

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2019

N° 2019-31

**THESE**

Pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Spécialité Dermatologie et Vénérologie

Par

Sarah LE NAOUR

Née le 24 janvier 1989 à QUIMPER

Présentée et soutenue publiquement le 3 avril 2019

---

Effet in vitro d'un inhibiteur de l'indoléamine 2,3 dioxygénase sur les propriétés cytotoxiques des lymphocytes infiltrants la tumeur (TILs) contre des lignées tumorales de mélanome

---

Présidente et Directrice de thèse : Madame le Professeur Brigitte DRENO

# COMPOSITION DU JURY

Directrice de thèse et Présidente du jury : Madame Le Professeur Brigitte Dréno

## MEMBRES DU JURY :

Madame Le Professeur Brigitte DRENO

Madame Le Professeur Gaëlle QUEREUX-BAUMGARTNER

Monsieur Le Professeur Jacques DANTAL

Monsieur Le Docteur Amir KHAMMARI

# REMERCIEMENTS

## **A Madame le Professeur Brigitte Dréno,**

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie pour votre implication tout au long de ce projet et pour votre soutien dans la réalisation de ce travail. Je vous remercie également pour ce que vous m'avez appris tout au long de mon internat et de me permettre de poursuivre cet apprentissage de la dermatologie au sein de votre service. Recevez l'expression de mon profond respect.

## **A Madame le Professeur Gaëlle Quéreux-Baumgartner,**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Travailler avec vous au cours de mon internat fut d'une grande richesse. Je vous remercie pour votre disponibilité, la justesse de vos conseils et remarques. Votre sens de l'enseignement restera un exemple à suivre.

## **A Monsieur le Professeur Jacques Dantal,**

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de votre présence dans ce jury. Mon semestre en néphrologie m'a beaucoup apporté tant sur le plan médical qu'humain. Je vous remercie de m'avoir fait partager votre intérêt pour cette belle spécialité.

## **A Monsieur le Docteur Amir Khammari,**

Merci pour votre implication dans ce travail, de l'étape de projet à sa réalisation, et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci également pour vos conseils et votre pertinence qui m'ont été d'une grande aide.

Merci à tout le service de dermatologie de Nantes, pour votre présence, votre soutien et tout ce que vous m'avez apporté au cours de ces quatre années d'internat. Merci de m'avoir transmis votre passion pour la dermatologie. Je tiens à remercier tout particulièrement Sébastien, Hélène et Claire, c'est avec une joie immense que je continuerai à travailler à vos côtés.

Merci au service de dermatologie du Mans pour le semestre passé à vos côtés, au Docteur Hervé Maillard pour sa bienveillance.

Un grand merci au Docteur Rémy Bernard pour m'avoir acceptée en tant que FFI dans son service de pneumologie au CH de Quimper et pour m'avoir tant apporté dans l'exercice de la médecine.

Merci au Docteur Madeleine N'Dour, pédiatre au dispensaire Saint Martin à Dakar, pour m'avoir montré que quand on veut on peut, par votre volonté de fer, je vous serai éternellement reconnaissante.

Un immense merci à Anne-Chantal pour ton aide précieuse dans ce travail, le partage de ton expérience, de tes connaissances tant techniques que scientifiques et ton investissement sans égal.

Merci à toute l'équipe du laboratoire d'immuno-dermatologie et de l'équipe 2 du CRCINA (U1232) et tout spécialement à Marie-Ange, pour sa bonne humeur et sa soif d'apprendre à toute épreuve.

Merci à Marie-Christine Pandolfino de l'UTCG pour nous avoir fourni le matériel cellulaire nécessaire.

Merci aux carabins Rennais, Mirabel, Julie, Céleste, Hélène, Lisa, Emilie, Guéna, Amélie, Clémence... et tous les autres, pour toutes ces années d'externat et ces moments inoubliables passés ensemble ! Et aussi aux pharmaciens, j'espère que le CASH à encore de belles années devant lui ! A Carole, merci d'être là depuis plus de 10 ans.

A tous mes co-internes, passés, actuels, futurs, Charlotte, Edouard, Barbara, Cécile F., Louise, Justine, Maxence, Anouk, Clémence, Cécile J., Perrine, Camille B., Camille S., Eve, Alice,

Claire, Marine, Pauline, Gauthier... merci d'avoir été là, pour le meilleur comme pour le pire !

A la promo 2014, Diane et Solène, que de chemin parcouru depuis notre rencontre le jour des choix en haut de l'amphi !

Merci à Flora et Morgane, la team M2 pour nos goûters révisions, nos déjeuners sur l'herbe, j'en passe et des meilleurs !

A la « Grande Sarah », tout simplement, merci.

A François qui partage ma vie, merci d'être à mes côtés chaque jour et pour toute ton affection.

Enfin, merci à mes parents, de m'avoir soutenue toutes ces années et encore aujourd'hui, d'avoir accepté mes choix et par-dessus tout, de m'avoir transmis votre goût de l'aventure dont la médecine fait partie !

# LISTE D'ABREVIATIONS

1-MT : 1-methyl-L-tryptophane

3-HAA : acide 3-hydroxyanthranilique

ACL : acro-lentigineux

AhR : aryl hydrocarbon receptor

AMM : autorisation de mise sur le marché

APC : allophycocyanine

CaI : calcium ionophore

CD3 : cluster de différenciation 3

CD200 : cluster de différenciation 200

CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4

DC : cellule dendritique

DMSO : dimethyl sulfoxide

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

FACS : fluorescent-activated cell sorting

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

GCN2 : general control nonderepressible 2

gp100 : glycoprotéine 100

HLA : human leucocyte antigens

IAPs : inhibitors of apoptosis proteins

IDO : indoléamine 2, 3 dioxygénase

IL-2-6-10-12 : interleukine -2 -6 -10 -12

INF- $\gamma$  : interféron-gamma

LT : lymphocytes T

MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MEK : MAPK/ERK kinase  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PBS : phosphate buffered saline  
PD-1 : programmed cell death protein 1  
PD-L1 : programmed death-ligand 1  
PE : phycoérythrine  
PHRC : programme hospitalier de recherche clinique  
PMA : phorbol myristate acetate  
RPMI : roswell park memorial institute medium  
SG : survie globale  
SSM : superficial spreading melanoma  
SVF : serum de veau foetal  
TGF- $\beta$  : transforming growth factor-beta  
TILs : lymphocytes infiltrant la tumeur  
Tregs : lymphocytes T régulateurs  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
WT : wild type (sauvage)

# TABLE DES MATIERES

<b>Composition du Jury</b>	<b>1</b>
<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Liste d'abréviations</b>	<b>5</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>10</b>
1. Généralités sur le mélanome	10
2. Les Thérapies Ciblées	10
3. L'Immunothérapie	12
4. Mécanismes identifiés aboutissant à la production de lymphocytes T cytotoxiques/réactifs inefficaces	16
5. Mécanisme d'action d'IDO	17
6. Cellules sécrétant de l'IDO intracellulaire	18
7. Rationnel de l'étude	19
8. Objectifs	19
<b>II. Matériel et Méthodes</b>	<b>20</b>
1. Matériel	20
a. <i>Lignées tumorales de mélanome</i>	20
b. <i>Lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)</i>	21
2. Méthodes	21
a. <i>Culture cellulaire</i>	21
b. <i>Inhibition d'IDO</i>	22
c. <i>Co-cultures TILs/lignée tumorale autologue</i>	22
d. <i>Cytométrie de flux</i>	23

e.	<i>Dosage des cytokines et chimiokines</i>	25
f.	<i>Mesure des rapports kynurénine/tryptophane</i>	26
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>27</b>
1.	Présentation des résultats	27
2.	Activité de l'IDO	27
a.	<i>Ratios kynurénine/tryptophane</i>	27
b.	<i>Cytométrie de flux</i>	28
3.	Analyse phénotypique des lignées	28
a.	<i>CMH-I</i>	29
i.	<i>Lignées mutées BRAF V600E : pourcentage et MFI</i>	29
ii.	<i>Lignées sauvages : pourcentage et MFI</i>	29
b.	<i>CMH-II</i>	30
i.	<i>Lignées mutées BRAF V600E : pourcentage et MFI</i>	30
ii.	<i>Lignées sauvages : pourcentage et MFI</i>	31
c.	<i>PD-L1</i>	32
i.	<i>Lignées mutées BRAF V600E</i>	32
ii.	<i>Lignées sauvages</i>	32
d.	<i>Melan-A</i>	33
e.	<i>gp100</i>	34
f.	<i>Autres marqueurs : PD-L2, CD80, CD86</i>	35
4.	Cytokines et chimiokines	35
a.	<i>IL-6</i>	35
b.	<i>CXCL9</i>	36

c. <i>CXCL10</i>	37
5. Spécificité des TILs autologues	38
a. <i>Lignées mutées BRAF V600E</i>	38
b. <i>Lignées sauvages</i>	38
<b>IV. Discussion</b>	<b>42</b>
<b>V. Bibliographie</b>	<b>46</b>
<b>VI. Short communication</b>	<b>51</b>

# I. INTRODUCTION

## 1. GENERALITES SUR LE MELANOME

Le mélanome fait partie des cancers de la peau au même titre que le carcinome spinocellulaire et le carcinome basocellulaire mais il est nettement moins fréquent (10% des cancers de la peau, tout cancer confondu) et présente une pathogénie radicalement différente.

Il s'agit d'une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes, pouvant toucher la peau (rôle carcinogène des ultraviolets) et les muqueuses. Son incidence double tous les 15 ans depuis 50 ans dans tous les pays du monde (1,2). L'incidence en France du mélanome en 2015 était de 14 325 (données de l'INCa) soit un taux d'incidence standardisé estimé à 13,6 pour 100 000 hommes par an et 13,5 pour la femme. Il se place ainsi au 6<sup>e</sup> rang des cancers chez la femme et au 8<sup>e</sup> rang chez l'homme (3).

L'exposition solaire intense (intermittente, ponctuelle ou encore les coups de soleil sévères dans l'enfance) est un facteur de risque important de mélanome, accessible à la prévention. Mais d'autres, comme certaines mutations génétiques (CDKN2A, CDK4), un nombre important de nævi et/ou syndrome des nævi atypiques, le phototype clair sont inhérentes au patient et requièrent une surveillance accrue. Ceci peut donc amener à parler de mélanomes à faible ou forte composante génétique. Il est à noter que la majorité des mélanomes sont dits *de novo* et seulement 20 à 30 pour cent se développent sur naevus préexistant (4).

La mortalité est globalement stable (1,2 à 1,5 pour 100 000 habitants en France), résultant d'un dépistage précoce, des campagnes de prévention et des progrès thérapeutiques (5,6).

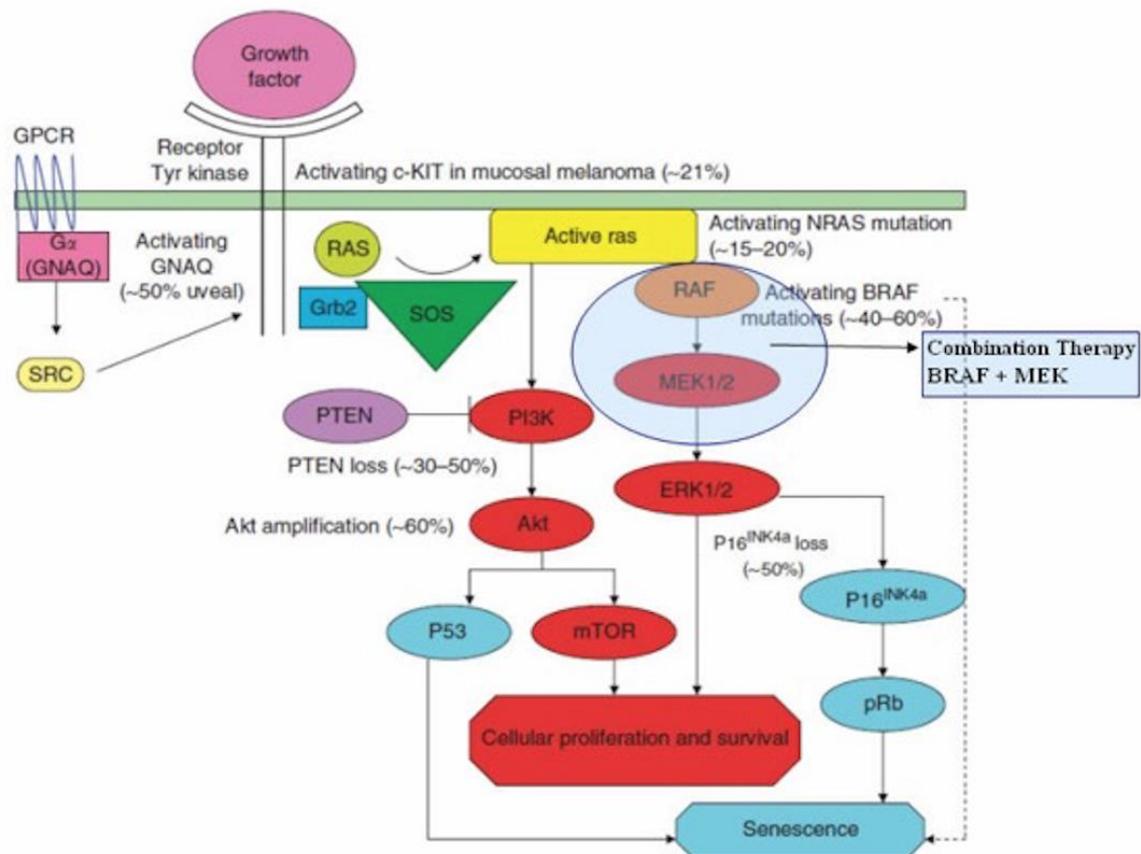
Le mélanome est en effet un des cancers qui a connu les plus grandes avancées en termes de traitement ces dernières années. Jusqu'à 2010, le traitement de référence des mélanomes métastatiques de stade IV était la dacarbazine avec une efficacité limitée. Le pronostic était alors très sombre, avec une survie globale (SG) de moins d'un an (7,8).

Depuis, deux principales approches thérapeutiques se sont développées, basées sur des mécanismes d'action différents : les thérapies ciblées et l'immunothérapie. Elles ont véritablement révolutionné la prise en charge des mélanomes de stade IV et devraient dans un avenir proche, être disponibles en traitement adjuvant aux stades précoces du mélanome.

## 2. LES THERAPIES CIBLEES

Ces thérapies ciblent la voie de signalisation des MAP-kinases (mitogen-activated proteins) visant à l'inhiber afin de limiter la prolifération et la transformation tumorale.

Elles comprennent les anti-BRAF (vemurafenib (Zelboraf®), dabrafenib (Tafinlar®), encorafenib (Braftovi®) et les anti-MEK (cobimetinib (Cotellic®), trametinib (Mekinist®), binimetinib (Mektovi®), association thérapeutique proposée en première ligne au stade métastatique pour des mélanomes porteurs de la mutation BRAF V600 (soit presque 50% des mélanomes) (9,10).



**Figure 1 :** Activation de la cascade de phosphorylation par la voie des MAP kinases avec activation de BRAF (40-60% des cas) à l'origine des thérapies ciblées combinées par anti-BRAF et anti-MEK dans le traitement du mélanome avancé

Extrait du site : <https://www.melanoma.org/>

A l'état physiologique, un ligand extracellulaire vient se fixer sur un récepteur transmembranaire. Il s'agit d'un récepteur à tyrosine kinase qui phosphoryle et active RAS qui active à son tour la kinase BRAF. Celle-ci devient fonctionnelle en se dimérisant et phosphoryle MEK1/2 lui permettant à son tour d'activer ERK1/2. Ainsi on aboutit à la transcription de facteurs impliqués dans la survie et la prolifération. Quand une mutation du gène de cette protéine BRAF est présente, la kinase BRAF est alors constamment activée ce qui entraîne une prolifération anormale tumorale.

