D., Uhrlaub J. L., Hirsch A., *et al.* (2009), Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. *J Exp Med,* **206**, 12, pp. 2735-45.

Brooks D. G., Teyton L., Oldstone M. B., *et al.* (2005), Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol,* **79**, 16, pp. 10514-27.

Bulanova E., Budagian V., Pohl T., *et al.* (2001), The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J Immunol,* **167**, 11, pp. 6292-302.

Cardoso F., Bedard P. L., Winer E. P., *et al.* (2009), International guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy. *J Natl Cancer Inst,* **101**, 17, pp. 1174-81.

Carlson R. W., Allred D. C., Anderson B. O., *et al.* (2009), Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw,* **7**, 2, pp. 122-92.

Carlson R. W., Brown E., Burstein H. J., *et al.* (2006), NCCN Task Force Report: Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw,* **4 Suppl 1**, pp. S1-26.

Carreras J., Lopez-Guillermo A., Fox B. C., *et al.* (2006), High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood,* **108**, 9, pp. 2957-64.

Casares N., Pequignot M. O., Tesniere A., *et al.* (2005), Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med,* **202**, 12, pp. 1691-701.

Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., *et al.* (1997), CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood,* **90**, 4, pp. 1458-70.

Ceze N., Thibault G., Goujon G., *et al.* (2011), Pre-treatment lymphopenia as a prognostic biomarker in colorectal cancer patients receiving chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol,* **68**, 5, pp. 1305-13.

Chaturvedi A. K., Pfeiffer R. M., Chang L., *et al.* (2007), Elevated risk of lung cancer among people with AIDS. *Aids,* **21**, 2, pp. 207-13.

Choi C. W., Sung H. J., Park K. H., *et al.* (2003), Early lymphopenia as a risk factor for chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Am J Hematol,* **73**, 4, pp. 263-6.

Chu Y. W., Memon S. A., Sharrow S. O., *et al.* (2004), Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood,* **104**, 4, pp. 1110-9.

Cicin-Sain L., Smyk-Pearson S., Currier N., *et al.* (2010), Loss of naive T cells and repertoire constriction predict poor response to vaccination in old primates. *J Immunol,* **184**, 12, pp. 6739-45.

Clark W. H., Jr., Elder D. E., Guerry D. t., *et al.* (1989), Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst,* **81**, 24, pp. 1893-904.

Clemente C. G., Mihm M. C., Jr., Bufalino R., *et al.* (1996), Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer,* **77**, 7, pp. 1303-10.

Colf L. A., Bankovich A. J., Hanick N. A., *et al.* (2007), How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC. *Cell,* **129**, 1, pp. 135-46.

Coussens L. M., Werb Z. (2002), Inflammation and cancer. *Nature,* **420**, 6917, pp. 860-7.

Cristofanilli M., Budd G. T., Ellis M. J., *et al.* (2004), Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med,* **351**, 8, pp. 781-91.

Cristofanilli M., Hayes D. F., Budd G. T., *et al.* (2005), Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol,* **23**, 7, pp. 1420-30.

Cronin M., Pho M., Dutta D., *et al.* (2004), Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol,* **164**, 1, pp. 35-42.

Curiel T. J., Coukos G., Zou L., *et al.* (2004), Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med,* **10**, 9, pp. 942-9.

Day E. B., Guillonneau C., Gras S., *et al.* (2011), Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8+ T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **108**, 23, pp. 9536-41.

Decot V., Voillard L., Latger-Cannard V., *et al.* (2010), Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol,* **38**, 5, pp. 351-62.

Demaria S., Bhardwaj N., McBride W. H., *et al.* (2005), Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int J Radiat Oncol Biol Phys,* **63**, 3, pp. 655-66.

DeNardo D. G., Barreto J. B., Andreu P., *et al.* (2009), CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell,* **16**, 2, pp. 91-102.

DeNardo D. G., Coussens L. M. (2007), Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res,* **9**, 4, pp. 212.

Denkert C., Loibl S., Noske A., *et al.* (2010), Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol,* **28**, 1, pp. 105-13.

Desantis C., Siegel R., Bandi P., *et al.* (2011), Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin,* pp.

Dighe A. S., Richards E., Old L. J., *et al.* (1994), Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity,* **1**, 6, pp. 447-56.

Dowsett M., Cuzick J., Wale C., *et al.* (2010), Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol,* **28**, 11, pp. 1829-34.

