

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2017

N° 172

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en DERMATOLOGIE-VENEROLOGIE

par

Edouard CHASSEUIL

Né le 06/10/1986 à La Rochelle

Présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2017

**Marqueurs prédictifs sanguins de réponse au
traitement par nivolumab dans le mélanome
métastatique**

Présidente du jury : Madame le Professeur Gaëlle QUEREUX

Directrice de thèse : Madame le Professeur Brigitte DRENO

COMPOSITION DU JURY :

Présidente du jury : Professeur Gaëlle QUEREUX

Directrice de thèse : Professeur Brigitte DRENO

Membres du jury :

Professeur Brigitte DRENO

Professeur Gaëlle QUEREUX

Professeur Marc DENIS

Docteur Mélanie SAINT-JEAN

Docteur Lucie PEUVREL

REMERCIEMENTS

Madame le Professeur DRENO, vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse et êtes à l'origine de son sujet. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail. Recevez ici toute ma reconnaissance et l'expression de mon plus grand respect.

Madame le Docteur Mélanie SAINT-JEAN, tu me fais l'honneur de diriger cette thèse. Merci de m'avoir guidé dans cette aventure, d'avoir été présente jour après jour.

Madame le Professeur QUEREUX, vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect.

Professeur Marc DENIS, vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Merci de l'intérêt que vous y avez porté.

Madame le Docteur Lucie PEUVREL, Merci de participer à cette thèse. Merci également pour ta réactivité, ta disponibilité et ton écoute.

Monsieur le Docteur KHAMMARI, Merci de m'avoir aidé durant la préparation de cette thèse et pour ta grande disponibilité.

Monsieur le Docteur Jean-Michel NGUYEN, merci de votre réactivité pour la réalisation des statistiques de cette thèse.

A tous les médecins du service de Dermatologie, que je respecte et que j'admire. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

A Hannah, le love de ma life.

A mes parents Philippe et Véronique, qui sont un exemple pour moi. Ils m'ont apporté tout au long de ma vie amour, bienveillance et générosité. Vous m'avez permis de devenir l'homme que je suis.

A mon frère, ma sœur et à Philippine pour leur amour.

A mes grands-parents qui sont pour moi source d'inspiration et d'exemple.

Aux Glamamours : Louis, Lise, Marc, Noémie et Ajij qui sont une source de surprise intarissable.

A Tony et Hélène.

A mes oncles, tantes qui nous ont permis d'avoir une si belle famille.

A Tous mes cousins.

A la colloc de François de Sourdis, Antoine, Valou et Romain,

A Michon

A mes cops de dermato qui vont me manquer : les Céciles, Justine, Louise, Barbara, Maxence, Charlotte, Marion, Solène, Diane, Sarah, Perrine, Anouk, Clémence, Fanny et les Camilles.

A l'internat de Nantes et tout particulièrement à Yonis et Romain.

A mes tous premiers co-internes : Carole et Jean-Marie

A toutes les infirmières de Dermato.

Aux relecteurs de ce travail : Sarah, Louise et Véronique.

SOMMAIRE

RESUME:	9
INTRODUCTION	10
A. EPIDEMIOLOGIE DU MELANOME (1)	10
B. LES TRAITEMENTS DU MELANOME METASTATIQUE	10
I. <i>Les thérapies ciblées</i>	11
II. <i>L'immunothérapie</i>	12
C. DEFINITION D'UN BIOMARQUEUR ET PROBLEMATIQUE POSEE DANS LE CONTEXTE DES IMMUNOTHERAPIES	18
D. BIOMARQUEURS CONNUS POUR L'ANTI-PD1 – REVUE DE LA LITTERATURE	19
I. <i>L'expression de PD-L1</i>	19
II. <i>Lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs)</i>	20
III. <i>Clonalité des lymphocytes T</i>	20
IV. <i>Charge mutationnelle et présence de néo antigènes</i>	20
V. <i>Le microbiote intestinal</i>	21
E. PROBLEME DE CES BIOMARQUEURS	22
F. BIOMARQUEURS SANGUINS DEJA CONNUS	23
I. <i>Avant traitement</i>	23
II. <i>En cours de traitement</i>	24
MATERIEL ET METHODES	25
RESULTATS	29
DISCUSSION	40
A. COMPARAISON DE NOS RESULTATS AVEC LA LITTERATURE	41
I. <i>Analyse monovariée</i>	41
II. <i>Appariement pour l'analyse multivariée</i>	43
III. <i>Analyse en multivariée</i>	44
B. HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES	45
I. <i>La réponse inflammatoire, marqueur prédictif négatif</i>	45
II. <i>Le taux de lymphocytes, marqueur prédictif positif</i>	46
III. <i>Les lymphocytes CD8 sanguins</i>	46
POINTS FORTS DE CETTE ETUDE	47
POINTS FAIBLES DE CETTE ETUDE	48
AVENIR DES BIOMARQUEURS	49
<i>Les biomarqueurs actuels</i>	49
<i>Le biomarqueur du futur</i>	49
CONCLUSION	52
BIBLIOGRAPHIE	69

Résumé:

Introduction: Le nivolumab est une immunothérapie anti-PD1 dont le taux de réponse est d'environ 40% dans le mélanome métastatique. Des marqueurs histologiques prédictifs, notamment l'expression de PD-L1 et l'infiltrat péri-tumoral CD8 ont été identifiés comme associés à une survie prolongée. Peu d'études ont évalué les biomarqueurs prédictifs sanguins. Notre objectif était d'identifier des biomarqueurs sanguins simples prélevés avant traitement par anti-PD1, associés à une survie prolongée.

Matériel et Méthodes: Nous avons inclus tous les cas de mélanomes avancés traités par anti-PD1 sur une période de 3 ans suivis dans notre service. Les valeurs suivantes ont été recueillies pour chaque patient dans les 2 mois précédant le début du traitement par anti-PD1 : le nombre de leucocytes (NL), de lymphocytes, de lymphocytes T CD4, de lymphocytes T CD8, de polynucléaires neutrophiles (NN), de monocytes (NM), d'éosinophiles, le rapport lymphocytaire CD4/CD8, le rapport leucocytes/lymphocytes (LLR), le rapport neutrophiles/lymphocytes (NLR), les taux de lactate déshydrogénase (LDH), d'anticorps antinucléaires et de protéine C-réactive. Une analyse univariée puis multivariée ajustée sur le stade AJCC, le taux de LDH et l'échec d'une première ligne de traitement ont été réalisées pour tester l'association entre la survie globale (SG) d'une part et la survie sans progression (SSP) d'autre part avec chaque biomarqueur.

Résultats: Quatre-vingt-sept patients ont été inclus dans cette étude. Les valeurs élevées suivantes étaient significativement associées à une diminution de la SG après analyse univariée et multivariée : NL (hazard ratio (HR): 1,13 ; P : 0,04), LLR (HR: 1,1 ; P : 0,03), NN (HR: 1,14 ; P : 0,03), NLR (HR: 1,1 ; P : 0,04) et NM (HR: 4,02 ; P : 0,04). Des résultats similaires ont été trouvés avec la SSP à l'exception du NL en multivarié.

Discussion: Nos résultats sont concordants avec les données publiées pour l'immunothérapie par anti-CTLA4. Ainsi, chez les patients traités par ipilimumab, un NN et un NLR élevés ont été décrits comme associés à un mauvais pronostic. En revanche, ces biomarqueurs n'avaient jamais été rapportés pour le traitement par anti-PD1 dans le mélanome. Le taux de LDH était déjà connu comme associé à un mauvais pronostic pour les anti-PD1 et nous a donc servi de variable d'ajustement.

Conclusion: Un taux augmenté de NL, LLR, NN, NLR et NM avant traitement par anti-PD1 pour un mélanome avancé sont des marqueurs d'une SG et d'une SSP plus courtes. Ces variables sont facilement mesurables en pratique via un échantillon de sang périphérique et pourraient aider à améliorer la sélection des patients à l'avenir.

Introduction

A. Epidémiologie du mélanome (1)

En France, le mélanome de la peau se situe au 8ème rang des causes de cancer chez l'homme et 6ème chez la femme. Il représente 10 % des cancers de la peau. Le mélanome pose aujourd'hui un problème de santé publique en raison de son incidence en forte augmentation. En 2015, 14325 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France chez 7083 hommes et 7242 femmes. Cette même année, 1773 décès par mélanome étaient enregistrés. L'âge moyen au diagnostic en 2012 était de 61 ans chez l'homme et 64 ans chez la femme. L'âge médian au décès en 2012 était de 64 ans chez l'homme et 61 ans chez la femme.

La survie spécifique du mélanome à 5 ans est de 85 %. Si les formes diagnostiquées précocement sont de bon pronostic, les formes évoluées et notamment les formes métastatiques sont de pronostic redoutable. Il existe une certaine stabilité de la mortalité entre 1995 et 2005 malgré l'augmentation d'incidence pouvant être expliquée par les campagnes de prévention et de dépistage.

B. Les traitements du mélanome métastatique.

Jusqu'en 2011, aucune étude n'avait permis une augmentation de la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique. La prise en charge thérapeutique a été bouleversée depuis ces dernières années avec l'arrivée de nouveaux traitements capables de prolonger significativement la durée de vie des patients.

I. Les thérapies ciblées

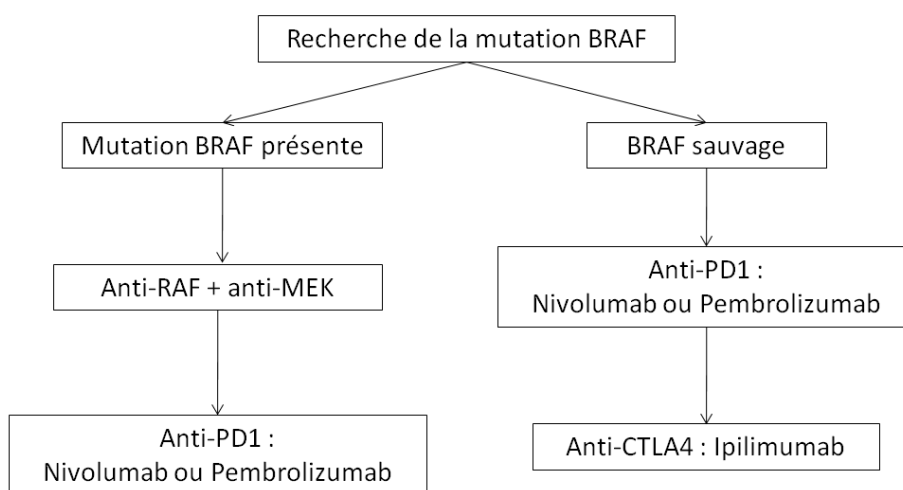
a. Les inhibiteurs de BRAF

La mutation de *BRAF* est responsable d'une activation de la voie des MAP kinases, elle est retrouvée dans 40 à 50 % des mélanomes. Deux inhibiteurs sélectifs de BRAF existent actuellement : le vemurafenib et le dabrafénib. Le vemurafenib est le premier inhibiteur de BRAF à avoir montré une amélioration de la survie globale des patients suivis pour mélanome métastatique en comparaison à la chimiothérapie par dacarbazine chez les patients porteurs de la mutation *BRAF* V600. (2)

b. La combinaison inhibiteur de BRAF et inhibiteur de MEK

Les inhibiteurs de BRAF dans le mélanome métastatique constituent un des traitements majeurs avec une réponse rapide au traitement. Malheureusement la réponse est limitée dans le temps, avec la survenue de mécanismes de résistance secondaire à l'échelle cellulaire, entraînant un échappement thérapeutique. Une étude comparant le dabrafénib et tramétinib au dabrafénib seul a permis de mettre en évidence un hazard ratio de la survie sans progression à 0,75 (IC 95% 0,57 à 0,99 ; P=0,03). (3,4)

Figure 1 : Traitements systémiques dans le cadre du mélanome avancé ou métastatique. (5)



II. L'Immunothérapie

a. Fonctionnement de la réponse immunitaire classique

La réponse immunitaire anti tumorale se déroule en plusieurs étapes régulées par des signaux activateurs ou inhibiteurs. Ce cycle peut être divisé en sept grandes étapes détaillées ci-dessous :

1. Le processus débute par la libération d'antigènes tumoraux par la tumeur.
2. Les antigènes tumoraux sont capturés par la cellule présentatrice d'antigène (CPA).
3. La CPA migre vers les organes lymphoïdes secondaires et présente les antigènes tumoraux aux lymphocytes naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceci permet l'activation des lymphocytes T.
4. Les lymphocytes T effecteurs migrent vers les tissus périphériques.
5. Ces lymphocytes T infiltrent le site tumoral.
6. Il y a alors une reconnaissance spécifique par le récepteur du lymphocyte T (TCR) de l'antigène tumoral présenté sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules cancéreuses permettant l'activation du lymphocyte T effecteur en lymphocyte T cytotoxique.
7. Le lymphocyte T cytotoxique spécifique lyse la cellule tumorale.