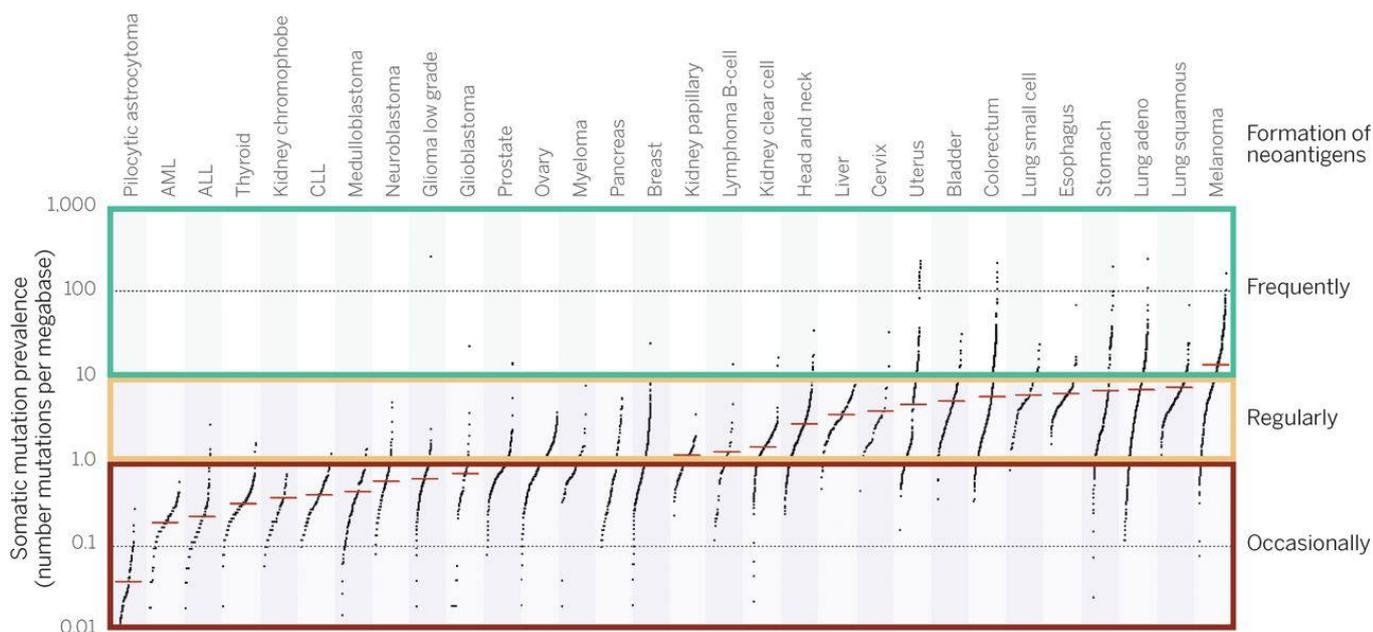
### 3. L'IMMUNOTHERAPIE

La cellule tumorale utilise différents processus pour échapper au système immunitaire, on observe notamment une perte d'expression des antigènes tumoraux et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), elle est ainsi moins bien reconnue. Elle met ensuite en jeu des mécanismes anti-apoptotiques qui rendent sa destruction plus difficile. Le microenvironnement intervient également par la production de cytokines immunosuppressives et le recrutement de cellules T régulatrices qui expriment des molécules de co-stimulation inhibitrices comme le CTLA-4 et le PD-1 qui vont inhiber le LT cytotoxique CD8+. Le lymphocyte T joue un rôle central dans la lutte anti-tumorale. Il est classiquement activé par l'interaction TCR-antigène et le signal de co-stimulation CD-28 et ses ligands CD-80 et CD-86 (B7-1 et B7-2) sur la cellule présentatrice d'antigène. CTLA-4 et PD-1, en inhibant le lymphocyte T, entraînent alors une régulation négative et une immunotolérance. Le CTLA-4 a une plus grande affinité pour son ligand CD-28 que CD-80 et CD-86.

L'immunothérapie englobe un large spectre de thérapeutiques utilisées dans le mélanome. Les plus connues sont les anticorps monoclonaux : anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4; ipilimumab) et anti-PD-1 (programmed death protein 1; nivolumab et pembrolizumab). Mais ce terme inclut également la vaccination anti-tumorale et l'immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T sous une forme polyclonale (TILs = lymphocytes infiltrant la tumeur) (11,12).

Le prix Nobel de médecine 2018 a d'ailleurs été décerné aux immunologistes James Allison et Tasuku Honjo pour leurs découvertes sur l'immunothérapie.

L'efficacité de l'immunothérapie dans le mélanome s'explique en partie par la formation de néoantigènes induits notamment par les ultraviolets donnant à cette tumeur un caractère très immunogène mais également par l'expression d'antigènes (de différenciation, tumoraux) par la tumeur elle-même (Melan-A, MELOE-1, NY-ESO-1, MAGE...).



**Figure 2 : Estimation du répertoire de néo-antigènes pour les cancers chez l'homme (13)**

### *L'anti-CTLA-4*

L'ipilimumab (Yervoy®), anticorps monoclonal humanisé (AMM en 2012), a été le premier *check-point inhibitor*, inhibiteur de point de contrôle au niveau du lymphocyte, disponible sur le marché. En bloquant la liaison de CTLA-4 à ses ligands CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes, il induit une stimulation lymphocytaire non spécifique ayant démontré une efficacité dans le mélanome avancé avec une SG médiane de 9 à 11 mois (14).

L'ipilimumab intervient durant la phase initiale de l'activation lymphocytaire, au niveau des ganglions.

### *Les anti-PD-1*

Le nivolumab (Opdivo®) et le pembrolizumab (Keytruda®) (anticorps monoclonaux humanisés) ont été développés quelques années plus tard (AMM en 2015), permettant un gain de survie supplémentaire (SG médiane supérieure à 2 ans) et un meilleur profil de tolérance. En se liant à PD-1, empêchant ainsi la liaison à son ligand, PD-L1, ils inhibent l'inactivation des lymphocytes (15,16).

Dans l'étude comparant le nivolumab à la dacarbazine (Check Mate 066), la survie globale à 3 ans pour le nivolumab est de 51,2 % contre 21,6% pour la dacabazine mais tombe à 37,5% et 11,2% à 5 ans respectivement (17).

Les anti-PD-1 agissent plus en aval dans la voie d'activation lymphocytaire, la voie PD-1 régule les réponses immunitaires liées aux cellules T effectrices qui ont reconnu leurs antigènes au sein du site tumoral.

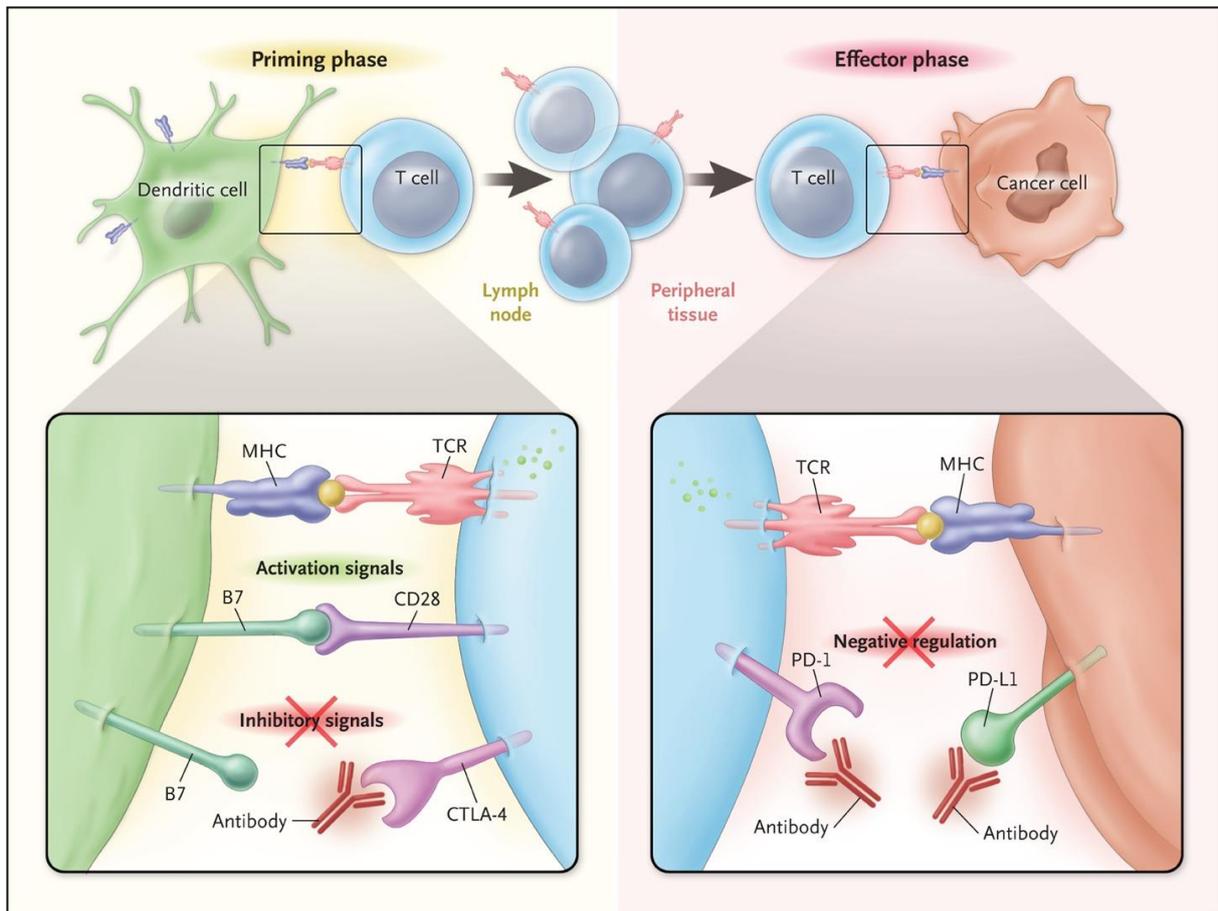


Figure 3 : Blocage de la voie CTLA-4 ou PD-1 dans l'immunothérapie tumorale (18)

Il a été proposé l'association anti-CTLA-4 et anti-PD-1 pour potentialiser la réponse antitumorale mais avec un profil de tolérance auto-immun très discuté, avec notamment un taux d'effets indésirables de grades III et IV de 59% pour l'association contre seulement 22% pour le groupe nivolumab seul et de 28% pour le groupe ipilimumab seul (19,20).

Ces effets indésirables graves sont représentés principalement par les diarrhées, colites et hépatites auto-immunes et troubles endocriniens. Cette tolérance variable entre les molécules découle notamment du mécanisme d'action des traitements, avec une action très précoce dans la voie d'activation lymphocytaire pour l'ipilimumab.

Le premier mars 2018, l'ipilimumab a été retiré des spécialités pharmaceutiques facturables et nous sommes aujourd'hui dans l'attente de son autorisation d'utilisation en association avec le nivolumab.

### *La vaccination*

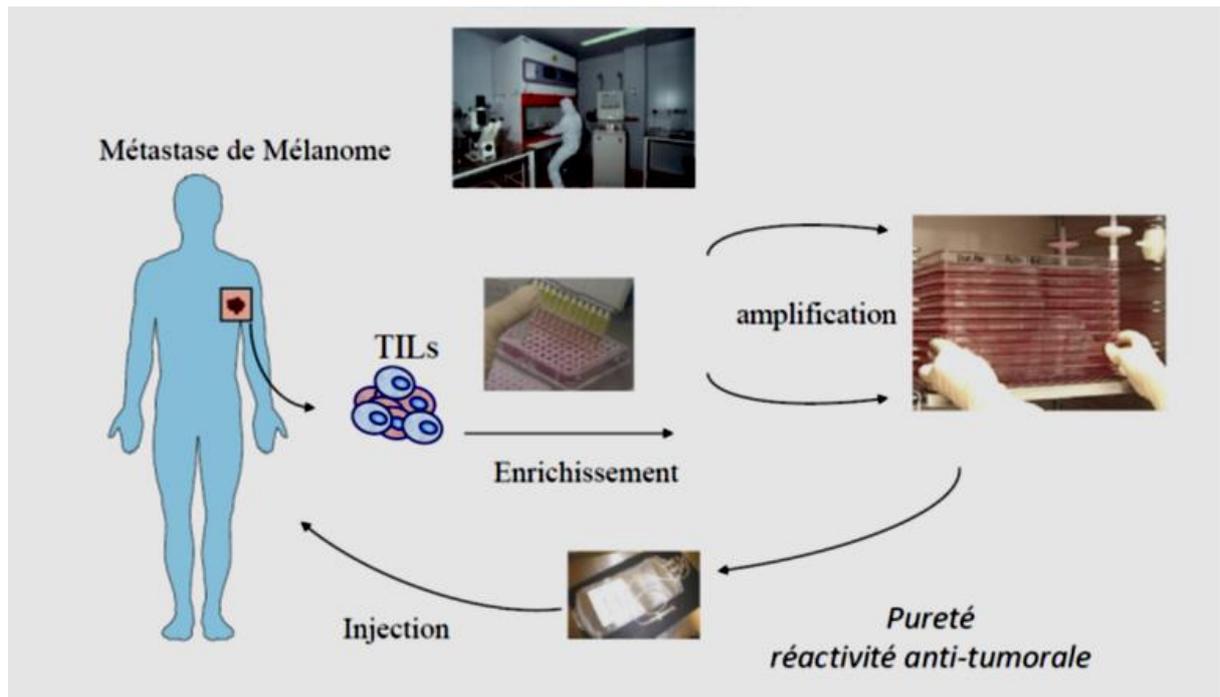
Celle-ci vise à induire une réponse immunitaire T spécifique d'antigènes de mélanome, ces antigènes peuvent être injectés sous différentes formes (protéines recombinantes, cellules dendritiques chargées, peptides...) (21). Une étude de phase II publiée en décembre 2018 rapporte des résultats intéressants avec MAGE-3 sous forme de protéine recombinante, tant en terme de sécurité d'utilisation que d'efficacité dans la lutte anti-tumorale avec un contrôle de la maladie dans 63% des cas (22).

### *L'immunothérapie adoptive*

Les TILs sont des lymphocytes T issus de tissu tumoral de mélanome, amplifiés *in vitro* avant d'être réinjectés en grande quantité au patient. La nature polyclonale des TILs leur permet, dans la majorité des cas, de reconnaître de nombreux antigènes tumoraux. Une réponse clinique objective au stade métastatique est obtenue dans 40 à 72% des cas mais de courte durée (23,24).

Cette stratégie thérapeutique présente deux avantages par rapport aux lymphocytes T spécifiques (clones T) : leur utilisation n'est pas soumise à une restriction HLA ni à l'expression antigénique par la tumeur et leur production en six semaines reste compatible dans la prise en charge de patients au stade métastatique du mélanome.

Cependant, que l'on utilise l'une ou l'autre stratégie thérapeutique, on se heurte à un phénomène d'immunotolérance du microenvironnement induit par les cellules tumorales. Ceci conduit à leur échappement au système immunitaire.



**Figure 4 : Procédé de production de TILs** : extraction à partir d'une métastase de mélanome (le plus souvent ganglionnaire), enrichissement et amplification in vitro puis injection au patient dans un délai de 4 à 6 semaines

#### 4. MECANISMES IDENTIFIES ABOUTISSANT A LA PRODUCTION DE LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES/REACTIFS INEFFICACES

Au-delà du rôle joué par l'instabilité génétique et l'épigénétique, différents mécanismes ont pu être identifiés comme capables d'inhiber la fonction cytotoxique des lymphocytes T.

Ces mécanismes sont à la fois intrinsèques et extrinsèques à la tumeur (25).

- Mécanismes intrinsèques : perte d'expression des antigènes de tumeurs (Melan-A, gp100, tyrosinase, etc.), de molécules intervenant dans la présentation d'antigènes (B7-1 et B7-2) ou des antigènes d'histocompatibilité (CMH de classe I et II), résistance à l'apoptose par l'expression de protéines inhibitrices (famille des IAPs), expression de ligands activant des récepteurs inhibiteurs de l'activité lymphocytaire : PD-L1, CD200...
- Mécanismes extrinsèques : sécrétion plus importante de cytokines immunosuppressives (TGF- $\beta$ , IL-10, VEGF, taux faible d'IL-2, IL-12, interféron type I), infiltration du microenvironnement par des cellules immunosuppressives : cellules myéloïdes, plasmocytoïdes, macrophages tolérogéniques, lymphocytes T régulateurs, déprivation en nutriments et hypoxie par l'action de l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO).

Il apparaît donc essentiel d'identifier ces mécanismes d'immunosuppression dans le mélanome et de les contrecarrer afin de potentialiser l'efficacité des approches par immunothérapie notamment par des traitements combinés.

Ainsi, il a été proposé des associations TILs et interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (26), TILs et anti-PD-1.

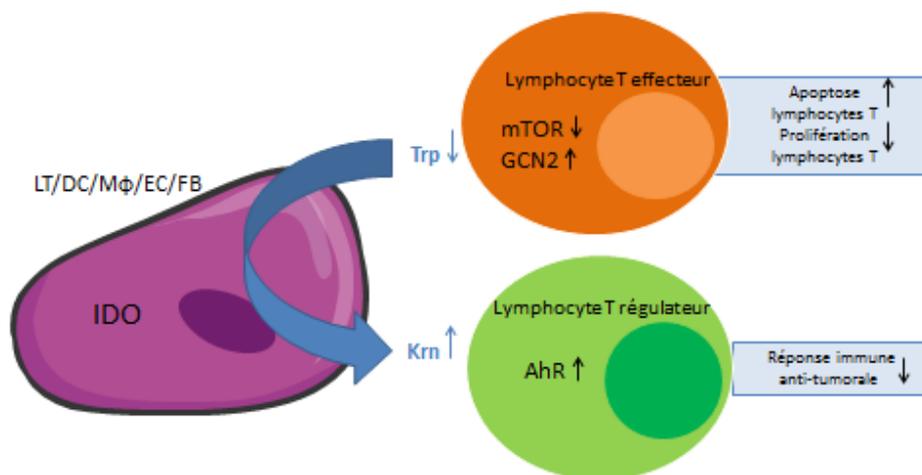
IDO semble être aussi une approche thérapeutique intéressante pour un traitement combiné avec des essais thérapeutiques en cours, de phase I/II mais également de phase III associant inhibiteur d'IDO et anti PD-1 (pembrolizumab ou nivolumab).