Dubois B., Massacrier C., Vanbervliet B., *et al.* (1998), Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol,* **161**, 5, pp. 2223-31.

Dubois S., Patel H. J., Zhang M., *et al.* (2008), Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8+/CD44high T cells and its antitumor action. *J Immunol,* **180**, 4, pp. 2099-106.

Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., *et al.* (2002), Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol,* **3**, 11, pp. 991-8.

Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. (2004), The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol,* **22**, pp. 329-60.

Dutoit V., Rubio-Godoy V., Dietrich P. Y., *et al.* (2001), Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity. *Cancer Res,* **61**, 15, pp. 5850-6.

Eifel P., Axelson J. A., Costa J., *et al.* (2001), National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst,* **93**, 13, pp. 979-89.

Engel A. M., Svane I. M., Mouritsen S., *et al.* (1996), Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *Apmis,* **104**, 9, pp. 629-39.

Engel A. M., Svane I. M., Rygaard J., *et al.* (1997), MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol,* **45**, 5, pp. 463-70.

Faget J., Biota C., Bachelot T., *et al.* (2011), Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to Treg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells. *Cancer Res,* **71**, 19, pp. 6143-52.

Fisher R. I., Rosenberg S. A., Fyfe G. (2000), Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am,* **6 Suppl 1**, pp. S55-7.

Fourcade J., Kudela P., Sun Z., *et al.* (2009), PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *J Immunol,* **182**, 9, pp. 5240-9.

Fourcade J., Sun Z., Benallaoua M., *et al.* (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**, 10, pp. 2175-86.

Fry T. J., Mackall C. L. (2002), Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood,* **99**, 11, pp. 3892-904.

Fry T. J., Moniuszko M., Creekmore S., *et al.* (2003), IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood,* **101**, 6, pp. 2294-9.

Fugmann S. D., Lee A. I., Shockett P. E., *et al.* (2000), The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol,* **18**, pp. 495-527.

Fuller M. J., Zajac A. J. (2003), Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol,* **170**, 1, pp. 477-86.

Fyfe G., Fisher R. I., Rosenberg S. A., *et al.* (1995), Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol,* **13**, 3, pp. 688-96.

Gallagher M., Obeid P., Marche P. N., *et al.* (2001), Both TCR alpha and TCR delta chain diversity are regulated during thymic ontogeny. *J Immunol,* **167**, 3, pp. 1447-53.

Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., *et al.* (2006), Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science,* **313**, 5795, pp. 1960-4.

Ghebeh H., Mohammed S., Al-Omair A., *et al.* (2006), The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia,* **8**, 3, pp. 190-8.

Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A., *et al.* (2009), Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med,* **15**, 10, pp. 1170-8.

Ghiringhelli F., Menard C., Terme M., *et al.* (2005), CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med,* **202**, 8, pp. 1075-85.

Giri J. G., Kumaki S., Ahdieh M., *et al.* (1995), Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J,* **14**, 15, pp. 3654-63.

Glasziou P. P., Simes R. J., Gelber R. D. (1990), Quality adjusted survival analysis. *Stat Med,* **9**, 11, pp. 1259-76.

Gobert M., Treilleux I., Bendriss-Vermare N., *et al.* (2009), Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res,* **69**, 5, pp. 2000-9.

Goedegebuure P. S., Douville L. M., Li H., *et al.* (1995), Adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with metastatic malignant melanoma and renal cell carcinoma: a pilot study. *J Clin Oncol,* **13**, 8, pp. 1939-49.

Golden-Mason L., Palmer B. E., Kassam N., *et al.* (2009), Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol,* **83**, 18, pp. 9122-30.

Graninger W. B., Steiner C. W., Graninger M. T., *et al.* (2000), Cytokine regulation of apoptosis and Bcl-2 expression in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Death Differ,* **7**, 10, pp. 966-72.

Gravekamp C. (2011), The impact of aging on cancer vaccination. *Curr Opin Immunol,* **23**, 4, pp. 555-60.

Gruvberger S., Ringner M., Chen Y., *et al.* (2001), Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res,* **61**, 16, pp. 5979-84.

Haanen J. B., Baars A., Gomez R., *et al.* (2006), Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother,* **55**, 4, pp. 451-8.

Haas D. W., Geraghty D. E., Andersen J., *et al.* (2006), Immunogenetics of CD4 lymphocyte count recovery during antiretroviral therapy: An AIDS Clinical Trials Group study. *J Infect Dis,* **194**, 8, pp. 1098-107.

Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M., *et al.* (2007), Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104**, 9, pp. 3360-5.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2000), The hallmarks of cancer. *Cell,* **100**, 1, pp. 57-70.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011), Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell,* **144**, 5, pp. 646-74.

Hancock B. W., Dunsmore I. R., Swan H. T. (1982), Lymphopenia: a bad prognostic factor in Hodgkin's disease. *Scand J Haematol,* **29**, 3, pp. 193-9.

Harris L., Fritsche H., Mennel R., *et al.* (2007), American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol,* **25**, 33, pp. 5287-312.

Hasenclever D., Diehl V. (1998), A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med,* **339**, 21, pp. 1506-14.

Hayakawa K., Salmeron M. A., Parkinson D. R., *et al.* (1991), Study of tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive therapy of renal cell carcinoma (RCC) and metastatic melanoma: sequential proliferation of cytotoxic natural killer and noncytotoxic T cells in RCC. *J Immunother (1991),* **10**, 5, pp. 313-25.

Hayes D. F., Cristofanilli M., Budd G. T., *et al.* (2006), Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res,* **12**, 14 Pt 1, pp. 4218-24.

Hino R., Kabashima K., Kato Y., *et al.* (2010), Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer,* **116**, 7, pp. 1757-66.

Hinrichs C. S., Spolski R., Paulos C. M., *et al.* (2008), IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood,* **111**, 11, pp. 5326-33.

Hodi F. S., O'Day S. J., McDermott D. F., *et al.* (2010), Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med,* **363**, 8, pp. 711-23.

Hornberger J., Cosler L. E., Lyman G. H. (2005), Economic analysis of targeting chemotherapy using a 21-gene RT-PCR assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer. *Am J Manag Care,* **11**, 5, pp. 313-24.

Huarte E., Fisher J., Turk M. J., *et al.* (2009), Ex vivo expansion of tumor specific lymphocytes with IL-15 and IL-21 for adoptive immunotherapy in melanoma. *Cancer Lett,* **285**, 1, pp. 80-8.

INVS (2009). Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France pour l'année 2008. Hospices civils de Lyon / Institut de veille sanitaire / Institut National du Cancer / Francim / Institut national de la santé et de la recherche médicale.

Jaleco S., Swainson L., Dardalhon V., *et al.* (2003), Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol,* **171**, 1, pp. 61-8.

Jensen T. O., Schmidt H., Moller H. J., *et al.* (2011), Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer,* pp.

Jin H. T., Anderson A. C., Tan W. G., *et al.* (2010), Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **107**, 33, pp. 14733-8.

Jones L. L., Colf L. A., Bankovich A. J., *et al.* (2008(a)), Different thermodynamic binding mechanisms and peptide fine specificities associated with a panel of structurally similar high-affinity T cell receptors. *Biochemistry,* **47**, 47, pp. 12398-408.

Jones L. L., Colf L. A., Stone J. D., *et al.* (2008(b)), Distinct CDR3 conformations in TCRs determine the level of cross-reactivity for diverse antigens, but not the docking orientation. *J Immunol,* **181**, 9, pp. 6255-64.

Jouvin-Marche E., Aude-Garcia C., Candeias S., *et al.* (1998), Differential chronology of TCRADV2 gene use by alpha and delta chains of the mouse TCR. *Eur J Immunol,* **28**, 3, pp. 818-27.

Joyce J. A., Pollard J. W. (2009), Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer,* **9**, 4, pp. 239-52.

Junod B., Zahl P. H., Kaplan R. M., *et al.* (2011), An investigation of the apparent breast cancer epidemic in France: screening and incidence trends in birth cohorts. *BMC Cancer,* **11**, pp. 401.

Kanegane H., Tosato G. (1996), Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood,* **88**, 1, pp. 230-5.

Kaplan D. H., Shankaran V., Dighe A. S., *et al.* (1998), Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95**, 13, pp. 7556-61.

Kaufmann D. E., Kavanagh D. G., Pereyra F., *et al.* (2007), Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol,* **8**, 11, pp. 1246-54.

Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., *et al.* (2000), Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med,* **191**, 5, pp. 771-80.

Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. (2010), Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell,* **141**, 1, pp. 52-67.

Kim Y. R., Kim J. S., Kim S. J., *et al.* (2011), Lymphopenia is an important prognostic factor in peripheral T-cell lymphoma (NOS) treated with anthracycline-containing chemotherapy. *J Hematol Oncol,* **4**, pp. 34.