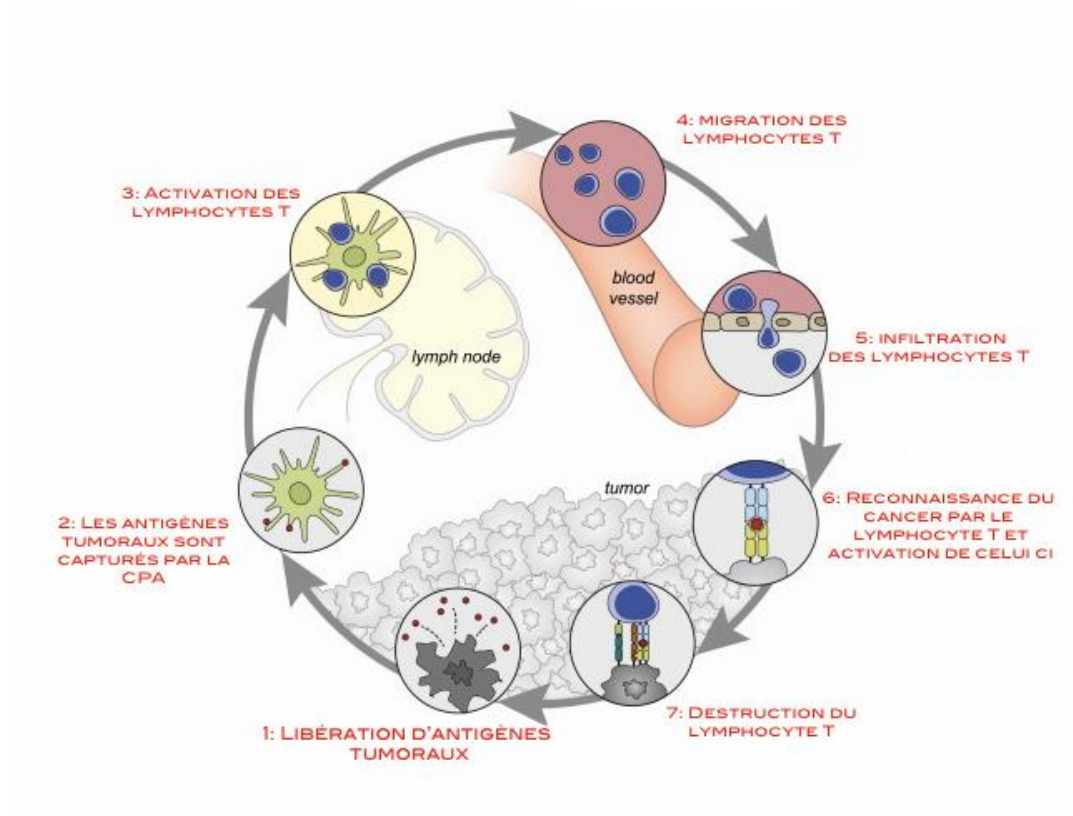


Figure 2 : Le cycle cancer-immunité. Traduit d'après *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. (6)

B. La réponse immunitaire avec les points de contrôle immunitaires

La première étape de l'activation lymphocytaire est réalisée par la reconnaissance spécifique du récepteur du lymphocyte T et de l'antigène tumoral présenté sur le complexe majeur d'histocompatibilité à la surface des cellules cancéreuses. La seconde étape de cette activation est réalisée par les co-sigaux tels que CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2) qui sont des points de contrôle immunitaire. (7) Il s'agit d'un ensemble de récepteurs et de ligands permettant un rétrocontrôle positif ou négatif. Ils interviennent dans la modulation de la réponse lymphocytaire T. Leur rôle physiologique est de maintenir la tolérance du soi en limitant les réactions auto-immunes ainsi que de moduler l'intensité et la durée de la réponse immunitaire. Ces récepteurs vont ainsi soit renforcer l'activation et la prolifération du lymphocyte T, soit l'inhiber.

En immunothérapie dans le mélanome métastatique, ce sont ces points de contrôles qui vont être ciblés par l'anti-CTLA4 et les anti-PD1.

1. L'ipilimumab, anticorps monoclonal anti-CTLA4

Le CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) est une molécule exprimée uniquement à la surface des lymphocytes T activés. Le CTLA4 possède une plus forte affinité pour CD80 et CD86 que le CD28 lui-même. Physiologiquement, lorsqu'il se lie au CD80 ou au CD86, il entraîne alors un signal d'inactivation du lymphocyte T. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal qui bloque le CTLA4. En levant ce frein inhibiteur physiologique, il empêche l'inhibition des lymphocytes.(7)

En 2011 l'ipilimumab a été le premier traitement à montrer une amélioration de la survie globale dans un essai comparant ipilimumab et dacarbazine à dacarbazine et placebo dans le mélanome métastatique. La survie globale était plus importante dans le groupe recevant dacarbazine et ipilimumab 11,2 mois contre 9,1 mois dans le groupe dacarbazine et placebo. Le taux de survie était de 47.3% contre 36.3% à un an, de 28.5% contre 17.9% à 2 ans et de 20.8% contre 12.2% à 3 ans. (8)

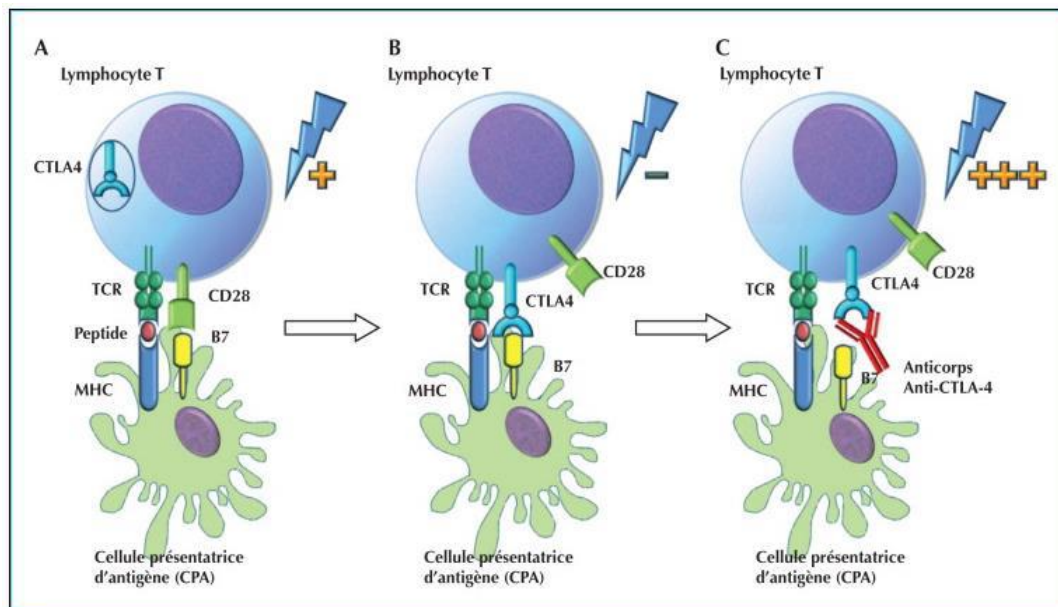


Figure 3 : Mécanisme d'action des anticorps anti-CTLA4. (9)

A : Activation lymphocytaire par la liaison CMH – peptide antigénique – TCR et co-stimulation par les co-sigaux CD28 et B7.

B : Après stimulation du TCR, le CTLA4 est transporté à la surface cellulaire et se couple avec le récepteur B7 pour inhiber l'activation du lymphocyte T.

C : L'anticorps anti-CTLA4 bloque le récepteur CTLA4, empêchant l'inactivation lymphocytaire T.

2. Anticorps anti-PD1

PD1 est également l'un de ces points de contrôles. Il s'agit d'une molécule du rétrocontrôle négatif du lymphocyte T, exprimée par les lymphocytes T en état d'activation chronique. La liaison de PD1 avec les ligands PD-L1 et PD-L2, exprimés à la surface des cellules tumorales ou par d'autres cellules du microenvironnement tumoral entraîne une inhibition de la prolifération des lymphocytes T.

L'anticorps anti-PD1 est un anticorps entièrement humain qui se lie aux récepteurs PD1 des lymphocytes T et bloque son interaction avec les ligands PD-L1 et PD-L2 (Figure 3). Cela conduit à l'activation des lymphocytes T et à une activité anti tumorale. Alors

que l'ipilimumab fait intervenir la phase initiale d'activation lymphocytaire, la voie PD1 régule les réponses inflammatoires tissulaires liées aux cellules T effectrices qui ont reconnu leurs antigènes de façon chronique.

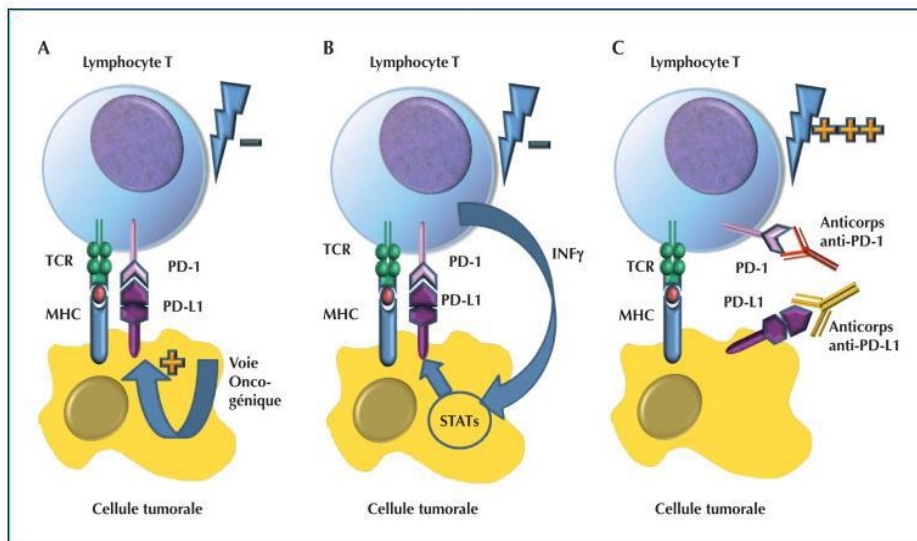


Figure 3 : Action des anti-PD1(9)

A : L'activation des voies de signalisation oncogénique entraîne la surexpression de PD-L1 à la surface de la cellule tumorale et empêche l'activation lymphocytaire.

B : L'environnement tumoral par des signaux inflammatoires (Interféron gamma) produits par la réponse immunitaire anti tumorale active les facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et empêche l'activation lymphocytaire par expression de PD-L1.

C : Les anticorps anti-PD1 empêchent l'inhibition de la voie PD1/PD-L1 en bloquant le récepteur PD1 et permettent l'activation du lymphocyte T.

Le nivolumab et le pembrolizumab sont les deux anticorps monoclonaux anti-PD1 disponibles sur le marché dans la prise en charge du mélanome avancé en première ligne de traitement, pour les patients non mutés *BRAF*. (5)

Le nivolumab a montré sa supériorité par rapport à la dacarbazine dans différents essais cliniques. En 2015, une étude a analysé 418 patients atteints de mélanome métastatique non muté *BRAF* et naïfs de traitements, randomisés en 2 groupes de traitement : nivolumab contre dacarbazine. Le taux de survie à 1 an était de 72,9 % dans le bras nivolumab versus 42,1% dans le bras dacarbazine (HR 0,42 ; $p < 0,001$). (10) Ces

données ont récemment été actualisées avec une médiane de survie non atteinte à 2 ans et un taux de survie à 2 ans de 58% (IC 95 % : 50-65).

3. Association ipilimumab et nivolumab

Différentes stratégies d'association d'anti-CTLA4 et d'anti-PD1 ou d'administration séquentielle sont également développées. L'association anti-CTLA4 (3 mg par kg toutes les 3 semaines pendant 4 cures) et anti-PD1 (1 mg par kg toutes les 3 semaines pendant 4 cures puis 3 mg par kg toutes les 2 semaines en entretien) a permis de rapporter des résultats spectaculaires dans un essai de phase 3 publié en 2015 avec une médiane de survie sans progression de 11,5 mois (95% IC, 8,9 à 16,7) dans le groupe combiné contre 2,9 mois (95% IC, 2,8 à 3,4) dans le groupe ipilimumab et 6,9 mois (95% IC, 4,3 à 9,5) dans le groupe nivolumab. (11) Ces résultats ont été récemment actualisés à 3 ans de suivie avec une médiane de la survie globale non atteinte pour l'association nivolumab et ipilimumab contre 37,6 mois dans le groupe nivolumab et 19,9 mois dans le groupe ipilimumab. La survie globale à 3 ans était de 58% dans le groupe nivolumab et ipilimumab, 52% dans le groupe nivolumab seul et 34% dans le groupe ipilimumab seul. (12)

Cependant, les interruptions de traitement pour toxicités de grade 3 ou 4 étaient beaucoup plus fréquentes dans la combinaison (59%) que dans les groupes nivolumab (21%) ou ipilimumab seul (28%). (12) La combinaison ipilimumab et nivolumab n'est disponible actuellement en France que dans le cadre d'essais cliniques de phase IIIb/IV.

L'arsenal thérapeutique du traitement du mélanome métastatique s'est donc considérablement développé ces dernières années. De véritables stratégies de traitement doivent être élaborées en utilisant les différentes molécules en séquentiel ou en association. La recherche de biomarqueurs se positionne donc dans ce contexte afin d'essayer d'identifier les patients répondeurs.

C. Définition d'un biomarqueur et problématique posée dans le contexte des immunothérapies

Un biomarqueur est une molécule biologique, comme une protéine ou un gène, mesurable dans les tissus, le sang ou d'autres fluides corporels qui sont un indicateur de certaines conditions cliniquement significatives. Un biomarqueur peut être diagnostique, substitutif, pronostique ou prédictif. Le biomarqueur est limité par sa sensibilité et sa spécificité. Les biomarqueurs prédictifs sont définis par leur rôle dans la prédiction d'une réponse à un traitement donné permettant d'optimiser l'efficacité ou la tolérance d'un traitement. Par conséquent, ils sont plus utiles s'ils peuvent être évalués avant le début du traitement. Notre étude porte sur les biomarqueurs prédictifs, qui sont les plus pertinents pour la prise de décision concernant l'immunothérapie.