## 5. MECANISME D'ACTION DE L'IDO

L'IDO est une enzyme intracellulaire dont il existe 2 isoformes, IDO-1 et IDO-2 mais l'activité de l'IDO-2 (27) par un polymorphisme génétique serait abolie chez 50% des caucasiens et avec un profil d'expression plus restreint. Son activité enzymatique entraîne un déficit local en tryptophane en le dégradant en kynurénine. Or le tryptophane est un acide aminé indispensable à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T (28). Ce déficit en tryptophane aboutit à une immunosuppression locale du microenvironnement en agissant directement sur les lymphocytes T (autophagie par inhibition de la voie mTOR, apoptose par la voie 3-HAA (acide 3-hydroxy anthranilique) (29,30) et activation de GCN2 (*general control nondepressible 2*). Cette immunosuppression est également secondaire à l'augmentation de la kynurénine et de ses métabolites. Cela induit une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 par les cellules dendritiques, le recrutement de lymphocytes T régulateurs, de cellules dendritiques régulatrices, une régulation négative des cellules NK et une activation de cellules macrophagiques immunosuppressives notamment par liaison au AhR (*aryl hydrocarbon receptor*).

Une forte expression de l'IDO a été rapportée par de multiples études dans plusieurs cancers (colorectaux, du poumon, de la prostate, de l'ovaire, de l'endomètre, de l'œsophage et dans les leucémies) incluant le mélanome, avec une corrélation entre l'intensité de l'expression et un mauvais pronostic (31).

La sécrétion intracellulaire de l'IDO serait induite notamment par l'IFN- $\gamma$  comme cela a été montré sur modèle murin (32).



**Figure 5 : Mécanisme d'action d'IDO d'après Brochez et al.**

Types cellulaires exprimant IDO : LT : lymphocyte T, DC : cellule dendritique, Mφ : macrophage, EC : cellule endothéliale, FB : fibroblaste

## 6. CELLULES SECRETANT DE L'IDO INTRACELLULAIRE

Au sein du microenvironnement, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales sécrètent l'IDO. Cette dernière peut aussi être produite par les cellules tumorales notamment de mélanome à l'état basal, prouvé par la mesure du ratio kynurénine/tryptophane qui est diminué en présence d'un inhibiteur de l'IDO (33).

Notre équipe a montré que l'expression de PD-L1 (ligand de PD-1 conduisant à l'inhibition des lymphocytes) par des cellules de mélanome pouvait être induite par l'IDO.

Ainsi, les tumeurs mélaniques sécrétant de l'IDO intracellulaire pourraient inhiber l'action cytotoxique des TILs par un mécanisme indirect passant par l'induction de l'expression du ligand PD-L1 par la cellule tumorale qui inhibe le lymphocyte T en se liant au récepteur PD-1.

Par ailleurs, il a été démontré dans de nombreuses études la valeur pronostique négative d'IDO dans le mélanome mais également dans les autres cancers où une forte expression a été rapportée (34-40).

Plus l'expression de l'IDO est élevée, plus le risque de récurrence est important et la survie globale diminuée, que l'on soit dans le ganglion sentinelle ou dans le mélanome primitif (41).

## 7. RATIONNEL DE L'ETUDE

L'IDO est aujourd'hui au cœur de l'actualité thérapeutique dans le mélanome. Elle apparaît comme une cible intéressante permettant de potentialiser l'effet des immunothérapies (42). Les thérapies combinées tendent à se développer dans le mélanome métastatique, comme cela a été développé avec l'association anti-PD-1 et inhibiteur d'IDO, afin de lutter au mieux contre le phénomène d'immunotolérance.

Notre équipe a récemment montré que l'expression d'IDO1 était associée à une augmentation du risque de rechute et de décès chez des patients atteints de mélanome de stade III. Les travaux ont été réalisés *in vitro* sur lignées tumorales de mélanome établies à partir de métastases ganglionnaires (43).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'utilisation d'inhibiteurs de l'IDO en thérapeutique, en combinaison avec les TILs, pourrait potentialiser l'efficacité thérapeutique de ces derniers, en limitant l'échappement des cellules tumorales. L'immunothérapie adoptive par TILs (44) ayant fait ses preuves au stade adjuvant mais également métastatique (23) et dans l'hypothèse où l'IDO représente un des mécanismes d'échappement des cellules de mélanome, nous envisageons de réaliser un protocole thérapeutique associant inhibiteur de l'IDO et TILs. Dans cet objectif, une étude *in vitro* paraît un prérequis indispensable.

La combinaison thérapeutique par un inhibiteur de l'IDO et TILs diminuerait la résistance immunologique plus importante au stade métastatique et permettrait ainsi une meilleure réponse au traitement sur une durée plus prolongée.

## 8. OBJECTIFS

Devant l'hypothèse que l'IDO inhibe l'activité cytotoxique des TILs dans le microenvironnement tumoral, notre objectif principal était d'étudier si un inhibiteur de l'IDO pourrait potentialiser l'effet cytotoxique des TILs en utilisant comme modèle des lignées de mélanome en vue de la mise en place d'un essai clinique combinant TILs + inhibiteur de l'IDO chez les patients au stade métastatique du mélanome. Nous avons étudié les modulations d'expression induites par l'IDO des molécules interagissant dans la reconnaissance de l'antigène tumoral entre la cellule de mélanome et le lymphocyte T (CD80, CD86, PD-L1,-L2, CMH I et CMH II) et d'antigènes de différenciation mélanocytaire. Nous avons également mesuré la concentration de chimiokines chémoattractantes pour les LT telles CXCL9 et CXCL10 et celle d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1. MATERIEL

#### a. *Lignées tumorales de mélanome*

Les lignées tumorales étaient obtenues à partir de ganglions métastatiques de mélanome de patients suivis dans le service d'onco-dermatologie du CHU de Nantes, à l'issue d'un curage ganglionnaire. Les patients étaient inclus dans les différents protocoles cliniques basés sur le transfert adoptif de TILs (étude de phase I/II TILs au stade adjuvant versus IL-2 seule (45), étude d'un traitement compassionnel par TILs et une étude de phase III TILs multicentrique au stade adjuvant chez les patients avec un seul ganglion envahi (46), (en cours de publication). Un consentement libre, éclairé et écrit était obtenu pour tous les patients pour l'utilisation des prélèvements opératoires à visée de recherche scientifique, validé par le comité d'éthique et les autorités de santé.

Après curage, une partie du ganglion était analysée en anatomo-pathologie pour la confirmation de la récurrence du mélanome et l'autre partie était destinée à l'Unité de Thérapie Cellulaire et Génique du CHU de Nantes, pour la production des TILs à usage thérapeutique et l'établissement de la lignée tumorale.

Des fragments de ganglions de 1 à 2 mm<sup>3</sup> étaient mis en culture dans du milieu RPMI (Sigma) enrichi en SVF 10% (Invitrogen) et L-glutamine 1% (Cambrex).

Les lignées étaient obtenues en 2 à 6 mois puis congelées.

Sept lignées ont été sélectionnées selon leur statut mutationnel BRAF et NRAS (4 lignées BRAF V600E et 3 lignées sauvages pour les gènes BRAF et NRAS) afin d'évaluer si le statut BRAF influence l'effet de l'inhibiteur d'IDO. Les caractéristiques des lignées sont regroupées dans le tableau I.

Lignées	M125	M301	M314	M241	M284	M305	M379
Âge patient (années)	50	59	55	48	43	45	48
Sexe	M	M	M	M	F	M	M
Type histologique	SSM sur nævus préexistant	nodulaire	SSM	SSM	SSM sur nævus préexistant	SSM	SSM
Date primitif	13/07/1994	03/06/2005	05/07/2005	01/03/2003	08/04/2004	29/09/1998	19/02/2007
Date curage	22/06/1995	07/10/2005	10/03/2006	19/06/2003	09/05/2005	21/11/2005	15/02/2008
Nombre de ganglions envahis	6	1	1	1	1	1	1
Efraction capsulaire	non	non	Oui	oui	Oui	non	non
BRAF	WT	WT	WT	V600E	V600E	V600E	V600E
NRAS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
CKIT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Breslow (mm)	3,68	>3	0,8	0,88	1,74	1,2	2,7
Ulcération	oui	oui	Non	non	Oui	non	non
Croissance	rapide	rapide	Lente	rapide	rapide	rapide	rapide
Taille des cellules	moyenne	P à M	M à G	P à M	P à M	M à G	M à G
Adhérence	adhérentes fusiformes	semi adhérentes	adhérentes fusiformes	semi adhérentes	semi adhérentes et en suspension	semi adhérentes	adhérentes

**Tableau I : caractéristiques des patients et des lignées de mélanome**

M : masculin, F : féminin, SSM : superficial spreading melanoma, ACL : acro-lentigineux, WT : wild type, P : petite, M : moyenne, G : grande

*b. Lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)*

Les TILs autologues réactifs de chacune des lignées étaient conservés en cryotubes à l'azote. Ils étaient issus des injections dans le cadre des protocoles cliniques TILs. Ils étaient décongelés la veille de leur utilisation, remis en culture dans du milieu X-Vivo 15 en présence d'IL-2 à 150 U/ml finale.

**2. METHODES**

*a. Culture cellulaire*

Les lignées étaient conservées dans des cryotubes à -80°C ou dans l'azote. Les cellules étaient décongelées au bain marie à 37°C puis reprises dans 20 ml d'un milieu composé de RPMI + 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Après centrifugation 7 minutes à 1500 tours/minute, le culot cellulaire était repris dans 6 ml de milieu de culture RPMI + 10% SVF et transféré dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup> qui était placé dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Les flacons étaient observés tous les jours et les cultures entretenues 2 à 3 fois par semaine. Le milieu de culture était changé selon son aspect. Si les cellules étaient à confluence, un passage était réalisé par grattage ou par décollement. Les cellules étaient décollées à l'aide de PBS-EDTA puis ensemencées dans plusieurs flacons de même taille ou de taille supérieure ou congelées en milieu SVF + 10% DMSO.

Le jour de la manipulation, les cellules étaient décollées puis marquées par un colorant vital (l'éosine) et comptées sur cellule de Malassez. Le nombre de cellules nécessaires pour la manipulation était prélevé et déposé à raison de  $1 \times 10^6$  cellules par puits de plaque 6 puits.

Nous avons analysé 6 conditions de culture pour chaque lignée:

1/ lignée de mélanome seule (témoin négatif)

2/ lignée + IFN- $\gamma$  500 U/ml 48h (témoin sans inhibiteur IDO, l'IFN- $\gamma$  permet de reproduire l'état inflammatoire du microenvironnement tumoral)

3/ lignée + 1-MT 500 $\mu$ M 24h (témoin 1 inhibiteur IDO)

4/ lignée + 1-MT 1mM 24h (témoin 2 inhibiteur IDO)

5/ lignée + IFN- $\gamma$  500 U/ml 48h + 1-MT 500 $\mu$ M 24h (condition d'intérêt avec évaluation de l'effet dose de l'inhibiteur d'IDO)

6/ lignée + IFN- $\gamma$  500 U/ml 48h + 1-MT 1mM 24h (condition d'intérêt avec évaluation de l'effet dose de l'inhibiteur d'IDO)

#### *b. Inhibition d'IDO*

Afin d'inhiber l'activité d'IDO, du 1-méthyl-L-tryptophane (1-MT) (Sigma-Aldrich) en solution à 20 mM, pH 9-10 était ajouté au milieu de culture des différentes conditions à J3 aux concentrations de 500  $\mu$ M et 1mM, pendant 24h comme cela avait été précédemment testé dans notre laboratoire. Les inhibiteurs d'IDO étudiés en essai clinique n'étaient pas disponibles pour notre étude.

#### *c. Co-cultures TILs/lignée tumorale autologue*

Les cellules de mélanome étaient mises en culture en plaque 6 puits comme décrit précédemment. Après incubation en présence d'IFN- $\gamma$  et/ou 1-MT, les cellules tumorales étaient décollées au PBS-EDTA puis lavées afin d'éliminer les inhibiteurs du milieu. Elles étaient ensuite reprises dans du milieu X-Vivo 15 puis comptées et réparties sur une plaque 96 puits à raison de 300 000 cellules par puits dans 100  $\mu$ l.

Dans chaque puits était ajouté : 100 000 TILs autologues dans 100 µl de milieu X-Vivo 15 et 20 µl de Bréfeldine A à 10 µg/ml final. La Bréfeldine A est un inhibiteur des protéines de transport permettant de piéger l'IFN- $\gamma$  sécrété par les lymphocytes. Des témoins positifs étaient réalisés en stimulant les TILs par du PMA CaI permettant une sécrétion maximale d'IFN- $\gamma$ . Les co-cultures étaient incubées pendant 6h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Un double marquage CD3 membranaire et IFN- $\gamma$  intracellulaire était réalisé par la suite.

*d. Cytométrie de flux*

Les cellules étaient analysées en cytométrie de flux. Les marqueurs étudiés étaient des marqueurs membranaires (molécules interagissant dans la reconnaissance de l'antigène entre la cellule tumorale et le lymphocyte T) : CMH de classe I, CMH de classe II, CD80, CD86, PD-L1, PD-L2. L'expression d'IDO était mesurée par un marquage intra-cytoplasmique d'IDO-1 après fixation et perméabilisation des cellules.

Après incubation en présence d'IFN- $\gamma$  et/ou 1-MT (déplétion de l'IFN- $\gamma$  après incubation de 48h avant ajout du 1-MT pendant 24h) les cellules préalablement décollées au PBS-EDTA étaient déposées dans les puits d'une plaque 96 puits à raison d'environ 200 000 cellules par puits. Le marquage membranaire était ensuite réalisé en déposant 30µl d'anticorps dilué à 4°C pendant 30 min. Les cellules étaient ensuite lavées et centrifugées à 1800 tours/min à 4°C pendant 3 minutes, puis reprises dans 200µl de PBS pour la lecture à l'aide d'un cytomètre FACS CALIBUR (plateforme CytoCell). Le marquage intracellulaire d'IDO-1 était réalisé après fixation (fixation buffer, ebioscience) et perméabilisation (permeabilization buffer, ebioscience) des cellules puis incubation avec 30µl d'anticorps dilué à 4°C pendant 30 min. Un nouveau lavage était alors effectué avant reprise des cellules dans 200µl de PBS et lecture au cytomètre. Dans le même temps, le pourcentage de TILs spécifiques de la lignée tumorale autologue était analysé en déterminant l'expression intra-cytoplasmique d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD3. Les 10 conditions suivantes étaient étudiées en cytométrie de flux (FACS CALIBUR) afin de mesurer le pourcentage de TILs autologues réactifs vis-à-vis de la lignée tumorale par l'expression intra-cytoplasmique d'IFN- $\gamma$ .

1/ TIL seuls, fixés (témoin négatif)

2/ TILs marqués CD3\*APC, fixés (témoin contrôle LT)

3/ TILs + PMA + CaI, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin positif avec sécrétion

aspécifique d'INF- $\gamma$  induite par le PMA-CaI)

4/ TILs + PMA + CaI, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin positif, double marquage)

5/ TILs + lignée tumorale non traitée, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin négatif avec lignée)

6/ TILs + lignée tumorale traitée IFN- $\gamma$  500U/ml 48h, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin sans inhibiteur IDO, l'IFN- $\gamma$  permet de reproduire l'état inflammatoire du microenvironnement tumoral)

7/ TILs + lignée tumorale traitée 1-MT 24h 500 $\mu$ M, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin 1 inhibiteur IDO)

8/ TILs + lignée tumorale traitée 1-MT 24h 1mM, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (témoin 2 inhibiteur IDO)

9/ TILs + lignée tumorale traitée IFN- $\gamma$  500U/ml 48h + 1-MT 24h 500 $\mu$ M, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (condition d'intérêt avec évaluation de l'effet dose de l'inhibiteur d'IDO)

10/ TILs + lignée tumorale traitée IFN- $\gamma$  500U/ml 48h + 1-MT 24h 1mM, marqués CD3, fixés, perméabilisés, marqués IFN- $\gamma$  \*PE (condition d'intérêt avec évaluation de l'effet dose de l'inhibiteur d'IDO)

Pour chacune des conditions, 10 000 évènements étaient enregistrés. L'analyse des données était réalisée par le logiciel CellQuestPro (plateforme Cytocell).

Les différents anticorps utilisés sont regroupés dans le tableau II.