Kirk G. D., Merlo C., P O. D., *et al.* (2007), HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clin Infect Dis,* **45**, 1, pp. 103-10.

Klechevsky E., Flamar A. L., Cao Y., *et al.* (2010), Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood,* **116**, 10, pp. 1685-97.

Klechevsky E., Morita R., Liu M., *et al.* (2008), Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity,* **29**, 3, pp. 497-510.

Klein L., Hinterberger M., Wirnsberger G., *et al.* (2009), Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol,* **9**, 12, pp. 833-44.

Labidi-Galy S. I., Sisirak V., Meeus P., *et al.* (2011), Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res,* **71**, 16, pp. 5423-34.

Lake R. A., Robinson B. W. (2005), Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer,* **5**, 5, pp. 397-405.

Lee H. W., Park S. J., Choi B. K., *et al.* (2002), 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol,* **169**, 9, pp. 4882-8.

Leek R. D., Hunt N. C., Landers R. J., *et al.* (2000), Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol,* **190**, 4, pp. 430-6.

Levy Y., Lacabaratz C., Weiss L., *et al.* (2009), Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest,* **119**, 4, pp. 997-1007.

Lheureux S., Clarisse B., Launay-Vacher V., *et al.* (2011), Evaluation of current practice: management of chemotherapy-related toxicities. *Anticancer Drugs,* **22**, 9, pp. 919-25.

Lissoni P., Brivio F., Fumagalli L., *et al.* (2005), Enhancement of the efficacy of chemotherapy with oxaliplatin plus 5-fluorouracil by pretreatment with IL-2 subcutaneous immunotherapy in metastatic colorectal cancer patients with lymphocytopenia prior to therapy. *In Vivo,* **19**, 6, pp. 1077-80.

Logan A. C., Gao H., Wang C., *et al.* (2011), High-throughput VDJ sequencing for quantification of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia and immune reconstitution assessment. *Proc Natl Acad Sci U S A,* pp.

Luo W., Liao W. J., Huang Y. T., *et al.* (2011), Normalization of T cell receptor repertoire diversity in patients with advanced colorectal cancer who responded to chemotherapy. *Cancer Sci,* **102**, 4, pp. 706-12.

Luo W., Liao W. J., Ma L., *et al.* (2010), Dynamic monitoring the TCR CDR3 spectratypes in patients with metastatic CRC treated with a combination of bevacizumab, irinotecan, fluorouracil, and leucovorin. *Cancer Immunol Immunother,* **59**, 2, pp. 247-56.

Maccubbin D. L., Wing K. R., Mace K. F., *et al.* (1992), Adriamycin-induced modulation of host defenses in tumor-bearing mice. *Cancer Res,* **52**, 13, pp. 3572-6.

MacKie R. M., Reid R., Junor B. (2003), Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med,* **348**, 6, pp. 567-8.

Mahmoud S. M., Paish E. C., Powe D. G., *et al.* (2011), Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol,* **29**, 15, pp. 1949-55.

Mansfield A. S., Heikkila P., von Smitten K., *et al.* (2011), Metastasis to sentinel lymph nodes in breast cancer is associated with maturation arrest of dendritic cells and poor co-localization of dendritic cells and CD8(+) T cells. *Virchows Arch,* **459**, 4, pp. 391-8.

Marec-Berard P., Blay J. Y., Schell M., *et al.* (2003), Risk model predictive of severe anemia requiring RBC transfusion after chemotherapy in pediatric solid tumor patients. *J Clin Oncol,* **21**, 22, pp. 4235-8.

Markley J. C., Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood,* **115**, 17, pp. 3508-19.

Marodon G., Desjardins D., Mercey L., *et al.* (2009), High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *Eur J Immunol,* **39**, 8, pp. 2136-45.

Mattiuzzi G. N., Cortes J. E., Talpaz M., *et al.* (2003), Development of Varicella-Zoster virus infection in patients with chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res,* **9**, 3, pp. 976-80.

McDermott D. F., Regan M. M., Clark J. I., *et al.* (2005), Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol,* **23**, 1, pp. 133-41.

Melchionda F., Fry T. J., Milliron M. J., *et al.* (2005), Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest,* **115**, 5, pp. 1177-87.

Messaoudi I., Guevara Patino J. A., Dyall R., *et al.* (2002), Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science,* **298**, 5599, pp. 1797-800.