Le besoin de biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie dans le mélanome avancé est identifié comme un objectif actuellement important. En effet, seul une partie des patients va répondre à ces nouveaux traitements : 15% pour l'ipilimumab (8) et 40% pour l'anti-PD1 (10) et 58% dans le cadre de l'association. (12)

Différentes approches thérapeutiques étant actuellement ou à l'avenir disponibles, les biomarqueurs pourraient être utilisés pour stratifier les patients. En effet, on peut émettre l'hypothèse que, dans un avenir proche, les patients dont la tumeur exprime un ou plusieurs biomarqueur(s) en faveur d'une réponse pourraient bénéficier d'un traitement par anti-PD1 seul. Pour les patients sans biomarqueurs prédictifs d'une réponse aux anti-PD1, une prise en charge plus agressive par une immunothérapie combinée pourrait alors être envisagée. Un problème de coût pourra également se poser à l'avenir, d'autant plus que ces immunothérapies se développent pour de nombreux cancers. (13)

Cependant, ces biomarqueurs doivent être spécifiques afin de ne pas exclure du traitement des patients qui pourraient être répondeurs.

D. Biomarqueurs connus pour l'anti-PD1

– revue de la littérature

A l'heure actuelle, aucun des biomarqueurs décrits dans la littérature n'a été validé pour être utilisé en pratique courante. La recherche de biomarqueurs s'est surtout concentrée sur l'histologie et plus particulièrement l'expression de PD-L1 dans la cellule tumorale.

I. L'expression de PD-L1

L'évaluation de l'expression de PD-L1 en intra tumoral est un biomarqueur prédictif logique de la réponse au traitement par anti-PD1. En effet, alors que l'ipilimumab agit sur la phase initiale d'activation lymphocytaire, la voie PD1 régule les réponses inflammatoires tissulaires liées aux cellules T effectrices qui ont reconnu leur antigène. Ces molécules du rétrocontrôle négatif sont exprimées par les lymphocytes T en état d'activation chronique. Les données initiales de l'étude de phase I sur l'utilisation du nivolumab chez les patients atteints de mélanome, de carcinome bronchique non à petites cellules, de carcinome de cellules rénales, de cancer de la prostate ou de cancer colorectal ont permis de mesurer l'expression de PD-L1 par la cellule tumorale en immunohistochimie sur des échantillons de biopsie tumorale.(14) Neuf (36%) des 25 patients ayant un PD-L1 positif ont montré une réponse objective au nivolumab versus aucun présentant un PD-L1 négatif. Des études ultérieures ont montré que les patients PD-L1 positif avaient une survie globale et une survie sans progression prolongée sous traitement par anti-PD1 en comparaison avec les patients PD-L1 négatifs : HR : 0,51 (IC 95% ; 0,40 à 0,65) pour la survie sans progression et 0,50 (IC 95% ; 0,37 à 0,67) pour la survie globale. (15) Bien que la positivité de PD-L1 au niveau intra-tumoral semble être corrélée à un bénéfice clinique, elle semble encore insuffisante et n'est pas validée d'un point de vue méthodologique. (cf. partie E)

II. Lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs)

L'infiltration lymphocytaire dans les échantillons de biopsie tumorale a été associée à une meilleure survie dans les études rétrospectives de patients ayant un mélanome. (16) Une densité plus importante de lymphocytes T CD8 avant traitement est présente au niveau de la bordure des tumeurs chez les patients répondeurs en comparaison aux non répondeurs chez les patients sous anti-PD1. (17,18)

III. Clonalité des lymphocytes T

Tumeh *et col.* ont également montré que les TILs des patients répondeurs aux anti-PD1 présentaient un répertoire étroit, focalisé sur une réponse immunitaire spécifique de la tumeur. Le groupe des patients répondeurs aux anti-PD1 présentait une population de lymphocytes intra tumoraux clonaux, moins diversifiée que chez les patients non répondeurs. De plus, des prélèvements biopsiques avant et après traitement ont montré une augmentation d'un facteur dix des clones de TILs après le traitement par anti-PD1 dans le groupe répondeur. (19)

IV. Charge mutationnelle et présence de néo antigènes.

Le mélanome est un cancer avec un fort caractère immunogénique, il présente une charge mutationnelle élevée via la production de néo-antigènes due aux mutations tumorales. La reconnaissance de ces néo-antigènes par les TILs représente un « pool » de cellules immunitaires effectrices avec une grande diversité antigénique, les plus à même de reconnaître les néo-antigènes exprimés par les cellules tumorales. Des études

précliniques ont identifié une charge mutationnelle élevée via la production de néo-antigènes comme biomarqueur prédictif chez les patients recevant de l'ipilimumab.(20) Une autre étude de 38 patients atteints de mélanome avancé ayant reçu un anti-PD1 a montré qu'une charge mutationnelle élevée était en corrélation avec une survie globale prolongée. Ces résultats suggèrent qu'une forte charge mutationnelle (ou la présence de néo antigènes) pourrait refléter l'activité anti-tumorale immunitaire et que celle-ci pourrait servir de marqueur prédictif.(21)

V. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est étudié depuis plusieurs années, il a d'abord été analysé sur des souris de même lignée mais élevées dans deux laboratoires différents et ayant un microbiote intestinal différent. Un groupe de souris répondait moins bien au traitement par antiPD-L1 à cause d'une réponse T effectrice diminuée. Les auteurs ont observé que la différence de réponse à l'anti-PD-L1 disparaissait en faisant cohabiter ces souris ou en réalisant un transfert fécal. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* auraient un rôle important dans cette modulation immunitaire anti tumorale.(22) Récemment des essais similaires ont été réalisés chez l'homme dans le traitement par ipilimumab, les malades présentant une flore riche en bactéries *Faecalibacterium* et autres Firmicutes ont une meilleure réponse au traitement que les patients dont le microbiote est riche en bactéries du type *Bacteroides*. (23) L'analyse du microbiote intestinal avant l'instauration d'une immunothérapie par anti-PD1 pourrait permettre comme cela a été le cas pour l'ipilimumab une prédiction de la réponse clinique.

E. Problème de ces biomarqueurs

La plupart de ces biomarqueurs déjà décrits sont histologiques, ce qui pose différents problèmes :

- D'un point de vue technique :
 - La biopsie tissulaire n'est pas possible chez tous les patients en raison du risque associé à certaines biopsies notamment profondes ou proches d'organes nobles.
 - Les résultats histologiques sont associés à un retard de prise en charge du à la méthode de prélèvement et au temps nécessaire de technique et d'analyse.
- La fiabilité de ces biomarqueurs histologiques est discutable:
 - Les tumeurs sont naturellement hétérogènes, ce qui implique qu'un échantillon histologique peut ne pas être représentatif de l'ensemble de la tumeur.
 - Les méthodes immunohistochimiques ne sont pas encore validées et homogénéisées entre les différents laboratoires. (24)

Pour le biomarqueur actuel le plus prometteur, PD-L1, la fiabilité semble insuffisante pour plusieurs raisons (25):

- PD-L1 peut également être exprimé par d'autres cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral.
- Son expression peut être transitoire.
- Il peut exister une hétérogénéité intra tumorale dans son expression.
- Les méthodes immunohistochimiques ne sont pas encore validées et homogénéisées entre les différents laboratoires. La valeur prédictive de PD-L1 dans les métastases du mélanome et la définition du seuil de positivité sont encore débattues. (24)

Il convient donc d'être prudent concernant les niveaux de mesure de PD-L1 qui n'est pour le moment pas un biomarqueur adéquat pour une utilisation clinique de routine afin de décider à quels patients administrer une thérapie anti-PD1. Il a été également observé chez les patients PD-L1 négatif que le bénéfice clinique avec les thérapies anti-PD1 existait. (15)

F. Biomarqueurs sanguins déjà connus

La recherche de biomarqueurs sanguins présente plusieurs intérêts. Il s'agit de biomarqueurs faiblement coûteux, faciles d'accès et peu invasifs. Les résultats de tels biomarqueurs sont disponibles rapidement après prélèvement sanguin et peuvent être intégrés facilement dans la pratique clinique quotidienne.

Les biomarqueurs sanguins que nous avons choisi ont été sélectionnés en se basant sur les données publiées pour les autres immunothérapies, notamment l'anti-CTLA4.

I. Avant traitement

Différents biomarqueurs prédictifs sanguins de réponse à l'immunothérapie en particulier pour l'anti-CTLA4 ont déjà été rapportés dans la littérature. En revanche, ceux pour les anti-PD1 ont été peu analysés.

- Un taux élevé de leucocytes, (26) un taux élevé de neutrophiles, (27,28) un rapport neutrophile/lymphocyte élevé ont été rapportés comme des biomarqueurs de survie globale plus courte chez les patients traités par ipilimumab pour un mélanome. (27,28)
- Un taux de monocytes faible avant le début du traitement est associé à une survie globale augmentée pour l'ipilimumab. (29)
- Un taux de CRP faible avant traitement a été noté chez les patients présentant une bonne réponse thérapeutique à l'ipilimumab (30) et au nivolumab. (31)
- Le nombre absolu élevé de lymphocytes et d'éosinophiles avant traitement ont été rapportés comme nouveaux biomarqueurs dans l'efficacité du pembrolizumab. (32)
- Un taux de lactate déshydrogénase (LDH) élevé avant traitement est un facteur de mauvais pronostic de la survie globale bien connu dans le mélanome de façon générale ainsi que pour le pembrolizumab (32), l'ipilimumab (29) et le nivolumab. (31)

- Les premières études avec l'ipilimumab ont rapporté une corrélation entre la survie globale et l'apparition d'effets secondaires auto-immuns sous ipilimumab. (33)
C'est la raison pour laquelle nous avons considéré dans ce travail le taux significatif d'anticorps antinucléaires chez nos patients traités par anti-PD1.

II. En cours de traitement

Pour certains biomarqueurs, leur évolution au cours du traitement a été analysée :

- Une diminution de la CRP lors du traitement a été décrite chez les patients présentant une réponse thérapeutique à l'ipilimumab. (34)
- Une amélioration de la survie globale a été retrouvée chez les patients présentant une augmentation du taux de lymphocytes CD8 et CD4 durant le traitement sous ipilimumab. (35)
- Une augmentation du nombre d'éosinophiles ont été associées à une survie prolongée pour l'anti-CTLA4 mais aussi pour les anti-PD1. (36)
- Une augmentation du taux de lymphocytes durant le traitement par nivolumab sont associées à une survie augmentée. (31)

Objectif de l'étude

Notre objectif était d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs sanguins prédictifs d'une réponse thérapeutique au nivolumab en termes de survie globale et de survie sans progression dans le mélanome avancé.

Matériel et méthodes

Patients:

Nous avons réalisés une étude rétrospective monocentrique au sein du CHU de Nantes. Les patients étaient identifiés grâce à la cohorte nationale de patients atteints de mélanome: Réseau pour la Recherche et l'Investigation Clinique sur le mélanome (RIC-Mel). (37)

Les critères d'inclusion étaient :

- Un âge supérieur à 18 ans.
- Un mélanome de stade AJCC (American Joint Committee on Cancer) III non résécable ou IV prouvé histologiquement.
- Un traitement par nivolumab débuté entre le 26 juin 2013 et le 6 janvier 2016.

Les critères d'exclusion étaient :

- L'absence d'échantillon de sang périphérique documenté dans les 2 mois précédant le traitement par nivolumab.
- Un événement indésirable de grade 3 ou 4 de la classification « Common Terminology Criteria for Adverse Events » (CTCAE) (38) attribué au traitement par nivolumab conduisant à son arrêt pour l'analyse de la survie sans progression.
- Un traitement anticancéreux autre reçu durant la période de suivi.

Tous les participants ont fourni un consentement éclairé et écrit pour l'utilisation de leurs données cliniques et biologiques à des fins de recherche scientifiques lors de leur inclusion dans la cohorte RIC-Mel.

Schéma thérapeutique

Le nivolumab a été administré par voie intraveineuse à la dose de 3 mg/kg toutes les 2 semaines, conformément aux données de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Données épidémiologiques

Les données recueillies pour chaque patient étaient le sexe, la date de naissance, les caractéristiques de la tumeur primitive (type histologique, indice de Breslow, index mitotique, ulcération et mutation *BRAF*), le stade AJCC et la ou les ligne(s) thérapeutique(s) antérieure(s) reçue(s).

Données biologiques

Pour chaque patient inclus, un prélèvement biologique réalisé dans les 2 mois précédant le début du traitement par nivolumab était analysé. Lorsque plusieurs échantillons de sang étaient présents, le plus récent était sélectionné. Les analyses provenaient pour la majorité du laboratoire d'analyse d'hématologie et de biochimie du CHU de Nantes, les autres avaient été réalisées dans des laboratoires d'analyse de ville. A partir de ces prélèvements sanguins, 13 variables étaient recueillies : le nombre de leucocytes, le nombre de lymphocytes, le rapport leucocyte/lymphocyte, le nombre de neutrophiles, le rapport neutrophile/lymphocyte, le nombre de lymphocytes CD4, le nombre de lymphocytes CD8, le rapport lymphocytaire CD4 / CD8, le nombre d'éosinophiles, le nombre de monocytes, le taux de LDH, de CRP et des anticorps anti-nucléaires.

Méthode d'évaluation

Tous les patients bénéficiaient d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien et cérébral avant le début du traitement puis tous les deux mois pendant le traitement. La réponse thérapeutique était définie en fonction des critères RECIST (critères d'évaluation de la réponse dans les tumeurs solides). (39) Les mesures RECIST ont été recueillies pour chaque imagerie par scanner. Selon les mesures, la maladie était classée en «progression» (augmentation $\geq$ à 20%) ou «non progression». Les patients non progressseurs étaient définis comme «stable» (diminution $\leq$ à 30% et $\leq$ à 20% d'augmentation de RECIST), en «rémission partielle» (diminution $\geq$ à 30% de RECIST) ou en «rémission complète» (résolution complète des lésions macroscopiques).