Anticorps	Type de marquage	Fluorochrome	Isotype	Fournisseur	Référence	Hybridome	Dilution utilisée	Clone	Incubation
isotype irrelevant IgG1K	MB	FITC	IgG1K	Becton Dickinson	555748	souris	1/40	MOPC-21	30 min
HLA A,B,C (CMH I)	MB	FITC	IgG1K	Becton Dickinson	557348	souris	1/40	G46-2.6	30 min
HLA DP, DQ, DR (CMH II)	MB	FITC	IgG1K	Becton Dickinson	550853	souris	1/40	TU39	30 min
isotype irrelevant IgG1K	MB et IC	PE	IgG1K	Becton Dickinson	555749	souris	1/10	MOPC-21	30 min
IDO	IC	PE	IgG1K	Thermofisher	12-9477-42	souris	1/40	eyedio	30 min
CD273/PDL2	MB	PE	IgG1K	Becton Dickinson	558066	souris	1/10	MIH18	30 min
PD-L1/B7H1/CD274	MB	PE	IgG1K	Becton Dickinson	557924	souris	1/10	MIH1	30 min
CD80	MB	PE	IgG1K	Thermofisher	12-0809-42	souris	1/40	2D10.4	30 min
isotype irrelevant IgG2Bk	MB	PE	IgG2bK	Becton Dickinson	555058	souris	1/40	27-35	30 min
CD86	MB	PE	IgG2bK	Thermofisher	12-0869-42	souris	1/40	IT2.2	30 min
IFN- $\gamma$	IC	PE	IgG1K	Becton Dickinson	554552	souris	1/25	4S.B3	30 min
CD3	MB	APC	IgG1K	Becton Dickinson	555751	souris	1/40	UCHT1	30 min
Melan-A	IC	PE	IgG1K	Santa Cruz Biotechnology	20032	souris	1/40	A103	30 min
gp100	IC	PE	IgG1K	Santa Cruz Biotechnology	59305	souris	1/40	HMB45	30 min

**Tableau II : Caractéristiques des anticorps utilisés en cytométrie**  
MB: membranaire, IC: intracellulaire

*e. Dosage des cytokines et chimiokines*

Les surnageants de culture étaient conservés dans des aliquots de 1,5 ml à -20°C. La cytokine IL-6 et les chimiokines CXCL9 et CXCL10 ont été dosées dans les surnageants par test ELISA (Invitrogen et ThermoScientific).

Pour chacune des 7 lignées les 6 conditions suivantes ont été étudiées : lignée seule, lignée + INF- $\gamma$  500UI/ml, lignée + 1MT 500 $\mu$ M, lignée + 1MT 1mM, lignée + INF- $\gamma$  500UI/ml + 1MT 500 $\mu$ M, lignée + INF- $\gamma$  500UI/ml + 1MT 1mM.

La lecture des plaques a été effectuée par un Multiskan FC et les concentrations sont exprimées en pg/ml et ng/ml.

*f. Mesure des rapports kynurénine/tryptophane*

Les concentrations en tryptophane et en kynurénine (produit de dégradation du tryptophane) étaient déterminées par test ELISA (ImmuSmol). Un kit ELISA permettait la détermination de la concentration en tryptophane dans les échantillons après précipitation et dérivatisation. Un second kit ELISA permettait la détermination de la concentration en kynurénine (produit de dégradation du tryptophane dans la voie IDO) dans les échantillons après acylation. Le rapport kynurénine/tryptophane était ensuite calculé (plus le rapport était élevé, plus IDO était exprimée).

### III. RESULTATS

#### 1. PRESENTATION DES RESULTATS

Les résultats de l'analyse de modulation d'expression des antigènes par l'inhibiteur d'IDO, de la spécificité des TILs, du dosage des cytokines et chimiokines et de l'expression d'IDO sont présentés de manière descriptive : données brutes et histogrammes avec calcul des médianes pour chaque lignée (n=7) et condition (n=6), devant un nombre faible de lignées.

#### 2. EXPRESSION DE L'IDO

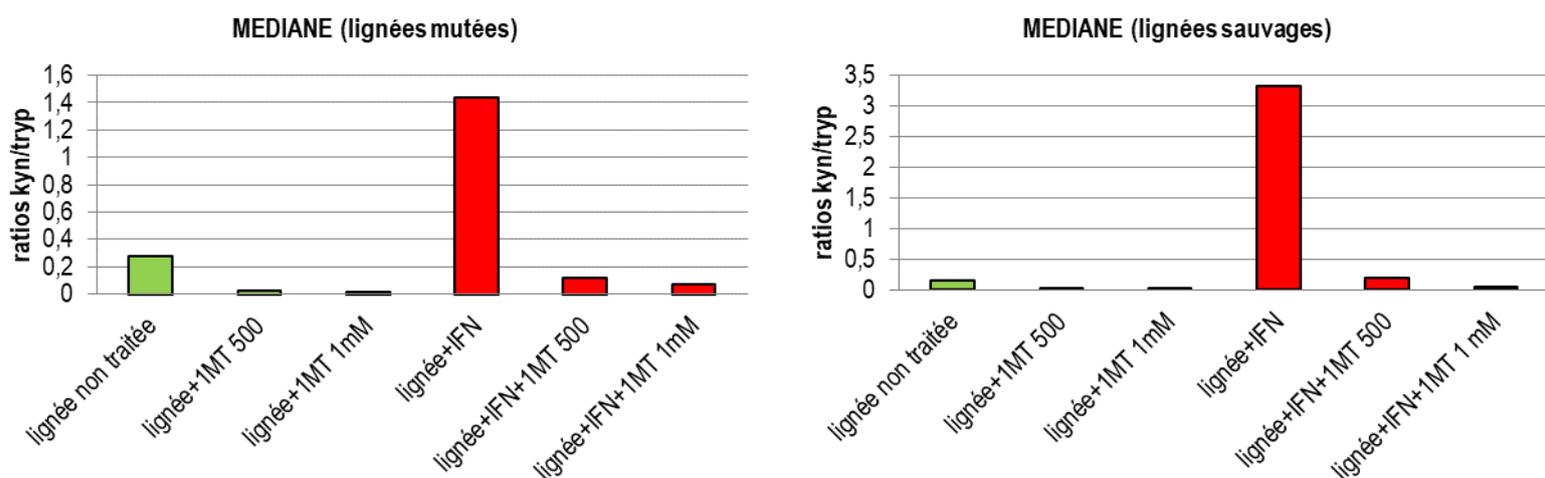
##### a. Ratios kynurénine/tryptophane

Le ratio kynurénine/tryptophane est d'autant plus élevé que l'activité de catabolisation du tryptophane est importante, reflétant l'activité d'IDO. Chacune des mesures a été réalisée en duplicate.

Il est à noter que certaines lignées expriment IDO à l'état basal à de faibles taux (lignées mutées et sauvages) (Tableau III). L'activité de l'enzyme est diminuée par l'inhibiteur d'IDO de façon dose dépendante sans influence du statut BRAF. Pour la condition lignée + IFN- $\gamma$  + 1MT 500 $\mu$ M, la médiane est de 0,1165 contre 0,0737 en présence de l'inhibiteur d'IDO à 1mM pour les lignées mutées. Concernant les lignées sauvages, après stimulation par IFN- $\gamma$ , les médianes diminuent de 0,199 (1MT 500  $\mu$ M) à 0,05 (1MT 1mM) respectivement (Figure 6).

ratios kyn/tryp	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301(P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	0,357	0,203	0,56	0,017	0,148	0,254	0,035
lignée+1MT 500 $\mu$ M	0,03	0,014	0,042	0,002	0,007	0,015	0,001
lignée+1MT 1mM	0,035	0,017	0,014	0,007	0,019	0,007	0,004
lignée+IFN	5,538	1,328	0,802	1,538	7,78	3,33	0,36
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	0,684	0,125	0,108	0,036	0,231	0,199	0,022
lignée+IFN+1MT 1mM	0,107	0,013	0,128	0,04	0,056	0,079	0,018

Tableau III : Ratios kynurénine/tryptophane



**Figure 6 : Ratios kynurénine sur tryptophane, lignées mutées BRAF V600E et sauvages (médianes)**

■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

### b. Cytométrie de flux

Pour chacune des 7 lignées, pour les 6 conditions testées, le marquage direct par anticorps anti-IDO est négatif.

### 3. ANALYSE PHENOTYPIQUE DES LIGNEES

L'expression de 8 marqueurs sur les cellules de mélanome seules, en présence d'IFN- $\gamma$ , en présence de 1MT à 500  $\mu$ M et à 1 mM et en présence d'IFN- $\gamma$  et de 1MT aux 2 concentrations a été étudiée :

- CMH-I et CMH-II, impliqués dans la reconnaissance de la cellule tumorale par le lymphocyte T
- PD-L1, ligand inhibiteur de l'activation du lymphocyte via PD-1
- PD-L2, autre ligand de PD-1

Ceci a été réalisé pour 7 lignées, 4 avec la mutation BRAF V600E et 3 sauvages.

- 2 antigènes de différenciation mélanocytaire, intracellulaires : Melan-A et gp100

Ceci a été réalisé pour 2 lignées, une avec la mutation BRAF V600E (M379) et une sauvage (M314).

Nous avons regardé l'effet du 1MT sur les lignées en comparant les lignées mutées aux lignées sauvages.

a. *CMH-I*

i. *Lignées mutées BRAF V600E : pourcentage et MFI*

A l'état basal un pourcentage élevé de cellules exprime le CMH-I, entre 55,6 et 83,86 % (Tableau IV, Figure 7).

L'inhibiteur d'IDO augmente cette expression de façon dose dépendante (dose croissante), que les lignées soient stimulées ou non par l'IFN- $\gamma$  (Tableau V). En l'absence d'IFN- $\gamma$ , la médiane de MFI passe de 25,52 (1MT 500 $\mu$ M) à 39,425 (1MT 1mM) et après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , de 78,11 (1MT 500 $\mu$ M) à 96,665 (1MT 1mM).

ii. *Lignées sauvages : pourcentage et MFI*

A l'état basal un pourcentage élevé de cellules expriment le CMH-I, entre 85,42 et 86,09 % (Tableau IV, Figure 7).

En présence de l'inhibiteur d'IDO et après stimulation par IFN- $\gamma$ , cette augmentation d'expression est moins marquée que pour les lignées mutées (Tableau V) mais avec une médiane de MFI à l'état basal plus élevée à 65,53. En l'absence d'IFN- $\gamma$ , la médiane de MFI passe de 42,24 (1MT 500 $\mu$ M) à 67,92 (1MT 1mM) et après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , de 59,87 (1MT 500 $\mu$ M) à 87,19 (1MT 1mM).

% de cellules marquées	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	55,6	73,23	76,82	83,86	85,42	86,09	85,74
lignée+1MT 500 $\mu$ M	67,72	68,76	84,16	79,34	79,2	80,67	80,86
lignée+1MT 1mM	67,64	62,19	66,58	70,34	73,58	89,19	82,18
lignée+IFN	72,7	79	81,99	85,47	84,06	91,17	85,42
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	74,83	82,28	74,46	82,81	82,65	82,46	80,8
lignée+IFN+1MT 1mM	66,98	78,4	75,45	82,92	82,97	79,92	70,63

Tableau IV : Pourcentage de cellules exprimant le CMH-I

MFI	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	17,91	17,42	35,86	21,26	65,53	33,93	80,78
lignée+1MT 500 $\mu$ M	24,45	24,24	63,11	26,59	42,24	25,36	114,75
lignée+1MT 1mM	46,31	29,29	54,82	32,54	51,13	67,92	129,56
lignée+IFN	16,6	22,44	67,5	68,45	65,2	41,59	133,86
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	43,55	61,16	121,37	95,06	59,87	36,35	164,78
lignée+IFN+1MT 1mM	47,31	90,33	126,81	103	87,19	45,04	145,89

Tableau V : Intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour le CMH-I

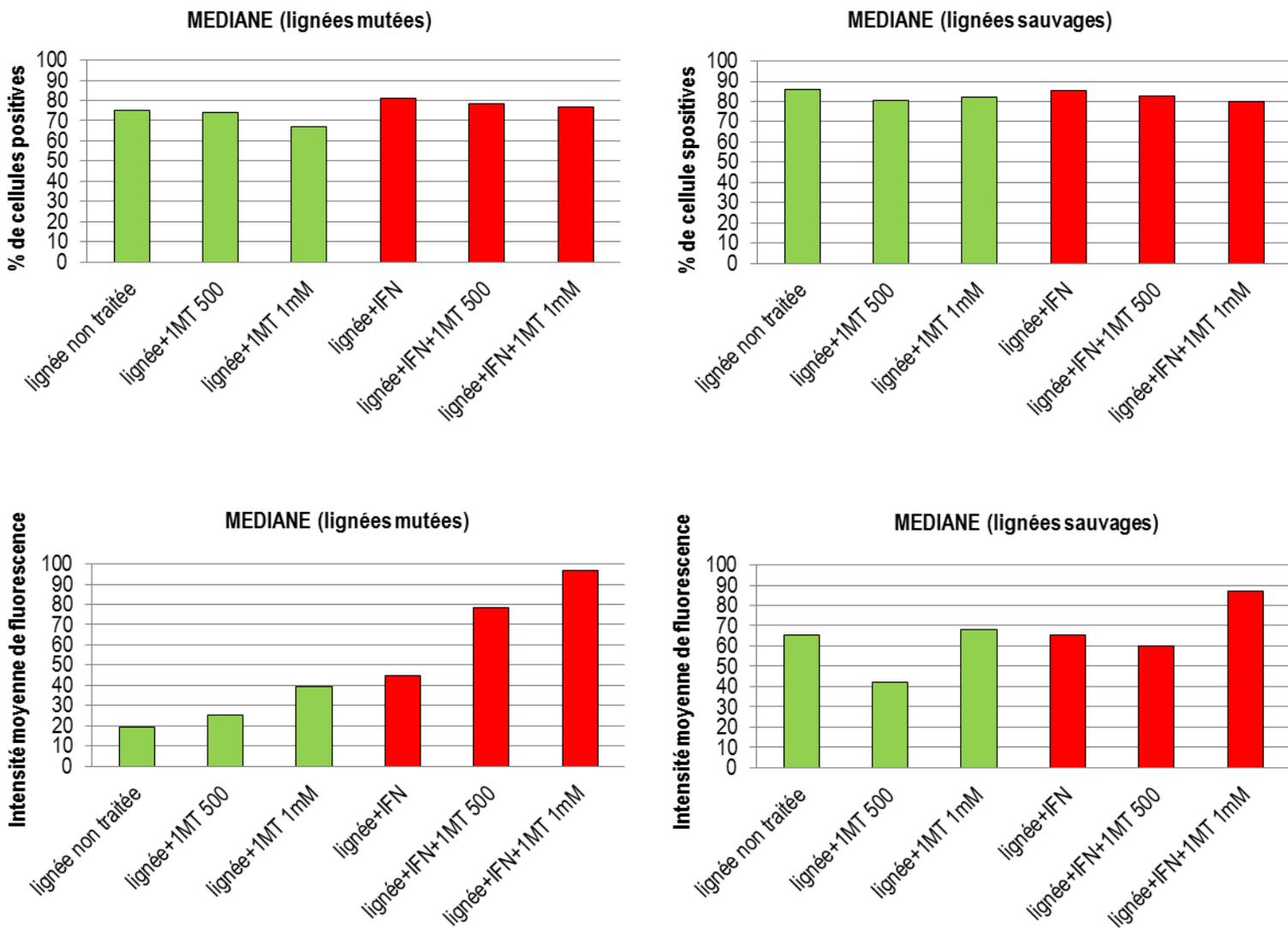


Figure 7 : Pourcentage de cellules positives et intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour le CMH-I, lignées mutées BRAF V600E et sauvages (médianes) ■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

*b. CMH-II*

*i. Lignées mutées BRAF V600E : pourcentage et MFI*

A l'état basal, seule la lignée M305 avec 77,35 % de cellules, exprime le CMH-II (Tableau VI).

Après stimulation par IFN- $\gamma$ , nous observons une modulation de l'intensité d'expression (MFI) du CMH-II avec une MFI médiane de 27,015.

L'ajout de l'inhibiteur d'IDO, en présence d'IFN- $\gamma$ , augmente l'expression du CMH-II de

façon dose dépendante (dose croissante) (Tableau VII) avec des médianes de MFI passant de 66,77 (1MT 500  $\mu$ M) à 77,48 (1MT 1mM) (Figure 8).

ii. *Lignées sauvages : pourcentage et MFI*

A l'état basal, une expression du CMH-II est observée entre 9,81 et 84,03% (Tableau VI). De même que pour les lignées mutées, l'ajout du 1MT augmente l'expression du CMH-II de façon dose dépendante (dose croissante), que les cellules soient stimulées ou non par l'IFN- $\gamma$  en MFI (Tableau VII). Les médianes de MFI passent de 47,11 (1MT 500  $\mu$ M) à 111,04 (1MT 1mM) sans IFN- $\gamma$  et de 91,91 (1MT 500  $\mu$ M) à 140,03 (1MT 1mM), après stimulation par l'IFN- $\gamma$  (Figure 8).