Miles D., von Minckwitz G., Seidman A. D. (2002), Combination versus sequential single-agent therapy in metastatic breast cancer. *Oncologist,* **7 Suppl 6**, pp. 13-9.

Mohamed M. M., Sloane B. F. (2006), Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer,* **6**, 10, pp. 764-75.

Moloney F. J., Comber H., O'Lorcain P., *et al.* (2006), A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol,* **154**, 3, pp. 498-504.

Morita T., Salmeron M. A., Hayakawa K., *et al.* (1992), T cell functions of IL-2-activated tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Reg Immunol,* **4**, 4, pp. 225-35.

Moskophidis D., Lechner F., Pircher H., *et al.* (1993), Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature,* **362**, 6422, pp. 758-61.

Mullins G. M., Anderson P. N., Santos G. W. (1975), High dose cyclophosphamide therapy in solid tumors. Therapeutic, toxic, and immunosuppressive effects. *Cancer,* **36**, 6, pp. 1950-8.

Mumprecht S., Matter M., Pavelic V., *et al.* (2006), Imatinib mesylate selectively impairs expansion of memory cytotoxic T cells without affecting the control of primary viral infections. *Blood,* **108**, 10, pp. 3406-13.

Mumprecht S., Schurch C., Schwaller J., *et al.* (2009), Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood,* **114**, 8, pp. 1528-36.

Munger W., DeJoy S. Q., Jeyaseelan R., Sr., *et al.* (1995), Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol,* **165**, 2, pp. 289-93.

Nakanishi J., Wada Y., Matsumoto K., *et al.* (2007), Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother,* **56**, 8, pp. 1173-82.

Nomi T., Sho M., Akahori T., *et al.* (2007), Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res,* **13**, 7, pp. 2151-7.

Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., *et al.* (2007), Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med,* **13**, 1, pp. 54-61.

Oguz A., Karadeniz C., Ckitak E. C., *et al.* (2006), Which one is a risk factor for chemotherapy-induced febrile neutropenia in childhood solid tumors: early lymphopenia or monocytopenia? *Pediatr Hematol Oncol,* **23**, 2, pp. 143-51.

Ohigashi Y., Sho M., Yamada Y., *et al.* (2005), Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res,* **11**, 8, pp. 2947-53.

Oxenius A., Zinkernagel R. M., Hengartner H. (1998), Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection. *Immunity,* **9**, 4, pp. 449-57.

Pagani O., Senkus E., Wood W., *et al.* (2010), International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst,* **102**, 7, pp. 456-63.

Palermo C., Joyce J. A. (2008), Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci,* **29**, 1, pp. 22-8.

Pannetier C., Even J., Kourilsky P. (1995), T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today,* **16**, 4, pp. 176-81.

Park J. H., Yu Q., Erman B., *et al.* (2004), Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity,* **21**, 2, pp. 289-302.

Pasqual N., Gallagher M., Aude-Garcia C., *et al.* (2002), Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med,* **196**, 9, pp. 1163-73.

Pellegrini M., Calzascia T., Elford A. R., *et al.* (2009), Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat Med,* **15**, 5, pp. 528-36.

Penn I. (1978), Malignancies associated with immunosuppressive or cytotoxic therapy. *Surgery,* **83**, 5, pp. 492-502.

Perou C. M., Jeffrey S. S., van de Rijn M., *et al.* (1999), Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **96**, 16, pp. 9212-7.

Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., *et al.* (2000), Molecular portraits of human breast tumours. *Nature,* **406**, 6797, pp. 747-52.

Price D. A., West S. M., Betts M. R., *et al.* (2004), T cell receptor recognition motifs govern immune escape patterns in acute SIV infection. *Immunity,* **21**, 6, pp. 793-803.

Qian B. Z., Pollard J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell,* **141**, 1, pp. 39-51.

Radaideh S. M., Sledge G. W. (2008), Taxane vs. taxane: is the duel at an end? A commentary on a phase-III trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer: results of the ERASME 3 study. *Breast Cancer Res Treat,* **111**, 2, pp. 203-8.

Rakhra K., Bachireddy P., Zabuawala T., *et al.* (2010), CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell,* **18**, 5, pp. 485-98.

Ray-Coquard I., Borg C., Bachelot T., *et al.* (2003), Baseline and early lymphopenia predict for the risk of febrile neutropenia after chemotherapy. *Br J Cancer,* **88**, 2, pp. 181-6.