Suivi des patients en rémission complète

Tous les patients jugés comme ayant une «réponse complète» au traitement bénéficiaient d'une tomographie par émission de positons (PET-scanner) et d'un scanner cérébral. Ces examens étaient répétés à 3 mois afin de vérifier la poursuite de la rémission complète. Le traitement était alors interrompu et une surveillance trimestrielle par PET-scanner et TDM cérébrale était alors ensuite effectuée pendant au moins un an.

Critère de jugement principal

La survie globale, le critère de jugement principal était défini comme le nombre de jours entre la première dose de nivolumab et la date de décès. Lorsque le décès n'était pas observé, la survie globale était le nombre de jours entre la première dose de nivolumab et la date de l'analyse, le 15 avril 2016.

Critère de jugement secondaire

La survie sans progression, le critère de jugement secondaire était défini comme le nombre de jours entre la première dose de nivolumab et la date de progression radiologique ou le décès. Lorsque la progression de la maladie ou le décès n'étaient pas observés, la survie sans progression était le nombre de jours entre la première dose de nivolumab et la date de l'analyse, le 15 avril 2016.

Nous n'avons pas eu de patient perdu de vue lors de cette analyse.

Statistiques

Les variables quantitatives étudiées ont été présentées avec leur moyenne, minimum, maximum et médiane et les variables qualitatives en terme d'effectifs. La survie globale et la survie sans progression ont été calculées pour chaque patient. Une analyse monovariée a été effectuée selon le modèle de Cox pour estimer l'association entre chaque biomarqueur avec la survie globale et la survie sans progression avec des intervalles de confiance de 95%. Pour les analyses multivariées, les données ont été ajustées en fonction du stade AJCC, du niveau de LDH et de l'existence ou non d'une ligne thérapeutique antérieure. Ensuite, les analyses ont été effectuées à l'aide d'un modèle de Cox en multivarié pour la survie globale et la survie sans progression. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de la version 3.12 du logiciel statistique R. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Patients

Quatre-vingt-sept patients ont été inclus pour l'analyse en survie globale. Dans l'analyse en survie sans progression, quatre-vingt-quatre patients ont été analysés, trois ont été exclus en raison d'effets secondaires de grade 3 ou 4. Concernant les effets secondaires sévères, il s'agissait d'une toxidermie bulleuse, d'une pneumopathie auto-immune et de l'apparition d'un bloc auriculo-ventriculaire de grade III.

Les données épidémiologiques et les caractéristiques des tumeurs primitives sont présentées dans le tableau 1. L'âge médian était de 71 ans, 48 patients étaient des hommes. L'épaisseur moyenne de Breslow était de 4,03 mm. L'ulcération a été observée chez 24 patients (28%). Le type histologique était un mélanome superficiel extensif dans 30% des cas (n=26), nodulaire dans 20% (n=17), muqueux dans 11% (n=10), acrolentigineux dans 9% (n=8), choroïdien dans 3% (n=3) et d'autres types dans 5% (mélanome sur naevus congénital (n=1), desmoplastique (n=1), mélanome sur naevus spitzoïde (n=2)). Cinq pour cent des participants (n=4) avaient un type de tumeur non classable et 12% avaient un primitif inconnu (n=10). Les données histologiques étaient absentes pour 5 patients lors de la découverte du mélanome métastatique. La mutation *BRAF* était présente chez 30% (n=26). Pour 33 patients (38%), le nivolumab était la première ligne de traitement. Les autres patients avaient reçu en première ligne un inhibiteur de BRAF dans 17 % des cas (n = 15), une combinaison inhibiteur de MEK et inhibiteur de BRAF dans 2 % (n = 2), de l'ipilimumab dans 31 % des cas (n = 27), de la dacarbazine dans 8 % des cas (n = 7) et un traitement par dacarbazine et carboplatine chez 5 % des patients (n = 4).

La survie globale médiane était de 225 jours (Ecart type : 100 jours) et la survie sans progression médiane était de 157 jours (Ecart type : 115 jours). Une progression de la maladie sous traitement par nivolumab a été observée chez 42 patients (48%). Dix-neuf patients sont morts durant le suivi. Au moment de l'analyse des données, 42 patients

étaient considérés comme «non progresseurs», dont 9 étaient considérés comme ayant une « réponse complète » au traitement. Le suivi moyen était de 227 jours.

Tableau 1: Données épidémiologiques.

Caractéristiques	Valeurs
Nombre de patients	87
Age moyen, années (min-max)	71 (27-92)
Homme, <i>n</i> (%)	48 (55)
Stade AJCC, <i>n</i> (%)	
IIIC	6 (7)
IV	81 (93)
Breslow, médiane (ET)	4.03 (3.05)
Ulcération, <i>n</i> (%)	
Oui	24 (28)
Non	29 (33)
Non connue	34 (39)
Index mitotique, <i>n</i> (%)	
>1/ mm ²	21 (25)
<1/mm ²	5 (6)
Non connu	60 (69)
Mutation <i>BRAF</i> , <i>n</i> (%)	
Non	59 (68)
Oui	26 (30)
Non connue	2 (2)
Ligne antérieure de traitement,	54 (62)
Ipilimumab	27 (31)
Anti- <i>BRAF</i>	15 (17)
Anti- <i>BRAF</i> + anti-MEK	2 (2)
Dacarbazine	7 (8)
Dacarbazine + carboplatine	4 (5)
Taux de LDH initial, <i>n</i> (%)	
Valeur normale	44 (51)
>LSN	33 (38)
CRP avant traitement, <i>n</i> (%)	
Normal-2LSN	37 (42)
>2LSN	16 (18)

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

LDH: lactate déshydrogénase.

LSN: Limite supérieure de la normale

CRP: Protéine C réactive

Données biologiques.

Les données biologiques comportaient : le nombre de leucocytes, de lymphocytes, de lymphocytes T CD4, de lymphocytes T CD8, de polynucléaires neutrophiles, de monocytes, d'éosinophiles, le rapport lymphocytaire CD4/CD8, le rapport leucocytes/lymphocytes, le rapport neutrophiles/lymphocytes, les taux de lactate déshydrogénase, d'anticorps antinucléaires et de protéine C-réactive. Une description de ces valeurs est faite dans le tableau 2 avec le nombre de données possible pour chaque valeur, la médiane, la valeur maximum et minimum.

Tableau 2: Données biologiques

Données biologiques	Données disponibles	Moyenne [Minimum ; Maximum]	Médiane
Leucocytes ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	87	7,48 [1,70 ; 25]	6,93
Lymphocytes ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	86	1,47 [0,54 ; 2,92]	1,39
Lymphocytes CD4 ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	38	0,77 [0,37 ; 1,85]	0,69
Lymphocytes CD8 ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	38	0,38 [0,12 ; 0,94]	0,33
Rapport CD4/CD8	38	2,38 [0,75 ; 5,77]	2,23
Rapport leucocyte/lymphocyte	86	5,77 [1,34 ; 27,73]	4,72
Neutrophiles ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	86	5,30 [0,85 ; 20,75]	4,57

Rapport neutrophile/lymphocyte	86	4,23 [0,94 ; 24,15]	3,23
Monocytes ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	86	0,62 [0,17 ; 1,88]	0,57
Eosinophiles ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	86	0,16 [0 ; 1,25]	0,11
Lactate déshydrogénase ($\mu\text{kat/L}$)	77	4,30 [2 ; 18,22]	3,48
Protéine C-réactive (mg/L)	53	20,82 [0 ; 295]	0
Anticorps antinucléaires (dilution)	28	1/332 [0 ; 1/2560]	1/16

Analyse monovariée

Survie globale (Tableau 3)

En analyse monovariée, nous avons retrouvé une relation statistiquement significative entre la diminution de la survie globale et l'augmentation des leucocytes (HR 1.13, $P = 0.01$), l'augmentation des neutrophiles (HR 1.16, $P = 0.01$), l'augmentation du rapport neutrophile/lymphocyte (HR 1.08, $P = 0.01$), l'augmentation du nombre de monocytes (OR 4.31, $P = 0.01$), l'augmentation de la CRP (HR 1.01, $P = 0.01$), l'augmentation du taux de LDH (OR 1.31, $P = 0.01$), l'augmentation des anticorps anti-nucléaires (HR 1.01, $P = 0.01$) et l'augmentation du rapport leucocyte/lymphocyte (HR 1.11, $P = 0.01$). Un taux élevé d'éosinophiles (HR 0.01, $P = 0.04$) était le seul biomarqueur significativement associé à l'augmentation de la survie globale. Le taux de lymphocytes totaux, lymphocytes CD4, CD8 et le rapport lymphocyte CD4/CD8 n'étaient pas significativement prédictifs de la survie globale en monovariée.

Tableau 3 : Association entre l'analyse monovariée et la survie globale.

Données biologiques	Hazard ratio [IC 95%]	P
Leucocytes	1,13 [1,06 ; 1,22]	0,01
Lymphocytes	0,65 [0,27 ; 1,57]	0,34
Lymphocytes CD4	0,41 [0,36 ; 4,77]	0,48
Lymphocytes CD8	6,58 [0,38 ; 112,6]	0,19
Rapport CD4/CD8	0,46 [0,2 ; 1,05]	0,07
Rapport leucocyte/lymphocyte	1,11 [1,04 ; 1,17]	0,01
Neutrophiles	1,16 [1,08 ; 1,26]	0,01
Rapport neutrophile/lymphocyte	1,08 [1,02 ; 1,15]	0,01
Monocytes	4,31 [1,46 ; 12,74]	0,01
Eosinophiles	0,01 [0,01 ; 0,86]	0,04
Lactate déshydrogénase	1,31 [1,18 ; 1,45]	0,01
Protéine C-réactive	1,01 [1,01 ; 1,02]	0,01
Anticorps anti-nucléaires	1,01 [1; 1,01]	0,01

IC : Intervalle de confiance

Survie sans progression (Tableau4)

En analyse monovariée, nous avons retrouvé une relation statistiquement significative entre la diminution de la survie sans progression et l'augmentation du taux de LDH (HR 1.25, P = 0.01), l'augmentation du nombre de neutrophiles (HR 1.18 P = 0.01), l'augmentation du rapport neutrophile/lymphocyte (HR 1.09, P=0.01), l'augmentation

du nombre de monocytes (OR 6.33, P=0.01), l'augmentation du nombre de leucocytes (HR 1.16, P = 0.01), l'augmentation de la CRP (HR 1.01, P=0.01), l'augmentation du nombre de lymphocytes CD8 (HR 13.83, P=0.01) et l'augmentation de rapport leucocyte/lymphocyte (HR 1,2, P = 0,01). Le taux élevé de CD4 / CD8 (HR 0.44, P = 0,01) était le seul biomarqueur significativement associé à l'augmentation de la survie sans progression. Les 4 autres biomarqueurs n'étaient pas significativement prédictifs de la survie sans progression.

Tableau 4 : Association entre l'analyse monovariée et la survie sans progression

Données biologiques	Hazard ratio [IC 95%]	P
Leucocytes	1,16 [1,07 ; 1,24]	0,01
Lymphocytes	0,73 [0,39 ; 1,38]	0,33
Lymphocytes CD4	0,45 [0,08 ; 2,43]	0,36
Lymphocytes CD8	13,83 [1,90 ; 100,7]	0,01
Rapport CD4/CD8	0,44 [0,24 ; 0,8]	0,01
Rapport leucocyte/lymphocyte	1,2 [1,1 ; 1,30]	0,01
Neutrophiles	1,18 [1,1 ; 1,27]	0,01
Rapport neutrophile/lymphocyte	1,09 [1,03 ; 1,14]	0,01
Monocytes	6,33 [2,4 ; 16,69]	0,01
Eosinophiles	0,24 [0,02 ; 3,87]	0,32
Lactate déshydrogénase	1,25 [1,13 ; 1,38]	0,01
Protéine C-réactive	1,01 [1,01 ; 1,02]	0,01
Anticorps anti-nucléaires	1 [0,99 ; 1]	0,16

IC : Intervalle de confiance

Analyse multivariée

Les analyses multivariées ont été réalisées après ajustement sur le stade AJCC, le niveau de LDH et de l'existence ou non d'une ligne thérapeutique antérieure.

Survie globale (Tableau 5)

Nous retrouvons une association statistiquement significative entre une diminution de la survie globale et une augmentation du nombre de leucocytes (HR 1.13, P = 0.04), du nombre de neutrophiles (HR 1.14, P = 0.03), une augmentation du rapport neutrophile/lymphocyte (OR 1.1, P = 0,04), une augmentation de rapport leucocyte/lymphocyte (HR 1.1, P = 0.03) et une augmentation du nombre de monocytes (HR 4.02, P = 0,04). Il n'était pas retrouvé de lien statistiquement significatif entre la survie globale et les biomarqueurs suivants en analyse multivariée: taux d'éosinophiles, de CRP et d'anticorps anti-nucléaires.

Tableau 5 : Association entre l'analyse multivariée et la survie globale.

Données biologiques	Hazard ratio [CI 95%]	P
Leucocytes	1,13 [1,01 ; 1,28]	0,04
Rapport leucocyte/lymphocyte	1,1 [1,01 ; 1,21]	0,03
Neutrophiles	1,14[1,02 ; 1,29]	0,03
Rapport neutrophile/lymphocyte	1,1 [1,01 ; 1,2]	0,04
Monocytes	4,02 [1,1 ; 14,71]	0,04
Eosinophiles	0,04 [0,01 ; 18,49]	0,31

Protéine C réactive	0,99 [0,97 ; 1,01]	0,25
Anticorps anti-nucléaires	1,01 [1 ; 1,01]	0,48

IC : Intervalle de confiance

Survie sans progression (Tableau 6)

D'après nos résultats, nous retrouvons une relation statistiquement significative entre une diminution de la survie sans progression et une augmentation du nombre de neutrophiles (HR 1.13, P = 0.01), une augmentation du rapport neutrophile/lymphocyte (HR 1.1, P = 0,01), une augmentation de rapport leucocyte/lymphocyte (HR 1.12, P = 0.03) et une augmentation du nombre de monocytes (HR 4.06, P = 0,02).