% de cellules marquées	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	0,92	0	77,35	0	9,81	84,03	78,68
lignée+1MT 500 $\mu$ M	1,94	0	65,34	0	10,18	75,79	64,77
lignée+1MT 1mM	0,92	0	67,1	0	5,88	89,08	65,42
lignée+IFN	67,51	70,85	76,59	22,9	70,81	91,07	76,61
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	71,92	78,42	71,48	33,81	77,26	84,91	72,86
lignée+IFN+1MT 1mM	66,51	75,21	72,14	32,14	73,87	78,71	64,23

**Tableau VI : Pourcentage de cellules exprimant le CMH-II**

MFI	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	80,58	0	43,01	0	63,21	57,36	29,37
lignée+1MT 500 $\mu$ M	92,02	0	57,14	0	87,68	47,11	36,97
lignée+1MT 1mM	101,04	0	62,98	0	111,04	161,55	38,98
lignée+IFN	18,28	28,24	155,6	25,79	45,98	61,49	82,06
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	39,11	86,47	323,01	47,07	91,91	78,07	139,85
lignée+IFN+1MT 1mM	49,09	105,87	367,98	47,87	147,79	84,3	140,03

**Tableau VII : Intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour le CMH-II**

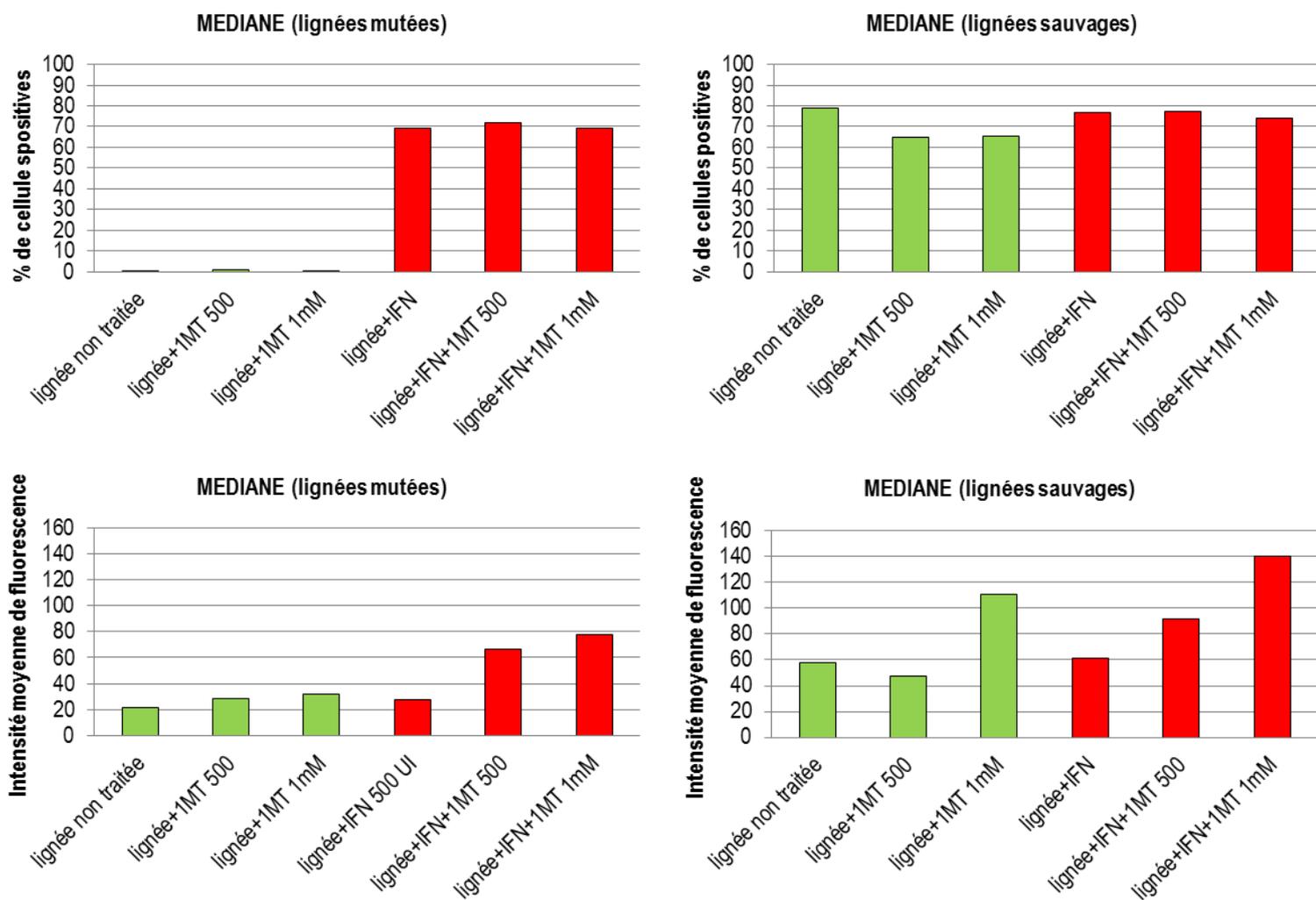


Figure 8 : Pourcentage de cellules positives et intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour le CMH-II, lignées mutées BRAF V600E et sauvages (médianes) ■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

c. PD-L1

i. Lignées mutées BRAF V600E

A l'état basal, les cellules n'expriment pas le PD-L1 (Tableau VIII).

Après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , nous observons une induction de l'expression de PD-L1, exprimé entre 62,3 et 78,13%. L'inhibiteur d'IDO entraîne une diminution de son expression, avec une médiane passant de 71,23 (IFN- $\gamma$ ) 28,43 (IFN- $\gamma$  + 1MT 1mM) (Figure 9).

ii. Lignées sauvages

A l'état basal, les cellules n'expriment pas le PD-L1.

Après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , nous observons également une induction de l'expression de

PD-L1 avec un pourcentage de cellules positives entre 64,53 et 88,46 % (Tableau VIII). Comme pour les lignées mutées, l'inhibiteur d'IDO diminue de son expression, avec une médiane passant de 77,86 (IFN- $\gamma$ ) à 51,63 (IFN- $\gamma$  + 1MT 1mM) (Figure 9). Nous observons la négativation de l'expression du PD-L1 pour M314 et sa diminution pour M125 et M301.

% de cellules marquées	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 500 $\mu$ M	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 1mM	0	0	0	0	0	0	0
lignée+IFN	62,3	70,81	71,65	78,13	77,86	88,46	64,53
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	0	69,25	63,99	0	71,07	50,84	0
lignée+IFN+1MT 1mM	0	61,18	56,86	0	53,04	51,63	0

Tableau VIII : Pourcentage de cellules exprimant le PD-L1

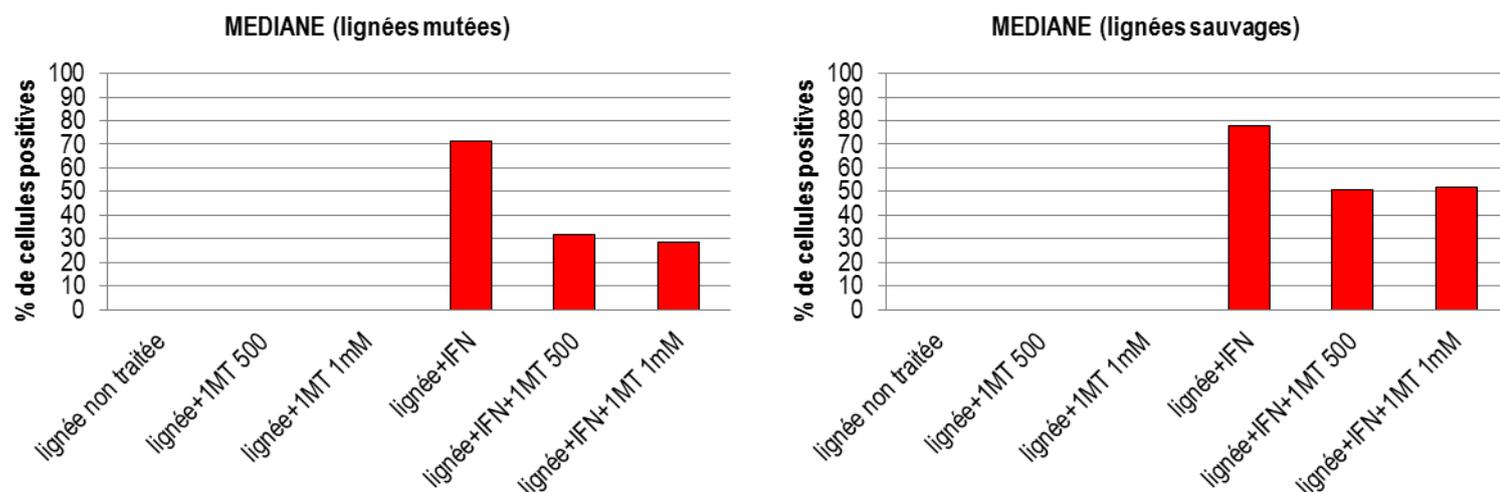


Figure 9 : Pourcentage de cellules positives pour le PD-L1, lignées mutées BRAF V600E et sauvages (médianes)

■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

#### d. Melan-A

L'IFN- $\gamma$  et l'inhibiteur d'IDO diminueraient son expression de façon dose dépendante, sans influence du statut mutationnel BRAF (Figure10). Les minimums d'expression sont observés pour les conditions avec IFN- $\gamma$  + 1MT 1mM avec un pourcentage de cellules positives de 73,48 et 53,28 % contre 92,62 et 70,65 % à l'état basal (Tableau IX).

	BRAF +	Sauvage
% de cellules marquées	M379 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	92,62	70,65
lignée+1MT 500µM	88,97	74,22
lignée+1MT 1mM	89,15	66,89
lignée+IFN	91,14	69,61
lignée+IFN+1MT 500µM	81,07	63,85
lignée+IFN+1MT 1mM	73,48	53,28

Tableau IX : Pourcentage de cellules exprimant le Melan-A

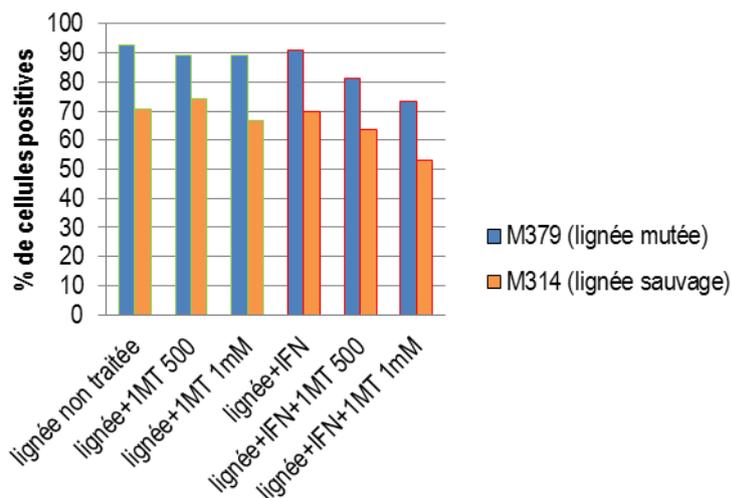


Figure 10 : Pourcentage de cellules positives pour le Melan-A

e. *gp100*

Il est exprimé par les deux lignées avec à l'état basal un pourcentage d'expression à 80,53 et 78,85%. L'effet de l'IFN- $\gamma$  et de l'inhibiteur d'IDO est minime, pour l'IFN- $\gamma$  seul, taux d'expression à 73,4 et 87,71% et pour la condition IFN- $\gamma$  + 1MT 1mM à 78,92 et 60,38 % (Tableau X). Nous n'avons pas observé d'influence du statut mutationnel BRAF (Figure 11).

	BRAF +	Sauvage
% de cellules marquées	M379 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	80,53	78,85
lignée+1MT 500µM	74,37	76,47
lignée+1MT 1mM	76,1	76,93
lignée+IFN	73,4	87,71
lignée+IFN+1MT 500µM	80,57	78,97
lignée+IFN+1MT 1mM	78,92	60,38

Tableau X : Pourcentage de cellules exprimant le gp100

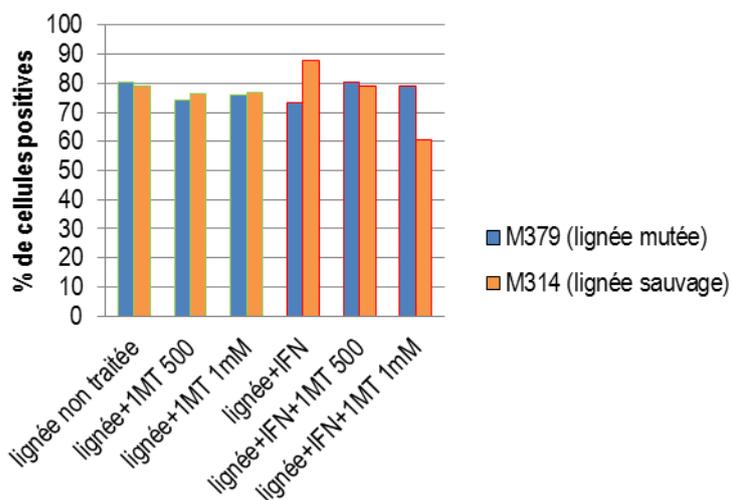


Figure 11 : Pourcentage de cellules positives pour le gp100

f. *Autres marqueurs : PD-L2, CD80, CD86*

Pour chacune des 7 lignées, pour les 6 conditions testées, il n'a pas été mis en évidence d'expression du PD-L2, du CD80 ni du CD86 en cytométrie de flux.

#### 4. CYTOKINES ET CHIMIOKINES

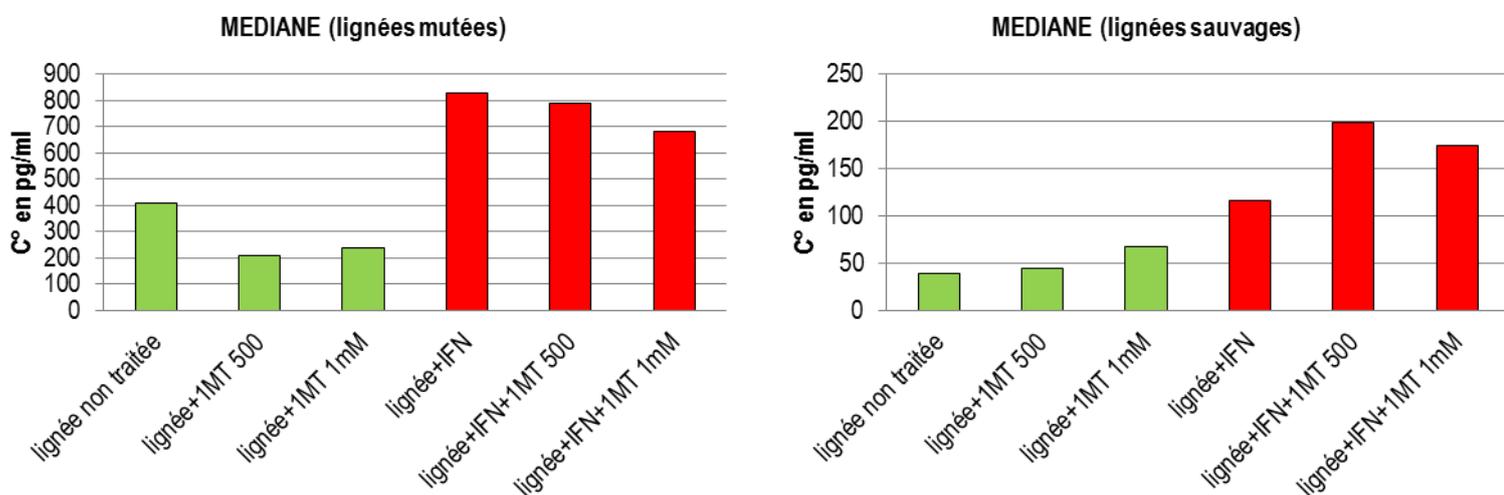
L'ensemble des mesures a été réalisée en duplicate.

a. *IL-6*

Nous mettons en évidence une concentration en IL-6 supérieure à l'état basal pour les lignées mutées BRAF V600E (Tableau XI), médiane de 409,79 pg/ml contre 38,9 pg/ml pour les lignées sauvages (Figure 12). Uniquement pour les lignées mutées, nous observons que sa production est diminuée par l'inhibiteur d'IDO. A l'état basal, les médianes mesurées sont : pour les lignées non traitées, de 409,79 pg/ml et pour les lignées en présence de 1MT 1mM, de 236,01 pg/ml. De même, pour les conditions après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , les médianes passent de 825,035 à 681,765 pg/ml (condition avec le 1MT 1mM).