Ray-Coquard I., Cropet C., Van Glabbeke M., *et al.* (2009(a)), Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res,* **69**, 13, pp. 5383-91.

Ray-Coquard I., Dussart S., Goillot C., *et al.* (2009(b)), A risk model for severe anemia to select cancer patients for primary prophylaxis with epoetin alpha: a prospective randomized controlled trial of the ELYPSE study group. *Ann Oncol,* **20**, 6, pp. 1105-12.

Ray-Coquard I., Ghesquiere H., Bachelot T., *et al.* (2001), Identification of patients at risk for early death after conventional chemotherapy in solid tumours and lymphomas. *Br J Cancer,* **85**, 6, pp. 816-22.

Ray-Coquard I., Le Cesne A., Rubio M. T., *et al.* (1999), Risk model for severe anemia requiring red blood cell transfusion after cytotoxic conventional chemotherapy regimens. The Elypse 1 Study Group. *J Clin Oncol,* **17**, 9, pp. 2840-6.

Recchia F., Candeloro G., Necozione S., *et al.* (2010), Prolonged disease control after myeloablative chemotherapy, autologous transplantation and immunotherapy in high-risk early breast cancer. *Anticancer Res,* **30**, 1, pp. 209-15.

Robert C., Thomas L., Bondarenko I., *et al.* (2011), Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med,* **364**, 26, pp. 2517-26.

Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., *et al.* (1996), Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem,* **242**, 1, pp. 84-9.

Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. (1998), A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science,* **281**, 5375, pp. 363, 365.

Rosenberg S. A., Dudley M. E. (2009), Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol,* **21**, 2, pp. 233-40.

Rowley J., Monie A., Hung C. F., *et al.* (2008), Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and CD8+ T cells activated by IL-15 through receptor beta/common gamma signaling in trans. *J Immunol,* **181**, 12, pp. 8237-47.

Rytkonen M. A., Hurwitz J. L., Thompson S. D., *et al.* (1996), Restricted onset of T cell receptor alpha gene rearrangement in fetal and neonatal thymocytes. *Eur J Immunol,* **26**, 8, pp. 1892-6.

Sakuishi K., Apetoh L., Sullivan J. M., *et al.* (2010), Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med,* **207**, 10, pp. 2187-94.

Salama P., Phillips M., Grieu F., *et al.* (2009), Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol,* **27**, 2, pp. 186-92.

Salloum E., Cooper D. L., Howe G., *et al.* (1996), Spontaneous regression of lymphoproliferative disorders in patients treated with methotrexate for rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Oncol,* **14**, 6, pp. 1943-9.

Sandau M. M., Kohlmeier J. E., Woodland D. L., *et al.* IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol,* **184**, 1, pp. 35-44.

Scanlan M. J., Simpson A. J., Old L. J. (2004), The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun,* **4**, pp. 1.

Schmitt N., Morita R., Bourdery L., *et al.* (2009), Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity,* **31**, 1, pp. 158-69.

Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J. (2011), Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science,* **331**, 6024, pp. 1565-70.

Schwartzentruber D. J., Lawson D. H., Richards J. M., *et al.* (2011), gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med,* **364**, 22, pp. 2119-27.

Seggewiss R., Lore K., Greiner E., *et al.* (2005), Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood,* **105**, 6, pp. 2473-9.

Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., *et al.* (2001), IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature,* **410**, 6832, pp. 1107-11.

Shin H., Blackburn S. D., Blattman J. N., *et al.* (2007), Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med,* **204**, 4, pp. 941-9.

Shin H., Wherry E. J. (2007), CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol,* **19**, 4, pp. 408-15.

Siegel R., Ward E., Brawley O., *et al.* (2011), Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin,* **61**, 4, pp. 212-36.

Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., *et al.* (1987), Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science,* **235**, 4785, pp. 177-82.

Sloan-Lancaster J., Allen P. M. (1996), Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol,* **14**, pp. 1-27.

Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., *et al.* (2001), Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**, 19, pp. 10869-74.

Sportes C., Babb R. R., Krumlauf M. C., *et al.* (2010), Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin Cancer Res,* **16**, 2, pp. 727-35.

Storek J., Gillespy T., 3rd, Lu H., *et al.* (2003), Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys. *Blood,* **101**, 10, pp. 4209-18.

Surh C. D., Sprent J. (2008), Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity,* **29**, 6, pp. 848-62.