Il n'était pas retrouvé de lien statistiquement significatif entre la survie sans progression et les biomarqueurs suivants en analyse multivariée: taux de lymphocytes CD8, rapport lymphocyte CD4/CD8 et la CRP.

Tableau 6 : Risque relatif entre l'analyse monovariée et la survie sans progression

Données biologiques	Hazard ratio [IC 95%]	P
Leucocytes	1,1 [0,99 ; 1,21]	0,06
Lymphocyte CD8	0,32 [0,19 ; 5,63]	0,44
Rapport CD4/CD8	0,68 [0,38 ; 1,22]	0,20
Rapport leucocyte/lymphocyte	1,12 [1,01 ; 1,24]	0,03
Neutrophiles	1,13 [1,03 ; 1,24]	0,01
Rapport neutrophile/lymphocyte	1,1 [1,04 ; 1,17]	0,01
Monocytes	4,06 [1,2 ; 13]	0,02
Protéine C-réactive	1,01 [0,99 ; 1,01]	0,20

IC : Intervalle de confiance.

Tableau 7: Récapitulatif de l'ensemble des résultats

Donnée biologiques	Type d'étude	Hazard ratio [IC 95%] pour SSP	P pour AU	Hazard ratio [IC 95%] pour SG	P pour AM
Taux de leucocytes	monovariée	1.16 [1.07; 1.24]	0.01*	1.13 [1.06; 1.22]	0.01*
	multivariée	1.1 [0.99; 1.21]	0.07	1.13 [1.01; 1.28]	0.04*
Taux de lymphocytes	monovariée	0.73 [0.39; 1.38]	0.33	0.65 [0.27; 1.57]	0.34
	multivariée	0.62 [0.31; 1.24]	0.18	0.92 [0.3; 2.78]	0.88
Lymphocytes CD4	monovariée	0,45 [0,08 ; 2,43]	0,36	0,41 [0,36 ;4,77]	0,48
	multivariée				
Lymphocytes CD8	monovariée	13,83[1,90;100,7]	0,01*	6,58[0,38;112,6]	0,19
	multivariée	0,32 [0,19 ; 5,63]	0,44		
Rapport lymphocytes CD4/CD8	monovariée	0,44 [0,24 ;0,8]	0,01*	0,46 [0,2 ; 1,05]	0,07
	multivariée	0,68[0,38;1,22]	0,2		
Ratio leucocyte/lymphocyte	monovariée	1.2 [1.1; 1.30]	0.01*	1.11 [1.04;1.17]	0.01*
	multivariée	1.12[1.01;1.24]	0.03*	1.1 [1.01; 1.21]	0.03*
Taux de neutrophile	monovariée	1.18 [1.1; 1.27]	0.01*	1.16 [1.08;1.26]	0.01*
	multivariée	1.13[1.03;1.24]	0.01*	1.14[1.02; 1.29]	0.03*
Ratio neutrophile /lymphocyte	monovariée	1.09[1.03;1.14]	0.01*	1.08 [1.02; 1.15]	0.01*
	multivariée	1.1 [1.04; 1.17]	0.01*	1.1 [1.01; 1.2]	0.04*
Taux de monocyte	monovariée	6.33[2.4;16.69]	0.01*	4.31[1.46;12.74]	0.01*
	multivariée	4.06[1.2;13,71]	0.02*	4.02 [1.1; 14.71]	0.04*
Taux d'eosinophile	monovariée	0.24[0.02;3.87]	0.32	0.01 [0.01; 0.86]	0.04*
	multivariée	0.04[0.01;1.64]	0.09	0.04[0.01;18.49]	0.31
Taux de LDH	monovariée	1.25[1.13;1.38]	0.01*	1.31 [1.18; 1.45]	0.01*
	multivariée	Facteur d'ajustement			
Taux de CRP	monovariée	1.01[1.01;1.02]	0.01*	1.01 [1.01; 1.02]	0.01*
	multivariée	1.01 [1; 1.01]	0.20	0.99 [0.97; 1.01]	0.25

Anticorps anti-nucléaires	monovariée	1 [0,99 ; 1]	0,16	1,01 [1; 1,01]	0,01*
	multivariée			1,01 [1 ; 1,01]	0,48

IC : Intervalle de confiance.

AU : Analyse univariée.

AM : Analyse multivariée.

DISCUSSION

Contrairement à l'ipilimumab, peu d'études existent concernant les biomarqueurs prédictifs sanguins avant traitement par anti-PD1 dans le mélanome avancé. En effet, les études antérieures se sont focalisées sur la recherche de biomarqueurs histologiques prédictifs de la réponse aux anti-PD1. Cette démarche se justifie par le fait que les anti-PD1 régulent les réponses immunitaires liées aux cellules T effectrices activées de façon chronique.

Nous sommes donc partis à contre-courant des recherches actuelles pour nous intéresser aux biomarqueurs sanguins dans les anti-PD1 en réalisant cette étude rétrospective monocentrique sur quatre-vingt-sept patients.

En analyse monovariée et multivariée pour la survie globale et la survie sans progression, nous retrouvons qu'un taux élevé du nombre de neutrophiles, du rapport neutrophile/lymphocyte, du rapport leucocyte/lymphocyte et du nombre de monocytes sont associés à un mauvais pronostic chez les patients traités par anti-PD1. Le nombre de leucocytes est également associé à un mauvais pronostic en terme de survie globale en analyse mono- et multivariée.

A. Comparaison de nos résultats avec la littérature

I. Analyse monovariée

Pour la survie globale et la survie sans progression

Association entre un taux élevé de LDH et un mauvais pronostic (survie globale et survie sans progression diminuées)

Cette relation est retrouvée dans de nombreuses études et ce biomarqueur est bien connu comme facteur de mauvais pronostic dans le mélanome métastatique, indépendamment de tout traitement.(40,41) Comme dans notre étude, un taux de LDH élevé avant traitement a été rapporté comme un facteur de mauvaise réponse au traitement par ipilimumab (31) mais également par anti-PD1, que ce soit le nivolumab (27,42), ou le pembrolizumab.(32)

Association entre un taux élevé de CRP et un mauvais pronostic (survie globale et survie sans progression diminuées)

Cette association a également déjà été rapportée chez les patients ayant une survie globale plus courte avant traitement par nivolumab (27) ou ipilimumab.(26,43) Dans l'étude de Nakamura *et al.*, 46 patients ayant un taux de CRP normal ont été comparés à 49 patients ayant un taux augmenté. Un HR de 0.42, (95%IC 0.23-0.77, P=0.004) a été retrouvé en survie globale. Cette association a aussi été rapportée lors de l'augmentation pendant le traitement du taux de CRP. (43)

Pour la survie globale seulement

Association entre un taux d'éosinophile augmenté et une survie globale augmentée.

Le taux d'éosinophiles sanguins en prétraitement est retrouvé pour le pembrolizumab (32) et l'ipilimumab (31) et est connu pour être un facteur de bon pronostic lorsqu'il augmente en cours de traitement par immunothérapie. (33)

Pour la survie sans progression seulement

Association entre un taux de lymphocytes CD8 augmenté et une survie sans progression diminuée.

Cette association n'a jamais été rapportée dans la littérature avant traitement par anti-PD1. En revanche, contrairement à notre résultat, une augmentation du taux de lymphocytes CD8 en cours de traitement est associée à un bon pronostic pour les patients traités par ipilimumab (36). De plus, Tume et al. ont montré qu'une infiltration de lymphocytes CD8 péri-tumoraux est un biomarqueur pronostique pour une survie augmentée dans le traitement par anti-PD1. (4)

Toutefois, nos résultats sont à considérer avec prudence car d'une part, l'analyse pour cette donnée a été faite sur 38 patients (39 données manquantes) et d'autre part, cette association n'est pas retrouvée avec la survie globale.

Association entre un rapport de CD4/CD8 augmenté et une survie sans progression augmentée.

Cette relation n'a pas été réalisée dans la littérature. Cette relation est seulement retrouvée en analyse monovariée pour la survie sans progression et elle présente de nombreuses données manquantes.

Relation rapportée dans la littérature et non retrouvée dans notre analyse

Une association entre un taux de lymphocytes augmentés avant traitement et une survie globale augmentée a été rapportée chez les patients traités par ipilimumab (31) et pembrolizumab (32) mais n'est pas retrouvée dans notre étude.

II. Appariement pour l'analyse multivariée

L'analyse en multivariée a été appariée sur différentes valeurs ;

LDH: Ce biomarqueur est bien connu dans le mélanome pour être de mauvais pronostic indépendamment de tout traitement. (40,41) Un taux de LDH élevé avant le traitement a été signalé comme un facteur de mauvaise réponse au traitement par nivolumab (27,42), ipilimumab (31) ainsi que pour le pembrolizumab. (32)

Ceci est dû au fait que les concentrations sériques élevées de LDH influent sur le blocage du CTLA4 et du PD1 en diminuant le pH local et nuit ainsi aux fonctions des lymphocytes et de leurs activités lytiques anti tumorales. (45) L'analyse en monovariée pour la survie sans progression et la survie globale retrouve cette association.

Stade AJCC: La stadification du mélanome est un marqueur de pronostic évident de l'évolution de la maladie. Malheureusement, dans notre étude, nous ne disposions pas du détail des stades IV, notamment pour les métastases cérébrales.

Lignes antérieures de traitement: Elles ne sont pas connues comme ayant une influence sur l'évolution de la maladie mais peuvent modifier les différentes valeurs biologiques initiales. Néanmoins les patients n'étaient pas appariés en fonction du type de traitement antérieur.

III. Analyse en multivariée

Pour la survie globale et la survie sans progression

Association entre le nombre de neutrophiles et rapport neutrophile / lymphocyte augmentés et un mauvais pronostic (survie globale et survie sans progression diminuées)

Un taux élevé de ces 2 biomarqueurs est retrouvé dans le mélanome métastatique avant traitement par ipilimumab comme associé à une diminution de la survie globale (29,30) mais aussi de façon plus globale pour les cancers. (46)

Association entre le nombre de monocytes augmenté et une survie globale et sans progression diminuée.

Dans une étude incluant XX patients traités par ipilimumab, un taux de monocyte $\geq 650/\mu\text{L}$ en prétraitement était associé à une survie globale plus courte en comparaison aux patients ayant un taux de monocytes $< 650/\mu\text{L}$ (OR à 2.2 (P=0.0001)) (31)

Association entre le rapport leucocytes/lymphocytes augmenté et une survie globale et sans progression diminuée.

Il s'agit de la première étude à évaluer le ratio leucocyte/lymphocyte comme biomarqueur pronostique pour l'immunothérapie.

Pour la survie globale seulement

Association entre le taux de leucocytes augmenté et une survie globale diminuée.

Cette relation a déjà été décrite avec l'ipilimumab comme associée à une mauvaise survie globale.(28)

B. Hypothèses physiopathologiques

I. La réponse inflammatoire, marqueur prédictif négatif

Les biomarqueurs de l'inflammation cellulaire pourraient être des marqueurs intéressants dans le cadre du traitement par immunothérapie. En effet, la littérature actuelle suggère une relation intime entre l'inflammation chronique et le microenvironnement tumoral (48) notamment via les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6) et les chimiokines.(49) Ces marqueurs de l'inflammation pourraient favoriser la progression tumorale et la mauvaise réponse immunitaire.

Le nombre de neutrophiles et le rapport neutrophile/lymphocyte : l'augmentation des neutrophiles et la lymphopénie sont une des conséquences de l'inflammation systémique. Le rapport neutrophile/lymphocyte décrit les changements dynamiques de ces 2 biomarqueurs. Cette association a déjà été étudiée dans les cancers solides (46) ainsi que pour les lymphomes (50). Cette association est également connue dans le mélanome indépendamment des traitements reçus (51) et aussi pour l'ipilimumab (29,30).

Le nombre de monocytes : bien que moins étudié, celui-ci est également lié à une inflammation chronique et a déjà été retrouvé comme biomarqueur de mauvais pronostic pour d'autres cancers. (52,53)

II. Le taux de lymphocytes, marqueur prédictif positif

Les lymphocytes sont également essentiels dans la réponse à l'immunothérapie, en tant que cibles directes des anticorps monoclonaux anti-CTLA4 et anti-PD1. Une concentration élevée de lymphocytes avant traitement et une augmentation pendant le traitement sont associées à une survie globale augmentée pour l'ipilimumab et le pembrolizumab. (32)(54) Bien que ces résultats ne soient pas retrouvés directement dans notre étude, ils ne sont pas discordants avec celle-ci. En effet, les rapports leucocyte/lymphocyte et neutrophile/lymphocyte font tous les deux appels aux lymphocytes dans leurs dénominateurs.

Lorsque ces biomarqueurs sont augmentés (leucocyte/lymphocyte et neutrophile/lymphocyte), il s'agit également en partie d'une baisse relative des lymphocytes et/ou d'une absence d'augmentation des lymphocytes. De façon indirecte, nos résultats suggèrent qu'une absence d'augmentation du nombre de lymphocytes est associée à une diminution de la survie.