C° en pg/ml	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	3,23	816,35	953,14	1,52	27,29	38,9	199,66
lignée+1MT 500	0,64	2102,52	1646,54	3,53	116,35	74,7	246,36
lignée+1MT 1mM	0,107	415,41	2236,16	1,08	29,34	44,07	136,23
lignée+IFN	0,34	470,44	1583,65	1,58	29,13	66,99	119,53
lignée+IFN+1MT 500	0,79	1569,5	2195,28	4,69	198,6	83,23	252,77
lignée+IFN+1MT 1mM	3,09	1383,96	1357,23	6,3	174,64	89,47	245,76

**Tableau XI : Concentrations en IL-6 en pg/ml**



**Figure 12 : Concentrations en IL-6 en pg/ml, lignées mutées BRAF V600E et sauvages (médianes)**  
■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

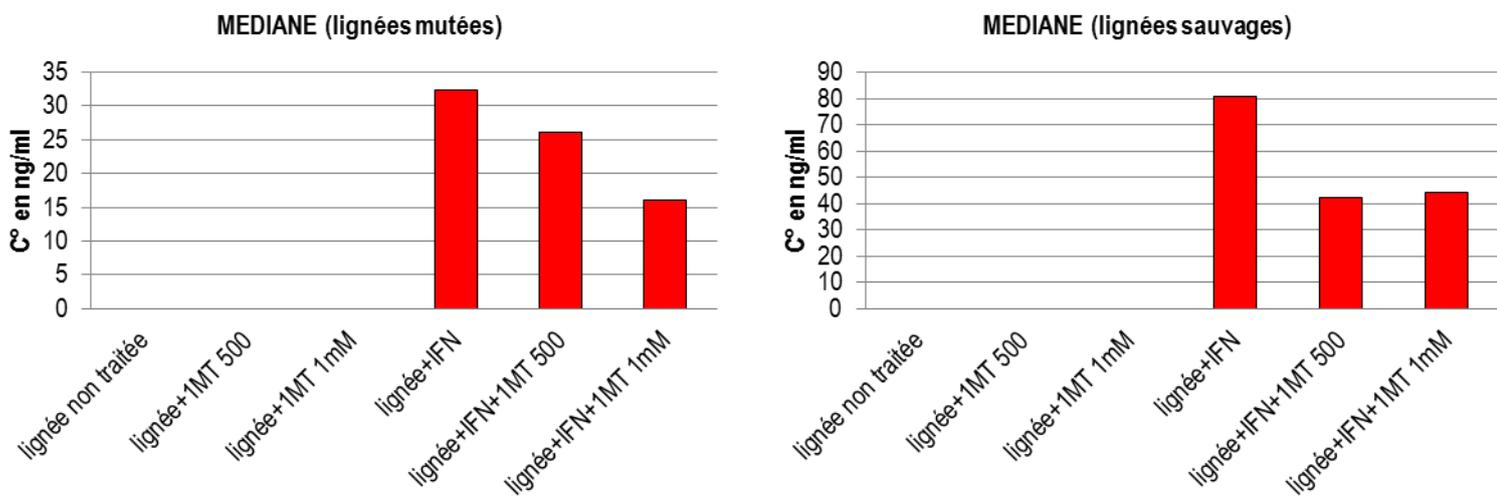
### b. CXCL9

Le CXCL9 n'est pas détecté à l'état basal mais il est fortement induit par l'IFN- $\gamma$  (Tableau XII). L'inhibiteur d'IDO entraîne une diminution de sa production, à la fois pour les lignées mutées et sauvages. Les médianes observées pour les lignées mutées après stimulation par l'IFN- $\gamma$  étaient de 32,33 ng/ml et après traitement par le 1MT 1mM, de 16,08 ng/ml. Pour les lignées sauvages, les médianes diminuaient de 80,58 ng/ml à 44 ng/ml (résultats pour les mêmes conditions).

La médiane pour les lignées mutées a été calculée sans la lignée M379 devant des valeurs nulles pour toutes les conditions (Figure 13).

C° en ng/ml	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301(P12)	M314 (P10)
lignée non traitée	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 500 $\mu$ M	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 1mM	0	0	0	0	0	0	0
lignée+IFN	8,5	263,42	32,33	0	119,83	24,92	80,58
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	15,08	443,75	26,08	0	146,33	26,83	42,33
lignée+IFN+1MT 1mM	7,83	491,58	16,08	0	86	40	44

**Tableau XII : Concentrations en CXCL9 en ng/ml**



**Figure 13 : Concentrations en CXCL9 en ng/ml, lignées mutées BRAF V600E (sans M379) et sauvages (médianes)** ■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

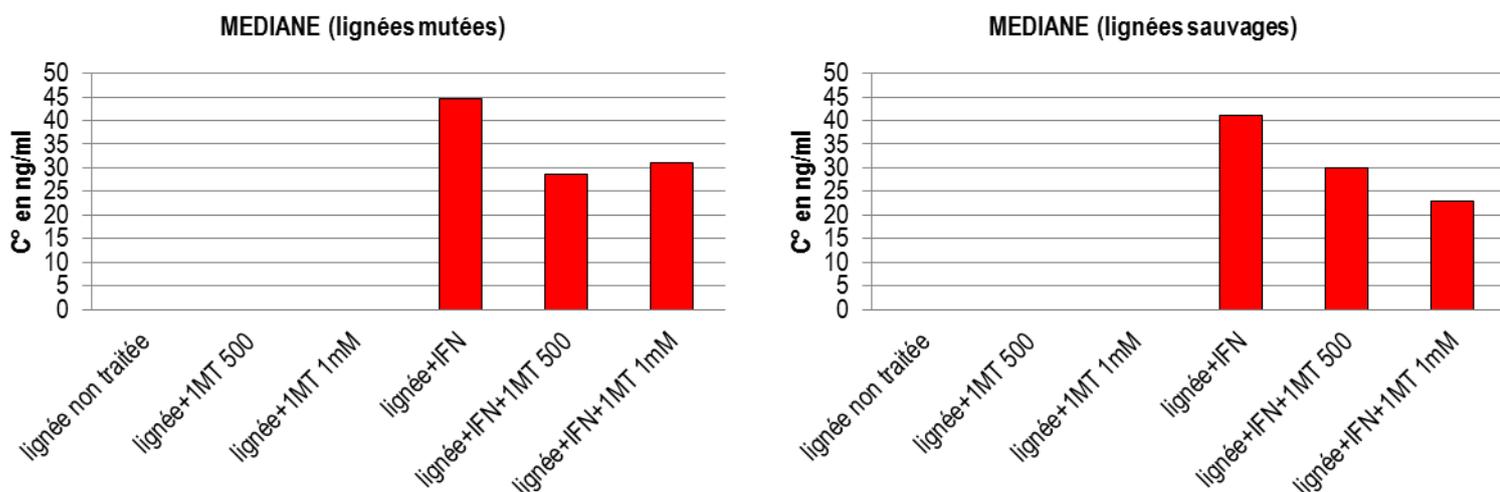
c. *CXCL10*

Le CXCL10 n'est pas détecté à l'état basal mais il est fortement induit par l'IFN- $\gamma$  (Tableau XIII). Sa production était également diminuée en présence de l'inhibiteur d'IDO, avec des résultats similaires à ceux observés pour le CXCL9.

La médiane pour les lignées mutées a été calculée sans la lignée M379 devant des valeurs nulles pour toutes les conditions (Figure 14).

C° en ng/ml	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
lignée seule	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 500 $\mu$ M	0	0	0	0	0	0	0
lignée+1MT 1mM	0	0	0	0	0	0	0
lignée+IFN	8,99	49,05	44,66	0	41,07	43,99	35,42
lignée+IFN+1MT 500 $\mu$ M	0	34,65	28,62	0	40,85	30,02	6,67
lignée+IFN+1MT 1mM	0	31,01	35,33	0	26,88	22,9	3,14

**Tableau XIII : Concentration CXCL10 en ng/ml**



**Figure 14 : Concentrations en CXCL10 en ng/ml, lignées mutées BRAF V600E (sans M379) et sauvages (médianes)** ■ Lignée non stimulée ■ Lignée stimulée préalablement par IFN- $\gamma$  500 UI/ml

## 5. SPECIFICITE DES TILs AUTOLOGUES

Le pourcentage de TILs spécifiques marqués CD3+/INF- $\gamma$  variait d'une lignée à l'autre entre 1,2 et 17,7 %.

### a. Lignées mutées BRAF V600E

L'inhibiteur d'IDO n'a permis d'observer une variation de l'activité des TILs. Les médianes pour les différentes conditions étaient comprises entre 3,9% (lignées traitées par le 1MT 500  $\mu$ M) et 5,24% (lignées non traitées) (Figure 15).

Le PMA-CaI entraîne une sécrétion aspécifique de l'IFN- $\gamma$  intracytoplasmique par les TILs avec des pourcentages entre 9,85 et 57,02 % (Tableau XIV).

### b. Lignées sauvages

Nous observons qu'après stimulation par l'IFN- $\gamma$ , l'inhibiteur d'IDO entraîne une augmentation de l'activité des TILs de façon dose dépendante pour les lignées, M301 et M125 (Figures 16 et 17).

Le PMA-CaI entraîne une sécrétion aspécifique de l'IFN- $\gamma$  intracytoplasmique par les TILs avec des pourcentages entre 20,11 et 53,2% (Tableau XIV).

L'ensemble des données est également exprimé en valeur absolue (Tableau XV et Figure 17).

% de cellules marquées	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
TILs-PMA-Cal	37,96	57,02	53,37	9,85	53,2	52,31	20,11
TILs-lignée non traitée	5,9	17,7	3,97	1,2	1,85	4,26	4,43
TILs-lignée+1MT 500 µM	4,29	19,42	6,19	0,93	1,22	7,19	4,78
TILs-lignée+1MT 1mM	3,2	20,01	4,6	2,4	1,58	5,32	5,8
TILs-lignée+IFN	4,67	24,92	4,95	1,18	0,45	8,01	4,37
TILs-lignée+IFN+1MT 500µM	3,71	26,72	4,36	1,57	1,35	11,25	4,63
TILs-lignée+IFN+1MT 1mM	3,5	22,05	4,54	2,24	1,66	13,17	6,16

**Tableau XIV : Pourcentage de TILs exprimant l'IFN-γ intracytoplasmique**

nombre absolu en milliards de cellules	Lignées mutées BRAF V600E				Lignées sauvages		
	M284 (P7)	M241 (P11)	M305 (P13)	M379 (P12)	M125 (P8)	M301 (P12)	M314 (P10)
TILs-PMA-Cal	2,57	2,91	3,47	0,39	6,38	1,86	0,47
TILs-lignée non traitée	0,40	0,90	0,26	0,05	0,22	0,15	0,10
TILs-lignée+1MT 500 µM	0,29	0,99	0,40	0,04	0,15	0,26	0,11
TILs-lignée+1MT 1mM	0,22	1,02	0,30	0,10	0,19	0,19	0,13
TILs-lignée+IFN	0,32	1,27	0,32	0,05	0,05	0,29	0,10
TILs-lignée+IFN+1MT 500µM	0,25	1,36	0,28	0,06	0,16	0,40	0,11
TILs-lignée+IFN+1MT 1mM	0,24	1,12	0,30	0,09	0,20	0,47	0,14

**Tableau XV : Nombre TILs en valeur absolue exprimant l'IFN-γ intracytoplasmique (exprimé en milliards de cellules)**

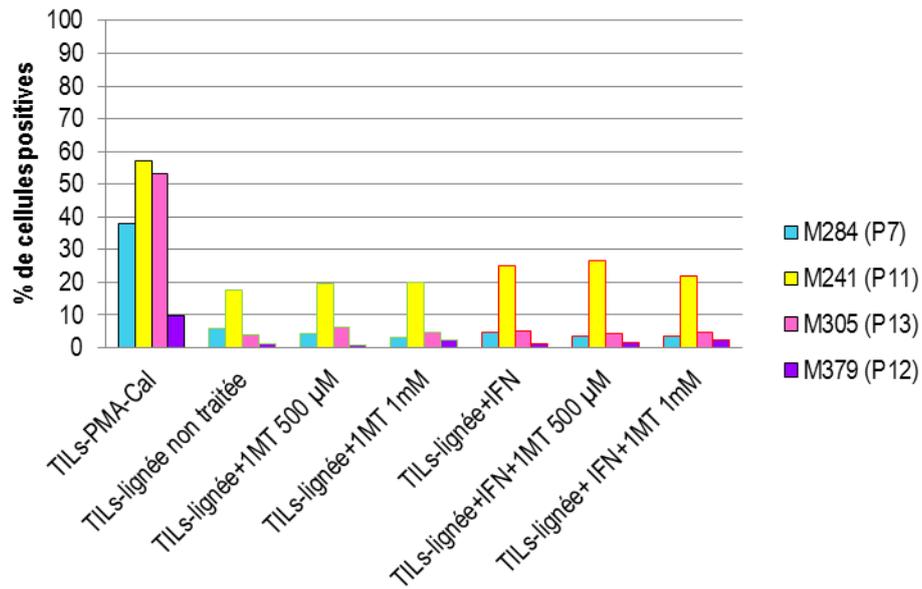


Figure 15 : Pourcentage de TILs exprimant l'IFN- $\gamma$  intracytoplasmique, lignées mutées BRAF V600E

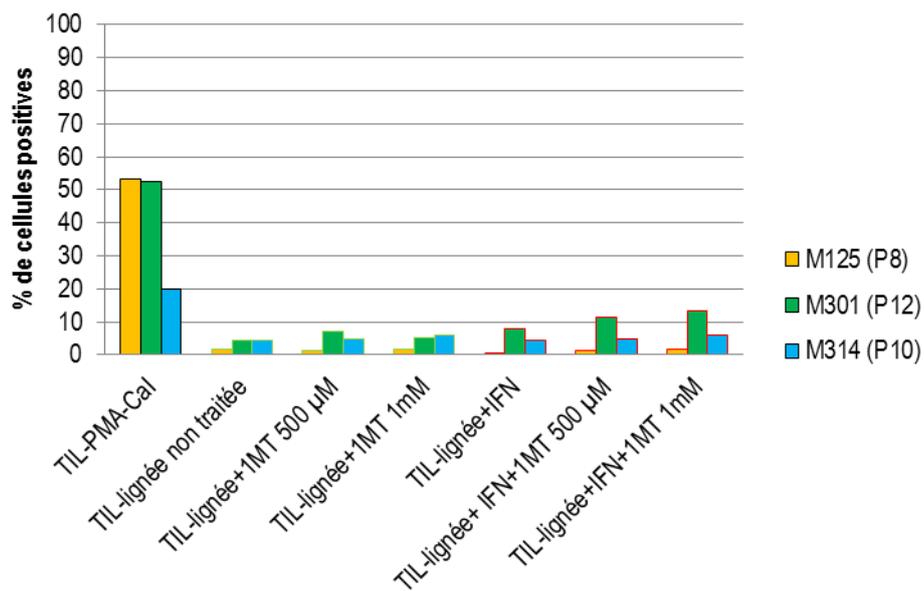
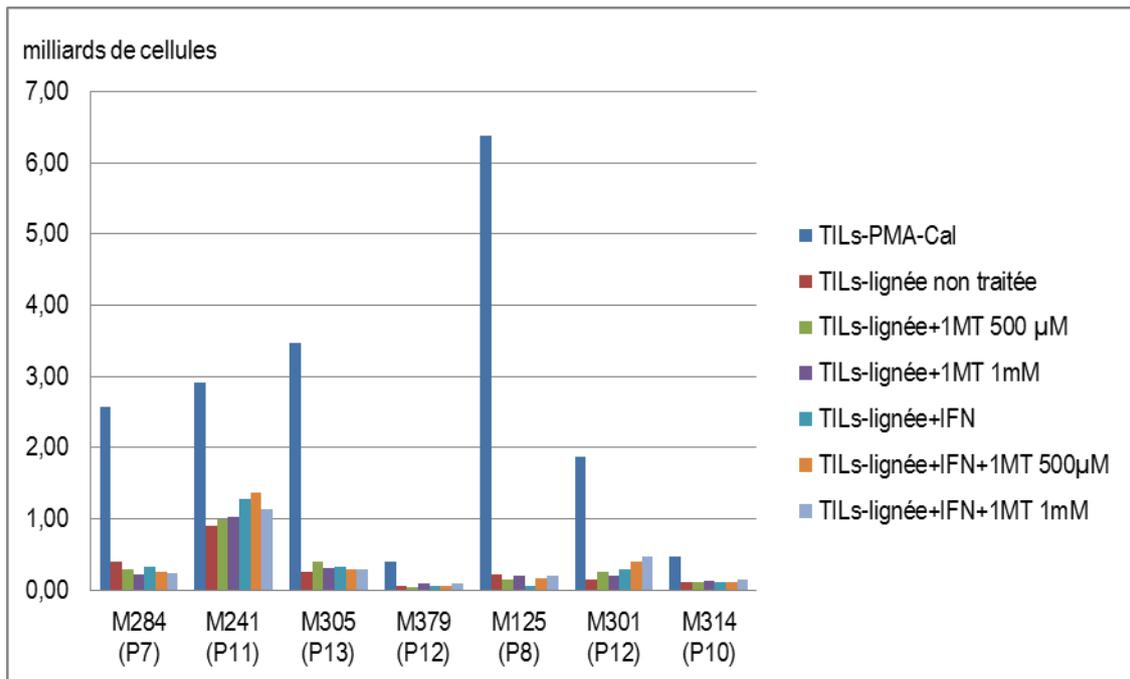


Figure 16 : Pourcentage de TILs exprimant l'IFN- $\gamma$  intracytoplasmique, lignées sauvages



**Figure 17 : Nombre TILs en valeur absolue exprimant l'IFN- $\gamma$  intracytoplasmique (exprimé en milliards de cellules)**

Lignées mutées BRAF V600E (4): M284, M2421, M305 et M379

Lignées sauvages (3): M125, M301 et M314

## IV. DISCUSSION

Dans le mélanome métastatique aujourd'hui, deux principaux axes thérapeutiques sont proposés : l'immunothérapie et les thérapies ciblées. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés exclusivement à l'immunothérapie et plus particulièrement au transfert adoptif de TILs associé à un inhibiteur d'IDO. IDO est une enzyme intracellulaire qui participe à l'inhibition de l'activité cytotoxique des TILs au sein du microenvironnement tumoral.