Swainson L., Verhoeyen E., Cosset F. L., *et al.* (2006), IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes. *J Immunol,* **176**, 11, pp. 6702-8.

Swann J. B., Smyth M. J. (2007), Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest,* **117**, 5, pp. 1137-46.

Sznol M, Hodi FS, Margolin K, *et al.* (2008), Phase I study of BMS-663513 a fully human anti-CD137 agonist monoclonal anti-body, in patients (pts) with advanced cancer (CA). *Journal of Clinical Oncology,* **26**, pp.

Sznol M., Powderly J. D., Smith D. C., *et al.* (2010), Safety and antitumor activity of biweekly MDX-1106 (Anti-PD-1, BMS-936558/ONO-4538) in patients with advanced refractory malignancies. . *Journal of Clinical Oncology,* **28**, 15, pp.

Taylor A. L., Marcus R., Bradley J. A. (2005), Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol,* **56**, 1, pp. 155-67.

Thompson R. H., Gillett M. D., Cheville J. C., *et al.* (2004), Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101**, 49, pp. 17174-9.

Treilleux I., Blay J. Y., Bendriss-Vermare N., *et al.* (2004), Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res,* **10**, 22, pp. 7466-74.

Tsukamoto K., Huang Y. C., Dorsey W. C., *et al.* (2006), Juxtacrine function of interleukin-15/interleukin-15 receptor system in tumour derived human B-cell lines. *Clin Exp Immunol,* **146**, 3, pp. 559-66.

Turner N., Tutt A., Ashworth A. (2004), Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer,* **4**, 10, pp. 814-9.

Turner S. J., Doherty P. C., McCluskey J., *et al.* (2006), Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol,* **6**, 12, pp. 883-94.

Uggeri F., Caprotti R., De Grate L., *et al.* (2009), Short-term preoperative IL-2 immunotherapy in operable pancreatic cancer: a randomized study. *Hepatogastroenterology,* **56**, 91-92, pp. 861-5.

Urbani S., Amadei B., Fisicaro P., *et al.* (2006), Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology,* **44**, 1, pp. 126-39.

Vajdic C. M., McDonald S. P., McCredie M. R., *et al.* (2006), Cancer incidence before and after kidney transplantation. *Jama,* **296**, 23, pp. 2823-31.

van 't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., *et al.* (2002), Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature,* **415**, 6871, pp. 530-6.

Vang K. B., Yang J., Mahmud S. A., *et al.* (2008), IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol,* **181**, 5, pp. 3285-90.

Viguier M., Lemaitre F., Verola O., *et al.* (2004), Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol,* **173**, 2, pp. 1444-53.

Virgin H. W., Wherry E. J., Ahmed R. (2009), Redefining chronic viral infection. *Cell,* **138**, 1, pp. 30-50.

von Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian L. A., *et al.* (1995), Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med,* **1**, 181(4), pp. 1519-26.

Walsh L. A., Damjanovski S. (2011), IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-beta1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Commun Signal,* **9**, 1, pp. 10.

Wang Z., Zhao C., Moya R., *et al.* (2008), A novel role for CD4+ T cells in the control of cachexia. *J Immunol,* **181**, 7, pp. 4676-84.

Wei S., Kryczek I., Edwards R. P., *et al.* (2007), Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Res,* **67**, 15, pp. 7487-94.

West M., Blanchette C., Dressman H., *et al.* (2001), Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**, 20, pp. 11462-7.

Wherry E. J., Ahmed R. (2004), Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol,* **78**, 11, pp. 5535-45.

Wherry E. J., Blattman J. N., Murali-Krishna K., *et al.* (2003), Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol,* **77**, 8, pp. 4911-27.

Winstead C. J., Reilly C. S., Moon J. J., *et al.* (2010), CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia. *J Immunol,* **184**, 9, pp. 4749-60.

Wu C., Zhu Y., Jiang J., *et al.* (2006), Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem,* **108**, 1, pp. 19-24.

Wyckoff J. B., Wang Y., Lin E. Y., *et al.* (2007), Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res,* **67**, 6, pp. 2649-56.

Yager E. J., Ahmed M., Lanzer K., *et al.* (2008), Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *J Exp Med,* **205**, 3, pp. 711-23.

Zajac A. J., Blattman J. N., Murali-Krishna K., *et al.* (1998), Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med,* **188**, 12, pp. 2205-13.