III. Les lymphocytes CD8 sanguins

L'analyse a également révélé une relation significative entre l'augmentation du nombre de lymphocytes CD8 et la diminution de la survie sans progression. À l'inverse, un ratio CD4/CD8 élevé qui peut se traduire également par un taux faible ou une augmentation insuffisante des CD8 était associé à une survie sans progression prolongée. Ces résultats complètent l'observation de Tumeh et al., qui ont montré que les lymphocytes CD8 péri-tumoraux représentent un biomarqueur pronostique pour une survie augmentée dans le traitement par anti-PD1. (4) Notre étude est la première à identifier le taux de lymphocytes CD8 sanguins comme biomarqueur potentiel pour les anticorps anti-PD1. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution et devront être confirmés car nous avons de nombreuses données manquantes pour l'analyse des lymphocytes CD8.

Points forts de cette étude

Les points forts de notre étude étaient :

- L'inclusion exhaustive de l'ensemble des patients de notre centre permise par la cohorte Ric-Mel.
- L'ajustement de l'analyse multivariée sur des indicateurs pronostiques connus tels que le stade AJCC et le taux de LDH afin de minimiser les facteurs confondants.
- L'homogénéisation de la méthode d'évaluation avec le calcul du RECIST pour l'ensemble des patients.
- La double analyse réalisée : l'une en survie globale, le critère de jugement principal qui est le critère d'évaluation de choix pour les immunothérapies et l'autre en survie sans progression comme critère de jugement secondaire pour plusieurs raisons :
 - Tout d'abord les patients pouvaient avoir reçu auparavant de multiples traitements. La survie sans progression permet d'étudier le nivolumab seul et de limiter l'impact des différentes lignes de traitements antérieures.
 - Les patients progressant sous nivolumab pouvaient également bénéficier d'autres traitements par la suite modifiant donc la survie globale. La survie sans progression permet de limiter l'influence des traitements ultérieurs sur les résultats.
 - La survie sans progression est le critère de choix pour les études avec un suivi court et de faibles populations comme cela a été le cas dans notre étude.

Points faibles de cette étude

Cette étude présente néanmoins un certain nombre de faiblesses :

- La généralisation des résultats est limitée car les patients ont été traités uniquement dans notre centre.
- Le nombre de patients était modeste en raison de la récente AMM du nivolumab datant de septembre 2015 ce qui diminue la puissance de cette étude.
- La collecte des données est rétrospective et la présence de données manquantes pose problème notamment pour les LDH qui était l'un des facteurs d'ajustement, de ce fait la puissance statistique de notre analyse a perdu lors de l'analyse en multivariée pour laquelle nous ne disposons pas de 10 taux de LDH avant le traitement par nivolumab. Cela peut être une piste pouvant expliquer en partie pourquoi un certain nombre de valeurs (nombres de leucocytes, de CD8, rapport CD4/CD8, éosinophiles et CRP) se sont révélées statistiquement significatives uniquement en analyse monovariée.
- Nous ne disposons pas du score OMS ni du détail pour les stades IV concernant les métastases cérébrales, cela représente des facteurs confondants importants qui n'ont pas pu être appariés.
- Les résultats des biologies peuvent varier en fonction du traitement reçu avant le nivolumab ou l'ipilimumab, les patients n'étaient pas appariés en fonction du type de traitement mais en fonction de l'existence ou non d'une ligne thérapeutique antérieure.

Cette étude pourrait être complétée facilement par une seconde analyse de la survie pour compléter nos résultats à plus long terme. Cela permettrait d'avoir plus de précision sur la durée de survie des patients.

Avenir des biomarqueurs

Les biomarqueurs actuels

Peu de biomarqueurs prédictifs sanguins ont été étudiés dans la littérature pour les anti-PD1 à l'inverse de l'anti-CTLA4. Les propositions actuelles de biomarqueurs sont principalement histologiques avec la présence de PDL1 en intra tumoral ou la présence d'un infiltrat lymphocytaire en péri tumoral. Ces biomarqueurs nécessitent une biopsie tissulaire et sont donc associés à un certain nombre d'inconvénients (prélèvements pouvant être à risque, retard diagnostique...). Ces biomarqueurs sont d'autant plus complexes qu'il n'existe actuellement pas de valeur seuil ni de méthodes immunohistochimiques validées en particulier pour le PDL1.

Le biomarqueur du futur

La recherche d'un biomarqueur optimal doit intégrer des éléments multiples et non pas se cantonner au niveau histologique ou sanguin uniquement. Ceci est proposé dans le concept récent d'« immunogramme du cancer » (Figure 1). (55) Il s'agit de sept paramètres pouvant caractériser les aspects de l'immunité contre le cancer et les interactions pour lesquelles des biomarqueurs ont été identifiés ou sont plausibles tels que:

- La charge mutationnelle.
- Le statut immunitaire général avec au premier plan le nombre de lymphocytes mais aussi le ratio neutrophile/lymphocyte.
- L'infiltration de lymphocytes T intra tumoraux.
- L'absence de marqueurs intra tumoraux histologiques de PDL1.
- La présence de marqueur de l'inflammation tel que l'IL-6 et la CRP avec la présence de neutrophiles et de macrophages.

- L'absence de métabolisme tumoral inhibiteur avec les LDH.
- La sensibilité tumorale à l'immunothérapie (expression du CMH, sensibilité à l'interféron).

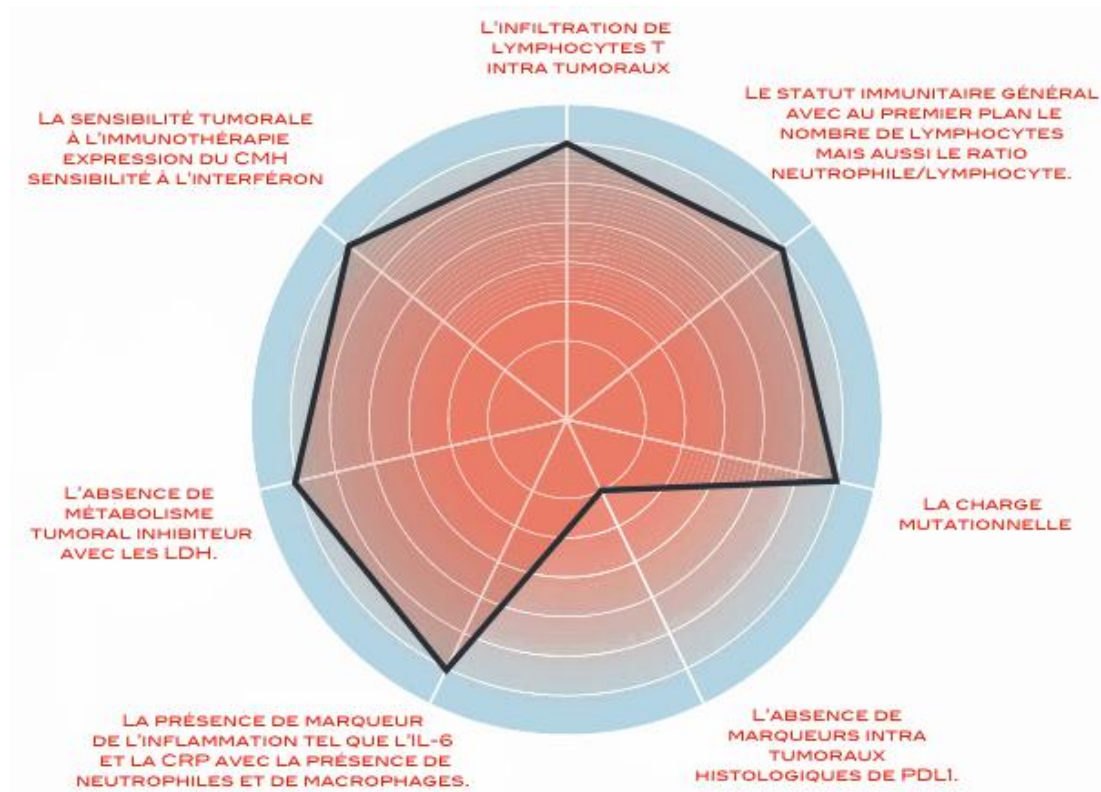


Figure 1 : L'immunogramme du cancer. (55)

Dans ce diagramme les différents paramètres sont indiqués en rouge. Une bonne réponse à l'immunothérapie est présente lorsque l'ensemble des 7 biomarqueurs est en bleu. En revanche, lorsque les biomarqueurs sont dans le gradient rouge central, alors la réponse à l'immunothérapie est peu probable. La ligne noire reliant les valeurs de données pour chaque paramètre représente un graphique pour une hypothèse unique pour chaque patient.

Le biomarqueur du futur comme le propose Blank et collègues avec ce diagramme sera probablement combiné afin de pouvoir intégrer les différents paramètres de l'individu tel que son état inflammatoire, son immunité et son microenvironnement tumoral. Les

biomarqueurs sanguins pronostiques décrits dans cette étude pourraient s'intégrer dans un score composite, afin de permettre une aide thérapeutique pour le praticien et d'améliorer la prise en charge des patients.

CONCLUSION

Le nivolumab est une immunothérapie anti-PD1 pour lequel seul 40% des patients vont répondre. Contrairement à l'ipilimumab, peu d'études existent concernant les biomarqueurs prédictifs sanguins avant traitement par anti-PD1 dans le mélanome avancé. En effet, les études antérieures se sont focalisées sur la recherche de biomarqueurs histologiques prédictifs de la réponse aux anti-PD1. Cette démarche se justifie par le fait que les anti-PD1 régulent les réponses immunitaires liées aux cellules T effectrices activées de façon chronique. Ces biomarqueurs histologiques ne sont pas pour l'instant utilisés en pratique clinique quotidienne.

Dans notre étude nous retrouvons en analyse monovariée et multivariée pour la survie globale et la survie sans progression qu'un taux élevé du nombre de neutrophiles, du rapport neutrophile/lymphocyte, du rapport leucocyte/lymphocyte et du nombre de monocytes sont associés à un mauvais pronostic chez les patients traités par anti-PD1. Pour la survie globale, le nombre de leucocytes est également associé à un mauvais pronostic en analyse monovariée et multivariée. Nos résultats sont concordants avec les données publiées dans la littérature. Ainsi, chez les patients traités par ipilimumab, un nombre de neutrophiles et un rapport neutrophile/lymphocyte élevé ont été décrits comme associés à un mauvais pronostic. Un nombre de monocytes bas est associé à une augmentation de la survie globale dans le traitement par ipilimumab. En revanche, ces biomarqueurs n'avaient jamais été rapportés pour le traitement par anti-PD1 dans le mélanome. Le taux de LDH était déjà connu comme associé à un mauvais pronostic pour les anti-PD1 dans plusieurs études et nous a donc servi de variable d'ajustement.

Les biomarqueurs significatifs dans cette étude sont mesurés via un prélèvement de sang périphérique, réalisé systématiquement avant introduction de traitement par anti-PD1 et peuvent donc être facilement intégrés à la pratique clinique actuelle.

Il s'agit d'une étude pilote pour laquelle il faudra confirmer nos résultats d'une part par la poursuite du suivi de cette cohorte et d'autre part par des études ultérieures incluant un plus grand nombre de patients.

ARTICLE SOUMIS

Ce chapitre présente l'article soumis est soumis aux ACTA dermato-venereologica pour lequel des révisions ont été demandées. Les points modifiés à la demande des reviewers sont surlignés.

Blood Predictive Biomarkers for Nivolumab in Advanced Melanoma.

Edouard CHASSEUIL,^{1*} Mélanie SAINT-JEAN,^{1,2*} Hannah CHASSEUIL,³ Lucie PEUVREL,^{1,2}
Gaëlle QUEREUX,^{1,2} Jean-Michel NGUYEN,^{2,4} Aurélie GAULTIER,⁴ Emilie VAREY,^{1,2} Amir
KHAMMARI,^{1,2} Brigitte DRENO^{1,2}

* Co-author at the same level

¹Department of Dermato-Oncology, University of Nantes, France

²INSERM U1232, CIC, University of Nantes, France

³Department of Dermatology, University of Poitiers, France

⁴SEME, PHU11, University of Nantes, France

Short title: Prognostic biomarkers for nivolumab in advanced melanoma

ABSTRACT

Nivolumab response rate is 40% in metastatic melanoma. Few studies have evaluated pre-treatment biomarkers predictive of response. Our aim was to identify potential peripheral blood biomarkers associated with survival in advanced melanoma patients treated with nivolumab. All advanced melanoma cases treated with anti-PD1 over a 3 year-period in our department were identified. For each case, nine potential blood biomarkers were identified. Bivariate and multivariate analysis adjusted for the AJCC stage, ECOG performance status, LDH level and failure to respond to first-line therapy, were used to test the association between biomarkers and overall survival (primary outcome) or progression free survival (secondary outcome). Increased monocyte count, leukocyte/lymphocyte ratio and neutrophil/lymphocyte ratio were significantly associated with decreased overall survival after bivariate and multivariate analysis. Increased monocyte count was also significantly associated with decreased progression free survival. These blood variables are easily measured and could help to predict patient response before the introduction of anti-PD1 therapy.

Keywords: nivolumab, anti-PD1, melanoma, biomarkers, predictive

Corresponding author: Pr Brigitte Dréno, Department of Dermato-Oncology, University of Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Cedex 01, Nantes, FRANCE

E-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

INTRODUCTION

The introduction of new therapeutic agents has revolutionised the management of metastatic melanoma since 2011. Among these new agents are checkpoint inhibitors: human monoclonal antibodies targeting either programmed cell death protein 1 (PD1) or cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), key players in immune regulation of tumour progression. PD1 is a T-cell receptor which, when bound to PD ligand-1 (PDL1) or -2 (PDL2) on tumour cells, causes down-regulation in T-cell mediated immune response.