L'hypothèse de cette étude était qu'un inhibiteur d'IDO permettrait le maintien, voire augmenterait l'activité cytotoxique des TILs. Nous avons étudié l'expression d'antigènes intracytoplasmiques de différenciation mélanocytaires et membranaires impliqués dans l'interaction lymphocytes T et cellules de mélanome comme les antigènes d'histocompatibilité (HLA de classe I et II) et le PD-L1. L'induction du CMH-I et -II pourrait en effet intervenir dans le maintien de cette activité antitumorale par les TILs, mesurée par la production intracytoplasmique d'IFN- $\gamma$ . Nous avons également évalué l'activité d'IDO par calcul du ratio kynurénine/tryptophane et l'expression d'IDO par marquage direct des cellules tumorales.

Le ratio kynurénine/tryptophane est d'autant plus élevé que l'activité de catabolisation du tryptophane est importante et donc que l'enzyme est présente et active.

L'analyse montre une activité de dégradation du tryptophane plus importante après traitement par l'IFN- $\gamma$  pour l'ensemble des lignées (47). Il est à noter que cinq lignées expriment IDO à l'état basal à de faibles taux. L'activité de l'enzyme est diminuée par l'inhibiteur d'IDO de façon dose dépendante sans influence du statut BRAF.

Le marquage intracellulaire direct d'IDO était négatif en cytométrie de flux. Nous pouvons soulever la question de la sensibilité de l'anticorps pour son antigène. La cytométrie pourrait ne pas être une méthode adéquate pour l'étude de l'activité d'IDO à laquelle il faut privilégier l'ELISA et l'immunohistochimie comme il est souvent réalisé dans la littérature.

Dans un article récent (48), l'expression d'IDO en immunohistochimie n'a été observée que dans 2/34 (6%) des métastases à distance de mélanome confirmant nos résultats obtenus avec des lignées cellulaires de mélanome (variation inter- et intra-individuelle).

Concernant l'expression du CMH-I et -II, ce travail met en évidence une augmentation, voire une induction de leur expression mesurée en intensité moyenne de fluorescence par l'inhibiteur d'IDO de façon dose dépendante, moins marquée pour le CMH-I et pour les lignées sauvages (médianes). Pour ces marquages, la MFI nous semble plus pertinente que le pourcentage de cellules positives car elle reflète la quantité de molécules de CMH-I et de CMH-II à la surface d'une cellule plutôt que le nombre de cellules positives pour ces marqueurs, pourcentage déjà élevé à l'état basal pour le CMH-I.

Ainsi, l'inhibiteur d'IDO après stimulation des lignées par l'IFN- $\gamma$ , permettant de reproduire un état inflammatoire semblable au microenvironnement tumoral, induit la réexpression des molécules du CMH-I et -II, sans réel impact du statut mutationnel. Ceci favoriserait alors la reconnaissance des cellules tumorales par les TILs.

Notre étude montre que PD-L1 n'est exprimé par aucune lignée de mélanome à l'état basal. Son expression est induite par l'IFN- $\gamma$ . Ceci corrobore les données de la littérature (49). Il a en effet été démontré que plus le microenvironnement tumoral avait un profil « inflammatoire », plus l'expression de PD-L1 était importante. L'inhibition de PD-L1 par l'inhibiteur d'IDO n'est pas suffisante pour augmenter l'activité cytotoxique des TILs.

Nous rappelons que notre équipe avait démontré qu'IDO pouvait induire l'expression de PD-L1 (33).

Nous n'avons pas observé l'expression de PD-L2, CD80 ni CD86.

Pour ce qui est des antigènes de différenciation mélanocytaire, le gp100 est exprimé par les deux lignées sans modification d'expression induite par l'inhibiteur d'IDO. Par contre pour Melan-A, l'inhibiteur d'IDO diminuerait son expression de façon dose dépendante.

Il faudrait étendre l'étude de l'expression de Melan-A à d'autres lignées afin de confirmer ou non la tendance à cette diminution d'expression induite par l'inhibiteur d'IDO ce qui impliquerait que l'effet de l'inhibiteur d'IDO serait plus délétère en diminuant l'expression de Melan-A.

Le statut mutationnel BRAF n'influencerait pas l'expression des antigènes de différenciation mélanocytaire.

Nous avons mesuré la quantité d'IL-6 dans les surnageants de culture avec observation d'une augmentation de sa production en présence d'IFN- $\gamma$  notamment pour les lignées mutées. De plus, sa production est diminuée par l'inhibiteur d'IDO. Il est intéressant de noter qu'à l'état basal les lignées mutées BRAF V600E produisent davantage d'IL-6 que les lignées sauvages.

Cela rejoint les données de Becker et al. qui décrivaient une induction de l'expression et de l'excrétion d'IL-6 induite par BRAF pour activer STAT3 (50). STAT3 serait un régulateur de la transcription de Mcl1, protéine antiapoptotique, médié par la mutation BRAF V600E.

Quant aux chimiokines CXCL9 et CXCL10, elles n'étaient pas détectées à l'état basal. L'induction par l'IFN- $\gamma$  est transitoire, variable selon les lignées et sans influence du statut mutationnel BRAF.

Il a été rapporté que des taux élevés de lymphocytes infiltrant la tumeur étaient associés à la production de CXCL9 et CXCL10 (51,52). Dans notre travail, nous observons la même conclusion concernant la lignée M241 qui présente presque 20% de TILs spécifiques et les plus fortes concentrations en chimiokines chémoattractantes. De plus, Mullins et *al.* ont démontré que l'expression de CXCR3 (récepteur aux chimiokines CXCL9 et CXCL10) par les lymphocytes T activés, était corrélée à une meilleure survie dans le mélanome de stade III avec métastases locorégionales (53). Pour notre patient M241, il a malheureusement récidivé un an après son curage et est décédé 6 mois plus tard.

Mauldin et *al.* rapportent, sur modèle murin, une induction transitoire de la production de CXCL9 et CXCL10 par l'IFN- $\gamma$  avec un pic de concentration à douze heures et un retour aux taux basaux à 36h. Aussi, nous ne pouvons conclure à un effet de l'inhibiteur d'IDO.

Ces chimiokines sembleraient pouvoir ne pas seulement agir sur les lymphocytes T activés. Il a été observé après expansion *in vitro* des NK une modification de leurs récepteurs de surface. Notamment, Wennerberg et *al.* (54), rapportent une uprégulation de CXCR3 et ainsi une réponse au gradient de ces chimiokines (CXCL9 et CXCL10) dans le microenvironnement tumoral, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

L'IFN- $\gamma$  possède des effets immunologiques opposés. Il permet l'augmentation de la production des chimiokines chémoattractantes pour les TILs mais sans que cela soit suffisant pour obtenir une réponse anti tumorale suffisante (55). Il présente également des effets immunorégulateurs notamment en induisant l'expression d'IDO et de PD-L1.

L'élément limitant principal de notre travail est le nombre de lignées sélectionnées, 4 avec la mutation BRAF V600E et 3 sauvages. Nos critères de sélection étaient la nécessité d'avoir la lignée tumorale, les TILs autologues correspondants et le statut mutationnel connu.

Nos résultats montrent que l'inhibiteur d'IDO n'agit que dans un environnement pro-inflammatoire (reproduit ici par l'IFN- $\gamma$ ).

Premièrement, il stimule l'activité de dégradation du tryptophane de manière dose dépendante.

Deuxièmement, l'inhibiteur d'IDO augmente l'expression du CMH-I et -II, molécules jouant un rôle crucial dans la reconnaissance TILs-cellules tumorales.

Troisièmement, il diminue l'expression de PD-L1, ligand de PD-1, inhibiteur de l'activité lymphocytaire et donc de la réactivité des TILs.

Dans notre étude, l'activité cytotoxique des TILs, exprimée par la production intracytoplasmique d'IFN-  $\gamma$  n'est augmentée que pour les lignées M301 et M125. Ces 2 lignées présentent cependant le même profil d'expression pour le CMH-I, le CMH-II et PD-L1 que les 5 autres lignées étudiées. Bien que l'inhibiteur d'IDO puisse stimuler l'activité cytotoxique des TILs, ce mécanisme ne semble pas en lien avec la modulation d'expression de CMH-I et -II ni de PD-L1 par les cellules tumorales.

Concernant le statut BRAF, nous n'avons pas observé de différence d'effet de l'inhibiteur d'IDO, que les cellules soient ou non mutées BRAF V600E, sans aucune donnée retrouvée dans la littérature.

A ce jour, plusieurs études développées dans le mélanome avec les inhibiteurs d'IDO ont été interrompues précocement devant le peu de bénéfices apportés. L'analyse intermédiaire de survie globale dans l'étude de phase III associant pembrolizumab (anti-PD-1) plus Epacadostat (inhibiteur d'IDO), dans le mélanome de stade III non résecable et de stade IV, n'a pas montré de supériorité par rapport au pembrolizumab plus placebo (56).

Les résultats de notre étude et ceux de littérature montrent cependant qu'IDO joue un rôle clé dans le mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire. Cependant, ces résultats *in vitro* ne sont pas reproductibles *in vivo* en termes de lutte anti-tumorale.

Ceci suggère que d'autres mécanismes immunosuppresseurs au sein du microenvironnement tumoral restent encore à découvrir.

La recherche translationnelle apparaît comme essentielle afin de trouver les clés de cette immunotolérance et de nouvelles cibles. De nouveaux « checkpoints » inhibiteurs tels que TIGIT, LAG-3, TIM-3 sont étudiés et pourraient, dans les prochaines années, intégrer l'arsenal thérapeutique de prise en charge dans le mélanome (57).

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Incidence et mortalité - Réseau Mélanome Ouest [Internet]. Disponible sur: <https://www.reseau-melanome-ouest.com/melanome/incidence-et-mortalite-672.html>
2. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol.* 2016;136(6):1161-71.
3. Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV - Thésaurus - Ref : RECOMELATHES17. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Patients-atteints-de-melanome-de-stade-III-inoperable-ou-de-stade-IV-Thesaurus>
4. rapport\_strategie\_de\_diagnostic\_precoce\_du\_melanome.pdf. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport\\_strategie\\_de\\_diagnostic\\_precoce\\_du\\_melanome.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_strategie_de_diagnostic_precoce_du_melanome.pdf)
5. Bernard G, Alain D, Marc P, Géraldine J, Elif H, Thomas J, et al. ACTUALISATION DES DONNEES CONCERNANT LE MELANOME STADE III : NOUVELLES RECOMMANDATIONS DU GROUPE DE CANCEROLOGIE CUTANEE. :27. Disponible sur: <http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/actualisation-stade-iii-final-2-e928d59c0f16620acf73e7302e1f687c.pdf>
6. Cho H, Mariotto AB, Schwartz LM, Luo J, Woloshin S. When do changes in cancer survival mean progress? The insight from population incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* nov 2014;2014(49):187-97.
7. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* nov 2017;67(6):472-92.
8. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 déc 2009;27(36):6199-206.
9. 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.* 13 nov 2014;371(20):1877-88.
10. 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. *Lancet Lond Engl.* 1 août 2015;386(9992):444-51.

11. Khammari A, Labarrière N, Vignard V, Nguyen J-M, Pandolfino M-C, Knol AC, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *J Invest Dermatol.* déc 2009;129(12):2835-42.
12. Labarriere N, Fortun A, Bellec A, Khammari A, Dreno B, Saïagh S, et al. A full GMP process to select and amplify epitope-specific T lymphocytes for adoptive immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:932318.
13. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):69-74.
14. 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.* 30 juin 2011;364(26):2517-26.
15. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* avr 2015;16(4):375-84.
16. Robert C, Ribas A, Hamid O, Daud A, Wolchok JD, Joshua AM, et al. Durable Complete Response After Discontinuation of Pembrolizumab in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 28 déc 2017;JCO2017756270.
17. Ascierto PA, Long GV, Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Survival Outcomes in Patients With Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated With Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* 1 févr 2019;5(2):187-94.
18. Ribas A. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *N Engl J Med.* 28 juin 2012;366(26):2517-9.
19. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* nov 2018;19(11):1480-92.
20. 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.
21. Dréno B, Khammari A, Knol AC, Labarrière N. Melanoma: Cellular and vaccinal immunotherapy. 2014;(2):12.
22. McQuade JL, Homsí J, Torres-Cabala CA, Bassett R, Popuri RM, James ML, et al. A phase II trial of recombinant MAGE-A3 protein with immunostimulant AS15 in combination with high-dose Interleukin-2 (HDIL2) induction therapy in metastatic melanoma. *BMC Cancer.* 19 déc 2018;18(1):1274.
23. Saint-Jean M, Knol A-C, Volteau C, Quéreux G, Peuvrel L, Brocard A, et al. Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Advanced Melanoma Patients. *J Immunol Res.* 2018;2018:3530148.
24. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the

- treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 avr 2005;23(10):2346-57.
25. Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and « spontaneous » tumor regression. *Pathol Res Pract*. 15 janv 2010;206(1):1-8.
  26. Khammari A, Nguyen J-M, Saint-Jean M, Knol A-C, Pandolfino M-C, Quereux G, et al. Adoptive T cell therapy combined with intralesional administrations of TG1042 (adenovirus expressing interferon- $\gamma$ ) in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* CII. juill 2015;64(7):805-15.
  27. Metz R, DuHadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel Tryptophan Catabolic Enzyme IDO2 Is the Preferred Biochemical Target of the Antitumor Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitory Compound d-1-Methyl-Tryptophan. *Cancer Res*. 1 août 2007;67(15):7082-7.
  28. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 3 mai 1999;189(9):1363-72.
  29. McGaha TL, Huang L, Lemos H, Metz R, Mautino M, Prendergast GC, et al. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. sept 2012;249(1):135-57.
  30. Lee S-M, Lee Y-S, Choi J-H, Park S-G, Choi I-W, Joo Y-D, et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett*. 16 août 2010;132(1-2):53-60.
  31. Brochez L, Chevolet I, Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;76:167-82.
  32. Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med*. 1 juill 2013;210(7):1389-402.
  33. Frenard C, Knol A-C, Lemoigne M, Khammari A, Dreno B. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase expressed by foetal fibroblasts on melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2016;25(10):822-4.
  34. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle Georget Tex*. 15 juin 2009;8(12):1930-4.
  35. Chevolet I, Speeckaert R, Haspelslagh M, Neyns B, Krüse V, Schreuer M, et al. Peritumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression in melanoma: an early marker of resistance to immune control? *Br J Dermatol*. nov 2014;171(5):987-95.
  36. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*. juill 2004;114(2):280-90.
  37. Pelak MJ, Śnietura M, Lange D, Nikiel B, Pecka KM. The prognostic significance of indoleamine-2,3-dioxygenase and the receptors for transforming growth factor  $\beta$  and interferon  $\gamma$  in metastatic lymph nodes in malignant melanoma. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol*. déc 2015;66(4):376-82.

38. Ryan M, Crow J, Kahmke R, Fisher SR, Su Z, Lee WT. FoxP3 and indoleamine 2,3-dioxygenase immunoreactivity in sentinel nodes from melanoma patients. *Am J Otolaryngol.* déc 2014;35(6):689-94.
39. Speeckaert R, Vermaelen K, van Geel N, Autier P, Lambert J, Haspeslagh M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2012;48(13):2004-11.
40. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatol Basel Switz.* 2007;214(1):8-14.
41. Rubel F, Kern JS, Technau-Hafsi K, Uhrich S, Thoma K, Häcker G, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Primary Cutaneous Melanoma Correlates with Breslow Thickness and Is of Significant Prognostic Value for Progression-Free Survival. *J Invest Dermatol.* mars 2018;138(3):679-87.
42. Spranger S, Koblisch HK, Horton B, Scherle PA, Newton R, Gajewski TF. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer.* 2014;2:3.
43. Knol AC, Nguyen J-M, Pandolfino M-C, Denis MG, Khammari A, Dréno B. PD-L1 expression by tumor cell lines: A predictive marker in melanoma. *Exp Dermatol.* 2018;27(6):647-55.
44. Khammari A, Knol A-C, Nguyen J-M, Bossard C, Denis M-G, Pandolfino M-C, et al. Adoptive TIL transfer in the adjuvant setting for melanoma: long-term patient survival. *J Immunol Res.* 2014;2014:186212.
45. Dréno B, Nguyen J-M, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, et al. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother Cll.* nov 2002;51(10):539-46.
46. Tumor Infiltrating Lymphocytes Adjuvant Therapy of Melanoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00200577>
47. Banzola I, Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Manzella G, Chiarugi A, et al. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as Potential Biomarker of Prostate Cancer Progression. *Front Immunol.* 29 mai 2018;9.
48. Gide TN, Allanson BM, Menzies AM, Ferguson PM, Madore J, Saw RPM, et al. Inter- and intra-patient heterogeneity of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in primary and metastatic melanoma cells and the tumor microenvironment. *Histopathology.* 27 déc 2018;
49. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med.* 28 août 2013;5(200):200ra116.
50. Becker TM, Boyd SC, Mijatov B, Gowrishankar K, Snoyman S, Pupo GM, et al. Mutant B-RAF-Mcl-1 survival signaling depends on the STAT3 transcription factor. *Oncogene.* 27 févr 2014;33(9):1158-66.