Zhang L., Conejo-Garcia J. R., Katsaros D., *et al.* (2003), Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med,* **348**, 3, pp. 203-13.

Zhang M., Yao Z., Dubois S., *et al.* (2009), Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **106**, 18, pp. 7513-8.

Zhao C., Davies J. D. (2010), A peripheral CD4+ T cell precursor for naive, memory, and regulatory T cells. *J Exp Med,* **207**, 13, pp. 2883-94.

Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., *et al.* (2008), The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest,* **118**, 6, pp. 1991-2001.

Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. (2011), Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol,* **8**, 3, pp. 151-60.

Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. (2006), Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol,* **6**, 10, pp. 715-27.

Titre : Etude des distorsions du répertoire immunitaire en tant que facteur pronostique de risque chez les patientes souffrant d'un cancer du sein métastatique en 1ère rechute. Etude de la valeur pronostique de la lymphopénie et de la divpénie.

Des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré l'impact majeur de la lymphopénie (<1Giga/L), détectée avant tout traitement, sur la survie globale des patients atteints d'un cancer solide en phase métastatique, soulignant ainsi l'importance du système immunitaire dans le contrôle de la progression tumorale. Au cours de mon projet de thèse, j'ai analysé l'apport de la diversité combinatoire de la chaine β du TCR, autre indicateur de la qualité du système immunitaire, en tant que marqueur pronostique chez des patientes atteintes de cancer du sein en phase métastatique. J'ai pu montrer qu'un score combinant la diversité des TCR et le nombre de lymphocytes (score NDL) est un facteur indépendant de mauvais pronostic en analyse multivariée. Ce score permet l'identification d'une sous population de patientes à risque qui présente à la fois une lymphopénie et une faible diversité (< 33%) combinatoire du TCR et pour laquelle une très forte réduction de la médiane de survie est observée. Nous avons également réalisé une étude plus approfondie de l'impact des sous-populations de lymphocytes et des cytokines plasmatiques produites. En parallèle, j'ai été amené à développer des tests de biologie moléculaire pour améliorer l'étude de la diversité du répertoire des TCR au niveau génomique. Ces travaux nous ouvrent la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques qui intégreraient les perturbations du système immunitaire. En effet, suite à ces résultats, un essai clinique basé sur l'administration d'IL-7, cytokine permettant l'expansion des cellules T avant ou pendant la chimiothérapie vient d'être activé au Centre Léon Bérard.

Title : Study of distortions of the immune repertoire as a prognostic factor of risk in patients suffering from metastatic breast cancer in first relapse. Study of the prognostic value of lymphopenia and divpenia.

Previous work of the team demonstrated the major impact of lymphopenia (<1Giga/L), detected before treatment, on overall survival of patients with solid metastatic cancer, highlighting the importance of immune system in controlling tumor progression. During my thesis project, I analyzed the contribution of the combinatorial diversity of the TCR β chain, another indicator of the quality of the immune system, as a prognostic marker in patients with metastatic breast cancer. I was able to show that a score combining the diversity of TCR and the number of lymphocytes (score NDL) is an independent factor of poor prognostic in multivariate analysis. This score allows identification of a subpopulation of patients at risk who has both a lymphopenia and a low combinatorial diversity (<33%) of TCR and for which a reduction in the median survival was observed. We also made further study of the impact of subpopulations of lymphocytes and plasma cytokines. In parallel, I developed molecular tests to improve the study of TCR repertoire diversity at the genomic level. This work opens the door to new therapeutic strategies that would consider immune system dysfunctions. Indeed, following these results, a clinical trial based on the administration of IL-7 cytokine for the expansion of T cells before or during chemotherapy has been activated at the Centre Léon Bérard.

Mots-clés : Divpénie, lymphopénie, lymphodivpénie, cancer du sein métastatique, répertoire immunitaire, diversité combinatoire des TCR, lymphocytes T, facteur pronostique, étude clinique observationnelle, cytokines, PCR multiplex.

Keywords : Divpenia, lymphopenia, metastatic breast cancer, immune repertoire, TCR combinatorial diversity, T lymphocytes, prognostic factor, observational clinical study, cytokines, multiplex PCR.

Intitulé et adresse du laboratoire :
Equipe 11 "Ciblage thérapeutique de la cellule tumorale et de son environnement immunitaire" (Pr Blay / Dr Caux)
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Inserm U1052 CNRS 5286
Centre Léon Bérard
28 rue Laennec
69373 LYON Cedex 08