Nivolumab is one of the two anti-PD1 monoclonal antibodies currently available on the market, which constitute the treatment of reference in advanced melanoma. In 2015, a randomised controlled trial demonstrated increased survival after one year in metastatic melanoma patients without *BRAF* mutation treated with nivolumab compared to dacarbazine as first-line therapy (1). Similar results were seen when nivolumab was compared to other chemotherapy agents (dacarbazine or paclitaxel combined with carboplatin) used as second-line therapy after treatment with *BRAF* inhibitor or ipilimumab (2).

Anti-PD1 response rate is approximately 40%, meaning that patient selection is essential. There is a need for prognostic biomarkers because administering treatment to patient non-responders is costly, exposes to potential side effects and leads to delays in the introduction of alternative, potentially more effective therapies. However, care must be taken to ensure that biomarkers are highly sensitive to avoid the wrong exclusion of patient responders.

Easily measurable, validated biomarkers predictive of anti-PD1 response are lacking. Current biomarker propositions include increased tumour expression of PDL1 (3) and tumour CD8 T-

cell infiltration (4). Histological biomarkers require a tissue biopsy, which is not feasible in all patients because of the risk associated with certain visceral tumour locations and delays in obtaining results. Furthermore, the reliability of histological biomarkers is questionable because tumours are naturally heterogeneous and histological samples are not representative of the whole tumour. Moreover, immunohistochemical methods are yet to be validated and homogenized between the different laboratories (5). The predictive value of PDL1 in melanoma metastasis and the definition of its range of positivity (5%, 10% of cells) are still discussed (5). To date, the most valuable finding is that an absence of PDL1 expression seems to be an argument for using a combination of two checkpoint inhibitors anti-PD1 and anti CTLA4.

Some prognostic blood biomarkers have already been identified for checkpoint therapies. High lactate dehydrogenase (LDH) (6) and high C-reactive protein (CRP) levels prior to anti-PD1 treatment are associated with poor outcomes (7). High lymphocyte count and high eosinophil count prior to first infusion have been shown to be associated with improved overall survival (OS) in metastatic melanoma treated with ipilimumab (anti-CTLA4 monoclonal antibody) (8) and pembrolizumab (anti-PD1 monoclonal antibody) (9). Inflammatory biomarkers such as high neutrophil count and neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) have been associated with decreased OS for ipilimumab (10,11). These biomarkers have not been studied for anti-PD1 treatment in melanoma. Low absolute monocyte count (MC) is associated with increased OS in ipilimumab treatment (8). Studies evaluating peripheral blood biomarkers are lacking for anti-PD1.

This study examined the association between 9 peripheral blood parameters and the primary outcome, OS, in advanced melanoma patients treated with anti-PD1. The secondary outcome was progression free survival (PFS). The aim of our study was to identify potential, easy-to-use biomarkers predictive of patient response to anti-PD1 for advanced melanoma.

METHODS

Patients

Patients were selected for this **pilot** monocentric retrospective study from the Melanoma Clinical Investigation Research Network (RIC-Mel), a French prospective cohort of melanoma patients. Inclusion criteria were age greater than 18 years, histologically proven unresectable stage IIIC or IV melanoma, according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification (12). All patients must have received at least one dose of nivolumab between 26 June 2013 and 6 January 2016 at Nantes University Hospital, France.

Exclusion criteria were lack of documented peripheral blood sample in the 2 months preceding anti-PD1 treatment. For PFS analysis, patients with grade 3 or 4 side effects according to Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) leading to nivolumab discontinuation were also excluded (13). All participants had provided written informed consent for use of their clinical and biological data for the purposes of scientific research upon inclusion.

Treatment regimen

Nivolumab was administered intravenously at the dose of 3 mg/kg every 2 weeks, in accordance with the European Medicine Agency marketing authorisation.

Epidemiological data

Data collected for each patient were sex, date of birth, primary tumour characteristics (histological type, Breslow thickness, mitotic index, ulceration and *BRAF* status), pre-treatment AJCC stage, ECOG performance status (PS) and first-line therapy if applicable.

Biological data

For each patient included, a pre-treatment blood sample taken during the 2 months preceding nivolumab introduction, was identified. In the case of multiple blood samples, the most recent was selected. Biological tests were performed in several different laboratories including Haematology and Biochemistry Department at Nantes University Hospital. Results were collected taking into account the normal ranges for each laboratory. Nine values were considered: leukocyte count, lymphocyte count, leukocyte/lymphocyte ratio (LLR), neutrophil count, NLR, MC, eosinophil count, LDH and CRP.

Evaluation method

Standard imaging follow-up included a head, chest, abdomen and pelvis Computed Tomodensitometry (CT) prior to treatment and every two months during treatment. Treatment response was defined according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) (13). RECIST scores were collected for all CT scans for each patient and therapeutic response was classed as progressive or non-progressive. A non-progressive response was then further defined as stable, partial or complete response. As part of usual practice in the Dermato-Oncology department at Nantes University Hospital, all patients with complete radiological response underwent Positron Emission Tomography (PET) and a CT brain which was repeated 3-months later to confirm the absence of disease. In the

event of disease-free imagery, treatment was discontinued. Three-monthly surveillance PET and CT brain scans were then performed for at least one year.

OS, the primary outcome, was defined as the number of days from the first dose of nivolumab to the date of death or to the date of analysis (15 April 2016) if the patient was still alive. PFS, the secondary outcome, was defined as the number of days from the first dose of nivolumab to the date of progression or death or, to the date of analysis if no progression was observed.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to present epidemiological data and disease-specific information. Bivariate Cox proportional hazard analyses were used to estimate risk factor associations between each biomarker and OS or PFS. Results were described by hazard ratios with 95% confidence intervals and P-values. For multivariate analysis, data were adjusted according to previously identified prognostic markers (AJCC stage, ECOG PS, LDH level and failure to respond to first-line therapy) and analysed using a Cox regression model.

All analysis was conducted using R statistical software version 3.12. P-values less than 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Patients

Eighty-seven patients fulfilled inclusion criteria and were analysed for OS. Epidemiological data and primary tumour characteristics for OS are presented in Table I. Median age was 71 years, 48 patients were male. Average Breslow thickness was 4.03 mm. Ulceration was seen in 24 patients (28%).

Histological type was superficial spreading melanoma in 30% of cases (n=26), nodular melanoma in 20% (n=17), mucosal melanoma in 11% (n=10), acro-lentiginous melanoma in 9% (n=8), choroidal melanoma in 3% (n=3) and other subtype in 5% (congenital naevus melanoma (n=1), desmoplastic (n=1), spitzoide naevus melanoma (n=2)). Five percent of patients (n=4) had an unclassable tumour type and primary melanoma type was unknown in 11% (n=10). For 5 patients, initial histological data of primary melanoma was missing at the time of diagnosis of metastatic disease and, despite efforts to contact general practitioners, histology laboratories and surgeons, remained unknown. Thirty percent of patients (n=26) were found to be positive for *BRAF* mutation.

Nivolumab was used as first-line therapy in 33 patients. First-line therapy for the remaining 54 patients was BRAF inhibitor in 17% (n=15), combined BRAF inhibitor/MEK inhibitor in 2% (n=2), ipilimumab in 31% (n=27), dacarbazine in 8% (n=7) and combined dacarbazine/carboplatin in 5% (n=4). No other anti-cancer treatment was administered concomitantly with nivolumab.

ECOG PS was 0 (n=75), 1 (n=7), 2 (n=4) and 3 (n=1). Median OS was 225 days (SD=100 days). Nineteen patients died during the study. After exclusion of three patients because of grade 3 or 4 side effects (suspicion of drug induced skin reaction, autoimmune pneumonitis and third degree atrioventricular block) leading to treatment discontinuation, 84 patients were analysed for PFS. Median PFS was 157 days (SD=115 days). Disease progression was observed in 42 patients. At the date of data analysis, mean follow-up was 227 days, 48% of the patients were considered as having “non-progressive” disease (n=42), of which nine were considered as having a “complete” response to treatment.

Biological data

Pre-treatment blood samples were used to extract values for each potential biomarker: leukocyte count, lymphocyte count, leukocyte/lymphocyte ratio (LLR), neutrophil count, NLR, MC, eosinophil count, LDH and CRP.

Bivariate analysis

Bivariate analysis revealed a statistically significant relationship between decreased OS and an increase in the following biomarkers expressed in absolute count (Table II): leukocyte count (P=0.01; HR 1.13; 95% CI, 1.06-1.22), LLR (P=0.01; HR 1.11; 95% CI, 1.04-1.17), neutrophil count (P=0.01; HR 1.16; 95% CI, 1.08-1.26), NLR (P=0.01; HR 1.08; 95% CI, 1.02-1.15), MC (P=0.01; HR 4.31; 95% CI, 1.46-12.74), LDH (P=0.01; HR 1.31; 95% CI, 1.18-1.45) and CRP (P=0.01; HR 1.01; 95% CI, 1.01-1.02). Elevated eosinophil count (P=0.04; HR 0.01; 95% CI, 0.01-0.86) was the only biomarker significantly associated with increased OS. Lymphocyte count was not significantly associated with OS. Similar results were found for PFS except for eosinophil count which was not statistically significant (Table III).

Multivariate analysis

Pre-treatment LDH values were unavailable for 11 patients. Multivariate analysis was hence performed for 76 patients in OS and 73 patients in PFS.

Results are presented in Table II. A statistically significant relationship was observed between a decrease in OS and an increase in the following biomarkers expressed in absolute value: LLR (P=0.02; HR 1.11; 95% CI, 1.02-1.21), NLR (P=0.02; HR 1.12; 95% CI, 1.02-1.23) et MC (P=0.01; HR 6.31; 95% CI, 1.5-26.59).

Decreased PFS was significantly associated with increased MC (P=0.04; HR 3.5; 95% CI, 1.01-12.1) (Table III).

DISCUSSION

In our study, high leukocyte/lymphocyte ratio, neutrophil/lymphocyte ratio and monocyte count were shown to be independently associated with decreased OS according to bi- and multivariate analysis in advanced melanoma patients treated with anti-PD1. Only increased MC was significantly associated with decreased PFS for adjusted and non-adjusted analysis.

Our multivariate analysis results appear, for the greater part, to be concordant with current literature for anti-CTLA4 treatment. Previous studies have demonstrated the poor prognostic value of high NLR in patients treated with ipilimumab (10,11). Low MC has been shown to be associated with increased OS after ipilimumab treatment (8). This study is the first showing LLR, NLR and MC as independent predictive biomarkers for anti-PD1 treatment in melanoma. In bivariate analysis, we confirm previous results published with anti-PD1 treatment (6,7,9). High LDH and high CRP were significantly associated with poor OS and PFS. High eosinophil count was significantly associated with increased OS and PFS.

Current predictive biomarkers for anti-PD1 treatment described in the literature are histological and require a tissue biopsy. Histological biomarkers are associated with a number of disadvantages: biopsy-associated risks, delays in obtaining results, lack of established normal value ranges and absence of validated immunohistochemical methods standardised across laboratories. This pilot study aims to identify easily measurable (via a peripheral blood test) predictive markers that could potentially be used to predict patient response. Such biomarkers are lacking for anti-PD1 therapy.

Current literature suggests an intimate relationship between chronic inflammation and tumour microenvironment (14). Although microenvironment observations must be differentiated from those of systemic biomarkers, interestingly, our significant results are markers of systemic inflammation and mobilisation of the innate immune system. NLR describes relative changes in neutrophil count and lymphocyte count and is a well-validated predictive marker for visceral cancers and melanoma prior to ipilimumab treatment (10,11). Monocytosis, although less studied, is also related to chronic inflammation and was already studied for other cancer (15,16). NLR and MC reflect systemic inflammation, providing a biological explanation for our results.

Overall survival was chosen as the primary outcome marker because it is generally accepted as the reference outcome marker in immunotherapy treatment. Its weakness however, is that it does not differentiate the effects of treatments used after anti-PD1 and includes deaths from non-cancer related causes. PFS is now accepted by the FDA as a surrogate biomarker for overall survival (17). It was chosen as the secondary outcome marker because it is particularly well adapted for shorter studies, metastatic disease and measures directly the effect of anti-PD1 without being affected by subsequent therapies. The weaknesses of PFS are that firstly it depends on the time of the re-evaluation and, secondly it is considered less clinically relevant than OS. Interestingly, our study shows statistically significant result for MC for both OS and PFS, suggesting that this result is not only clinically relevant but also directly related to nivolumab.

Despite the retrospective design, this study had a number of strengths. Patient inclusion was exhaustive and data was adjusted for previously identified prognostic factors (AJCC stage, ECOG PS, LDH level and failure to respond to first-line therapy). LDH was significantly associated with poor OS

and PFS in bivariate analysis validating our choice to use it as an adjustment factor. The use of OS as the primary outcome and PFS as the secondary outcome was also a strong point. All patients were analysed in a real-life situations and data was homogenised in PFS analysis by the exclusion of patients with grade 3 or 4 CTCAE. Continued follow-up of this study is required to confirm results. Performance status could also be considered. Finally, the large variability of our monocyte count hazard ratio may suggest a significant influence of other unaccounted for factors, highlighting the need for further studies examining PD1/PDL1 interactions.

Based on this pilot study, pre-treatment increased LLR, NLR and MC are independent biological markers associated with poorer outcome in advanced melanoma patients treated with nivolumab. Not all patients respond to anti-PD1 treatment and measures of PDL1 expression in tissue biopsies may not be accurate biomarkers. The biomarkers proposed here are accessible via a blood sample and could be easily used to improve patient selection but require validation by larger multicentric trials.

Figure legends

Table I: Epidemiological data

Characteristics	Values
Total number of patients	87
Mean age, years (min-max)	71 (27-92)
Male, <i>n</i> (%)	48 (55)
AJCC stage, <i>n</i> (%)	
IIIC	6 (7)
IV	81 (93)
Breslow thickness, median (SD)	4.03 (3.05)

Ulceration of primary, <i>n</i> (%)	
Yes	24 (28)
No	29 (33)
Unknown	34 (39)
Mitotic index, <i>n</i> (%)	
>1/ mm ²	21 (25)
<1/mm ²	5 (6)
Unknown	60 (69)
<i>BRAF</i> mutation, <i>n</i> (%)	
No	59 (68)
Yes	26 (30)
Indeterminate	2 (2)
Previous treatment, <i>n</i> (%)	54 (62)
Ipilimumab	27 (31)
BRAF inhibitor	15 (17)
BRAF inhibitor combined with MEK inhibitor	2 (2)
Dacarbazine	7 (8)
Dacarbazine + carboplatin	4 (5)
LDH level at baseline, <i>n</i> (%)	
Normal value	44 (51)
>ULN	33 (38)
CRP level at baseline, <i>n</i> (%)	
Normal-2ULN	37 (42)
>2ULN	16 (18)

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

LDH: lactate dehydrogenase.

ULN: upper limit of normal.

CRP: C-reactive protein.

Table II: Overall survival for bivariate and multivariate analysis.

Biological data	Hazard ratio [CI 95%] for BA	P value for BA	Hazard ratio [CI 95%] for MA	P value for MA
Leukocyte count	1.13 [1.06; 1.22]	0.01*	1.07 [0.94; 1.22]	0.32
Lymphocyte count	0.65 [0.27; 1.57]	0.34	0.43 [0.12; 1.51]	0.19
Leukocyte/lymphocyte ratio (LLR)	1.11 [1.04; 1.17]	0.01*	1.11 [1.02; 1.21]	0.02*
Neutrophil count	1.16 [1.08; 1.26]	0.01*	1.08 [0.95; 1.23]	0.24
Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR)	1.08 [1.02; 1.15]	0.01*	1.12 [1.02; 1.23]	0.02*
Monocyte count (MC)	4.31 [1.46; 12.74]	0.01*	6.31 [1.5; 26.59]	0.01*
Eosinophil count	0.01 [0.01; 0.86]	0.04*	0.69 [0.01; 182]	0.89
Lactate dehydrogenase	1.31 [1.18; 1.45]	0.01*		
C-reactive protein	1.01 [1.01; 1.02]	0.01*	0.99 [0.98; 1.01]	0.06

BA: bivariate analysis

MA: multivariate analysis

CI: confidence intervals

*: significant result

Table III: Progression free survival for bivariate and multivariate analysis.

Biological data	Hazard ratio [CI 95%] for UA	P value for UA	Hazard ratio [CI 95%] for MA	P value for MA
Leukocyte count	1.16 [1.07; 1.24]	0.01*	1.06 [0.94; 1.19]	0.34
Lymphocyte count	0.73 [0.39; 1.38]	0.33	0.88 [0.40; 1.89]	0.74
Leukocyte/lymphocyte ratio (LLR)	1.2 [1.1; 1.30]	0.01*	1.06 [0.98; 1.16]	0.15
Neutrophil count	1.18 [1.1; 1.27]	0.01*	1.06 [0.95; 1.19]	0.31
Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR)	1.09 [1.03; 1.14]	0.01*	1.07 [0.98; 1.17]	0.15
Monocyte count (MC)	6.33 [2.4; 16.69]	0.01*	3.5 [1.01; 12.1]	0.04*
Eosinophil count	0.24 [0.02; 3.87]	0.32	0.14 [0.01; 4.99]	0.27
Lactate dehydrogenase	1.25 [1.13; 1.38]	0.01*		
C-reactive protein	1.01 [1.01; 1.02]	0.01*	0.99 [0.98; 1.01]	0.40

BA: bivariate analysis

MA: multivariate analysis

CI: confidence intervals

*significant result

Bibliographie

1. Les cancers en France - Edition 2015 - Ref : ETKFRANCE16 | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 8 sept 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-Edition-2015>
2. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* mars 2014;15(3):323–332.
3. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med.* nov 2014;371(20):1877–1888.
4. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet.* 2015;386(9992):444–451.
5. <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/reco-melanome-stade-iii-iv-synthe-se-919b0bdd652388f15088ea2512e21b70.pdf> [Internet]. [cité 17 sept 2017]. Disponible sur: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/reco-melanome-stade-iii-iv-synthe-se-919b0bdd652388f15088ea2512e21b70.pdf>
6. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 25 juill 2013;39(1):1–10.
7. Yao S, Zhu Y, Chen L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov.* févr 2013;12(2):130.
8. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2517–2526.
9. Ileana E, Champiat S, Soria J-C. [Immune-checkpoints: the new anti-cancer immunotherapies]. *Bull Cancer (Paris).* juin 2013;100(6):601–10.
10. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med.* janv 2015;372(4):320–330.
11. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 24 sept 2015;373(13):1270–1.
12. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 11 sept 2017;

13. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 21 mai 2015;372(21):2018- 28.
14. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 28 juin 2012;366(26):2443- 54.
15. Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu W-J, Weber JS, Ribas A, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. déc 2016;34(34):4102- 9.
16. Thomas NE, Busam KJ, From L, Kricker A, Armstrong BK, Anton-Culver H, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 nov 2013;31(33):4252- 9.
17. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):568- 71.
18. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. sept 2016;375(9):819- 29.
19. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):568- 71.
20. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 9 oct 2015;350(6257):207- 11.
21. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 24 mars 2016;165(1):35- 44.
22. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 30 oct 2009;139(3):485- 98.
23. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 juin 2017;28(6):1368- 79.
24. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. avr 2015;14(4):847- 56.
25. Mansfield AS, Murphy SJ, Peikert T, Yi ES, Vasmataz G, Wigle DA, et al. Heterogeneity of Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Multifocal Lung Cancer. *Clin*

Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 mai 2016;22(9):2177- 82.

26. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, et al. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. déc 2015;21(24):5453–5459.
27. Zaragoza J, Caille A, Beneton N, Bens G, Christiann F, Maillard H, et al. High neutrophil to lymphocyte ratio measured before starting ipilimumab treatment is associated with reduced overall survival in patients with melanoma. Br J Dermatol. janv 2016;174(1):146- 51.
28. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. avr 2016;27(4):732- 8.
29. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Foppen MG, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. Clin Cancer Res [Internet]. janv 2016; Disponible sur: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2016/03/21/1078-0432.CCR-15-2412>
30. Wilgenhof S, Du Four S, Vandenbroucke F, Everaert H, Salmon I, Liénard D, et al. Single-center experience with ipilimumab in an expanded access program for patients with pretreated advanced melanoma. J Immunother Hagerstown Md 1997. avr 2013;36(3):215- 22.
31. Nakamura Y, Kitano S, Takahashi A, Tsutsumida A, Namikawa K, Tanese K, et al. Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy. Oncotarget. 22 nov 2016;7(47):77404- 15.
32. Weide B, Martens A, Hassel JC, Berking C, Postow MA, Bisschop K, et al. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 nov 2016;22(22):5487- 96.
33. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, et al. Autoimmunity Correlates With Tumor Regression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti–Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. sept 2005;23(25):6043–6053.
34. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. Cancer Immunol Immunother CII. juill 2014;63(7):675- 83.
35. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, Postow MA, Wong P, Capone M, et al. Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4+ and CD8+ T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 oct 2016;22(19):4848- 58.
36. Moreira A, Leisgang W, Schuler G, Heinzerling L. Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy.

Immunotherapy. janv 2017;9(2):115- 21.

37. Réseau pour la Recherche et l'Investigation Clinique sur le Mélanome - Cohorte nationale de patients atteints de mélanome / Portail Epidemiologie - France | Health Databases [Internet]. [cité 11 avr 2017]. Disponible sur: <https://epidemiologie-france.aviesan.fr/epidemiologie-france/fiches/reseau-pour-la-recherche-et-l-investigation-clinique-sur-le-melanome-cohorte-nationale-de-patients-atteints-de-melanome>
38. Common Terminology Criteria for Adverse Events FAQ - Knowledge Center - Vocabulary - National Cancer Institute - Confluence Wiki [Internet]. [cité 11 avr 2017]. Disponible sur: <https://wiki.nci.nih.gov/display/VKC/Common+Terminology+Criteria+for+Adverse+Events+FAQ>
39. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. Clin Cancer Res. déc 2009;15(23):7412-7420.
40. Weide B, Elsässer M, Büttner P, Pflugfelder A, Leiter U, Eigentler TK, et al. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. Br J Cancer. 24 juill 2012;107(3):422- 8.
41. Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 15 nov 2000;18(22):3782- 93.
42. Diem S, Kasenda B, Spain L, Martin-Liberal J, Marconcini R, Gore M, et al. Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. Br J Cancer. 2 févr 2016;114(3):256- 61.
43. Damuzzo V, Solito S, Pinton L, Carrozzo E, Valpione S, Pigozzo J, et al. Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. Oncoimmunology. 2016;5(12):e1249559.
44. Dick J, Lang N, Slynko A, Kopp-Schneider A, Schulz C, Dimitrakopoulou-Strauss A, et al. Use of LDH and autoimmune side effects to predict response to ipilimumab treatment. Immunotherapy. sept 2016;8(9):1033- 44.
45. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. Cancer Cell. juin 2006;9(6):425- 34.
46. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Natl Cancer Inst. juin 2014;106(6):dju124.
47. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 4 mars 2011;144(5):646- 74.
48. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast

cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 janv 2010;28(1):105- 13.

49. Porrata LF, Ristow K, Habermann T, Inwards DJ, Micallef IN, Markovic SN. Predicting survival for diffuse large B-cell lymphoma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Am J Hematol*. nov 2010;85(11):896- 9.

50. Schmidt H, Suci S, Punt CJA, Gore M, Kruit W, Patel P, et al. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 avr 2007;25(12):1562- 9.

51. Singh S, Himler J, Nagel CI, Resnick K. The Prognostic Value of Baseline Lymphocyte, Neutrophil, and Monocyte Counts in Locally Advanced Cervical Carcinoma Treated with Radiation. *Obstet Gynecol Int* [Internet]. 2017 [cité 8 août 2017];2017. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5292399/>

52. Botta C, Barbieri V, Ciliberto D, Rossi A, Rocco D, Addeo R, et al. Systemic inflammatory status at baseline predicts bevacizumab benefit in advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biol Ther*. juin 2013;14(6):469- 75.

53. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. juin 2013;24(6):1697- 703.

54. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. CANCER IMMUNOLOGY. The « cancer immunogram ». *Science*. 6 mai 2016;352(6286):658- 60.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Professeur Gaëlle QUEREUX

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Professeur Brigitte DRENO

Vu, le Doyen de la Faculté,
(tampon et signature)

Professeur Pascale JOLLIET

NOM : CHASSEUIL

PRENOM : Edouard

Titre de Thèse : Marqueurs prédictifs sanguins de réponse au traitement par nivolumab dans le mélanome métastatique

RESUME

Introduction: Le nivolumab est une immunothérapie anti-PD1 dont le taux de réponse est d'environ 40% dans le mélanome métastatique. Des marqueurs histologiques prédictifs, notamment l'expression de PD-L1 et l'infiltrat péri-tumoral CD8 ont été identifiés comme associés à une survie prolongée. Peu d'études ont évalué les biomarqueurs prédictifs sanguins. Notre objectif était d'identifier des biomarqueurs sanguins simples prélevés avant traitement par anti-PD1, associés à une survie prolongée.

Matériel et Méthodes: Nous avons inclus tous les cas de mélanomes avancés traités par anti-PD1 sur une période de 3 ans suivis dans notre service. Les valeurs suivantes ont été recueillies pour chaque patient dans les 2 mois précédant le début du traitement par anti-PD1 : le nombre de leucocytes (NL), de lymphocytes, de lymphocytes T CD4, de lymphocytes T CD8, de polynucléaires neutrophiles (NN), de monocytes (NM), d'éosinophiles, le rapport lymphocytaire CD4/CD8, le rapport leucocytes/lymphocytes (LLR), le rapport neutrophiles/lymphocytes (NLR), les taux de lactate déshydrogénase (LDH), d'anticorps antinucléaires et de protéine C-réactive. Une analyse univariée puis multivariée ajustée sur le stade AJCC, le taux de LDH et l'échec d'une première ligne de traitement ont été réalisées pour tester l'association entre la survie globale (SG) d'une part et la survie sans progression (SSP) d'autre part avec chaque biomarqueur.

Résultats: Quatre-vingt-sept patients ont été inclus dans cette étude. Les valeurs élevées suivantes étaient significativement associées à une diminution de la SG après analyse univariée et multivariée : NL (HR: 1,13 ; P : 0,04), LLR (HR: 1,1 ; P : 0,03), NN (HR: 1,14 ; P : 0,03), NLR (HR: 1,1 ; P : 0,04) et NM (HR: 4,02 ; P : 0,04). Des résultats similaires ont été trouvés avec la SSP à l'exception du NL en multivarié.

Discussion: Nos résultats sont concordants avec les données publiées pour l'immunothérapie par anti-CTLA4. Ainsi, chez les patients traités par ipilimumab, un NN et un NLR élevés ont été décrits comme associés à un mauvais pronostic. En revanche, ces biomarqueurs n'avaient jamais été rapportés pour le traitement par anti-PD1 dans le mélanome.

Conclusion: Un taux augmenté de NL, LLR, NN, NLR et NM avant traitement par anti-PD1 pour un mélanome avancé sont des marqueurs d'une SG et d'une SSP plus courtes. Ces variables sont facilement mesurables en pratique via un échantillon de sang périphérique et pourraient aider à améliorer la sélection des patients à l'avenir.

MOTS-CLES : mélanome ; nivolumab ; biomarqueurs.