51. Dengel LT, Norrod AG, Gregory BL, Clancy-Thompson E, Burdick MD, Strieter RM, et al. Interferons induce CXCR3-cognate chemokine production by human metastatic melanoma. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. déc 2010;33(9):965-74.
52. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 1 avr 2009;69(7):3077-85.
53. Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, Garbee CF, Shu J, Anderson SG, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res.* 1 nov 2004;64(21):7697-701.
54. Wennerberg E, Kremer V, Childs R, Lundqvist A. CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 1 févr 2015;64(2):225-35.
55. Mauldin IS, Wages NA, Stowman AM, Wang E, Smolkin ME, Olson WC, et al. Intratumoral interferon-gamma increases chemokine production but fails to increase T cell infiltration of human melanoma metastases. *Cancer Immunol Immunother.* 1 oct 2016 ;65(10):1189-99.
56. Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski T, Caglevic C, Dalle S, et al. Epcadostat (E) plus pembrolizumab (P) versus pembrolizumab alone in patients (pts) with unresectable or metastatic melanoma: Results of the phase 3 ECHO-301/KEYNOTE-252 study. *J Clin Oncol.* 20 mai 2018;36(15\_suppl):108.
57. Rotte A, Jin JY, Lemaire V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 janv 2018;29(1):71-83.

## VI. SHORT COMMUNICATION (\*)

DOES IDO INHIBITOR COMBINED WITH TILS INCREASE THEIR CYTOTOXIC ACTIVITY?

Authors: Sarah Le Naour<sup>1</sup>, Anne-Chantal Knol, Marie-Christine Pandolfino<sup>2</sup>, Amir Khammari<sup>1</sup>, Brigitte Dréno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dermato-cancerology Department, CHU Nantes, CIC1413, CRCINA, University Nantes, Place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France

<sup>2</sup> Unité de Thérapie Cellulaire et Génique [UTCG], CHU Nantes, Nantes, France

(\*) *Ce travail a été soumis dans ACTA Dermato-Venereologica Journal en mars 2019.*

### **Corresponding author :**

Brigitte Dréno

Service de dermato-cancérologie

CHU Nantes

1 place Alexis Ricordeau

44035 Nantes, France

Phone : 00 33 240083118

Fax : 00 33 240083117

E-mail : [brigitte.dreno@atlanmed.fr](mailto:brigitte.dreno@atlanmed.fr)

**Running head :** Melanoma, TILs and IDO

**Key words :** indoleamine 2,3-dioxygenase, melanoma, tumor infiltrating lymphocytes

Melanoma has experienced major therapeutic advances in recent years (1,2). Adoptive T Cell therapy based on the Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) obtained from tumor tissues belongs to the field of immunotherapy. An objective clinical response at metastatic stage has been reported between 40 to 72% according the literature (3,4). However, clinical response remains limited and shorts in melanoma metastatic stage. Therefore, one of the great challenges today is to increase the efficacy of TILs by fighting the immune tolerance of the microenvironment by identifying the molecules implicated in this phenomenon. Many actors have been suggested, among them, indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). IDO is an intracellular enzyme that metabolizes tryptophan to kynurenine. Tryptophan deficiency inhibits both T cells activity and proliferation (5). A recent paper (6) showed IDO1 expression in metastatic melanoma lymph node was associated with an increased risk of relapse and death. Thus, we assumed that the presence of IDO in the tumor microenvironment could inhibit TILs activity and adding an IDO inhibitor to the TILs could increase TILs cytotoxic activity against the melanoma cells.

To investigate this hypothesis we used the model of the co-culture of a melanoma cell-line and autologous TILs obtained from the same patient (6) by adding IDO inhibitor. Our endpoints were the frequency of reactive autologous T cells among the TILs and the expression of molecules involved in the recognition of tumor antigens by T cells with and without IDO inhibitor. Melanoma cells were derived from patients with metastatic melanoma, previously included in several distinct TILs clinical trials (Nantes, University Hospital). Seven tumor cell lines with associated autologous TILs were selected (4 wild-type cell lines and 3 cell lines with positive BRAF mutational status, but no difference according this mutational status was noted).

In a first step, the seven melanoma cell-lines were incubated either with an IDO inhibitor 1-methyl-L-tryptophan (1-MT) (two different concentrations) alone or after incubation with INF- $\gamma$  for mimicking the chronic inflammatory microenvironment state of a metastasis (associated with an increase of immunotolerance). In a second step, the 7 melanoma cells were distributed on a 96-well plate (300,000 cells per well) with 100,000 autologous TILs. Co-cultures were incubated for 6h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Finally, melanoma cells were analyzed by flow cytometry for IDO1, MHC-I, MHC-II and PD-L1 antigens expression and TILs reactivity by a double labeling: membrane CD3 and intracellular IFN- $\gamma$ . The data were analyzed using CellQuestPro® software. Tryptophan and kynurenine levels were determined by ELISA (ImmuSmol) in order to calculate kynurenine/tryptophan ratios.

**At the basal state (without INF- $\gamma$ ),** IDO1 expression was shown for 5 melanoma cell-lines (Figure 1.a). MHC-I was expressed by all the cell-lines. MHC-II was expressed only by 4 cell-lines. No expression of PD-L1 was noted for all of the 7 cell-lines. Intracytoplasmic expression of IFN- $\gamma$  by TILs was very low at basal state.

Adding the IDO inhibitor decreased in a dose-dependent manner the expression of IDO1 (Fig. 1.a). For both MHC-I and MHC-II, IDO inhibitor increased their expression in a dose dependent manner (Figure 1.b.c.). No effect was found concerning TILs cytotoxic activity by adding IDO inhibitor (Figure 1.e., Figure 2). The absence of expression of IDO1 by 2 melanoma cell-lines are in agreement with a recent paper showing that all melanoma metastasis do not expressed IDO (7).

**At the inflammatory state (induced by INF- $\gamma$ ),** IDO1 was expressed in all melanoma cell-lines: 2 melanoma cell-lines not expressing IDO1 at the basal state and increased in the other 5 cell-lines in a dose-dependent manner (Figure 1.a). PD-L1 expression was induced in the 7 melanoma cell-lines (Figure 1.d.). MHC-I and MHC-II were expressed by all the cell-lines after IFN- $\gamma$  induction (Figure 1.b.c.).

Adding IDO inhibitor decreased IDO1 and PD-L1 expression in a dose dependent manner. As in the basal state, MHC-I and MHC-II expression was increased in the presence of IDO inhibitor, in a dose dependent manner. IDO inhibitor in an inflammatory state, increased TILs reactivity in 2 cell-lines one in a dose dependent manner (M301, M125) (Figure 2).

Our results identify three main targets of the IDO inhibitor implicated in lymphocyte-tumor cell interactions. The two first ones are MHC-I and MHC-II whose expression is increased both at basal and inflammatory states. The third one is PD-L1, ligand of PD-1, whose expression is decreased at inflammatory state (not expressed at basal state). We confirmed that IDO inhibitor stimulates the tryptophan degradation activity in a dose dependent manner (8).

We also demonstrate that IDO inhibitor can increase TILs cytotoxic activity in inflammatory state but only for two cell-lines. Given that 2 cell-lines have the same expression profile for CMH-I, CMH-II and PD-L1 than the other 5 cell-lines, this result suggests that other mechanisms than the modulation of MHC-I, MHC-II or PD-L1 by melanoma cells are implicated for increasing cytotoxicity of TILs by an IDO inhibitor that remains to identify. Our results appear consistent with recent clinical trials with IDO inhibitors where no benefit has been demonstrated and rise the interest of a strategy defining the subgroup of patients who could have a clinical benefit with this molecule (9).

## **Acknowledgement**

We thank the cytometry facility Cytocell for their expert technical assistance.

## **Author contributions**

S Le Naour and AC Knol performed experiments

S Le Naour, AC Knol, A.Khammari and B.Dréno conceived and designed the research study

MC Pandolfino and A.Khammari contributed essential reagents/materials/analysis tools

S Le Naour and AC Knol analysed the data

S Le Naour and B.Dréno wrote the paper

All authors reviewed and commented critically drafts of the manuscript for important intellectual content and gave final approval to submit for publication.

## **Disclosure Statement**

The authors have no conflicts of interest to declare.

## **Funding Sources**

Authors have no funding source to declare.

## **References**

1. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 déc 2009;27(36):6199-206.
2. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. nov 2017;67(6):472-92.
3. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 avr 2005;23(10):2346-57.
4. Saint-Jean M, Knol A-C, Volteau C, Quéreux G, Peuvrel L, Brocard A, et al. Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Advanced Melanoma Patients. *Journal of Immunology Research*. 2018. 2018;2018:3530148.
5. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 3 mai 1999;189(9):1363-72.

6. Knol AC, Nguyen J-M, Pandolfino M-C, Denis MG, Khammari A, Dréno B. PD-L1 expression by tumor cell lines: A predictive marker in melanoma. *Exp Dermatol.* 2018;27(6):647-55.
7. Gide TN, Allanson BM, Menzies AM, Ferguson PM, Madore J, Saw RPM, et al. Inter- and intra-patient heterogeneity of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in primary and metastatic melanoma cells and the tumor microenvironment. *Histopathology.* 27 déc 2018;
8. Banzola I, Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Manzella G, Chiarugi A, et al. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induced by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as Potential Biomarker of Prostate Cancer Progression. *Front Immunol.* 2018;9:1051.
9. Long GV, Dummer R, Hamid O, Gajewski T, Caglevic C, Dalle S, et al. Epcadostat (E) plus pembrolizumab (P) versus pembrolizumab alone in patients (pts) with unresectable or metastatic melanoma: Results of the phase 3 ECHO-301/KEYNOTE-252 study. *J Clin Oncol.* 20 mai 2018;36(15\_suppl):108.

## Figure Legends

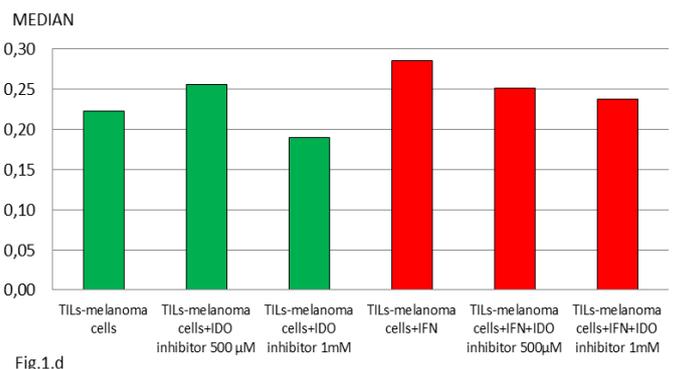
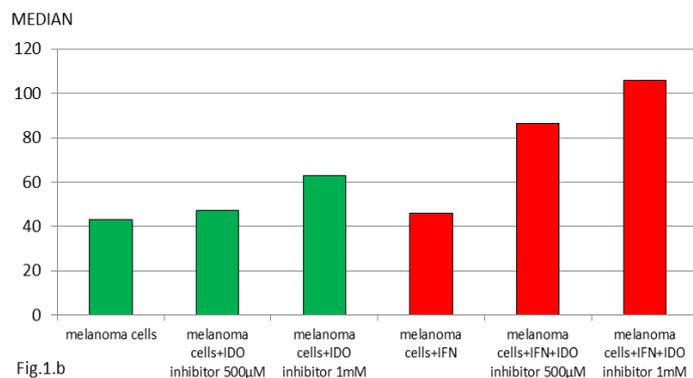
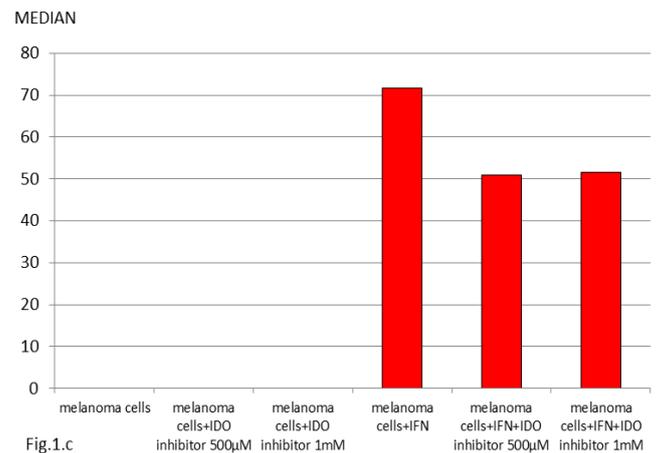
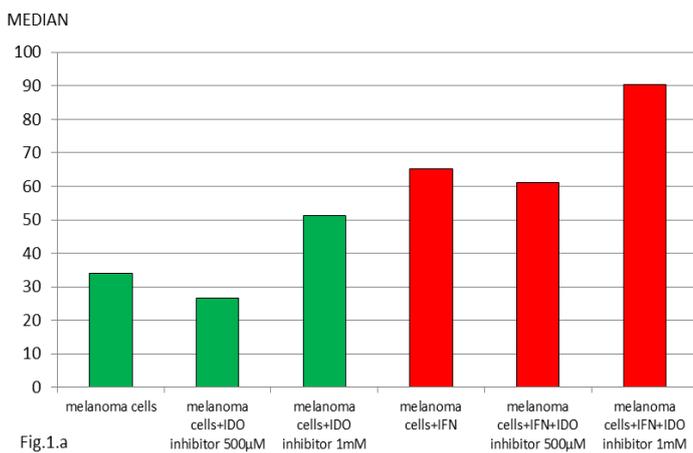


Fig. 1.a Kynurenine/tryptophan ratios, 1.b MFI for MHC-I expression, 1.c MFI for MHC-II expression, 1.d. Percentage of positive cells for PD-L1: results are expressed in median, green = basal state, red = inflammatory state

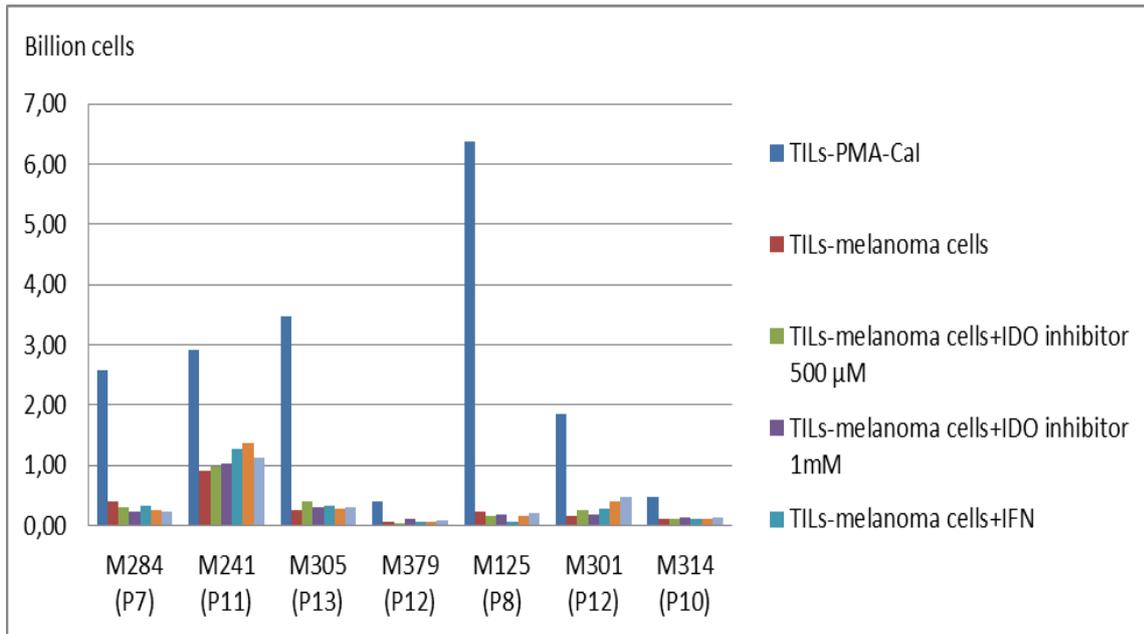


Fig. 2. : Intracytoplasmic expression of IFN- $\gamma$  by TILs, BRAF V600E cell-lines and wild-type cell-lines (absolute number expressed in billion cells) PMA: Phorbol Myristate Acetate; CaI: Calcium Ionophore BRAF V600E cell-lines (4): M284, M2421, M305 and M379 Wild-type cell-lines (3): M125, M301 and M314

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

Professeur Brigitte DRENO

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

Professeur Brigitte DRENO

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

**TITRE :** Effet in vitro d'un inhibiteur de l'indoléamine 2,3 dioxygénase sur les propriétés cytotoxiques des lymphocytes infiltrants la tumeur (TILs) contre des lignées tumorales de mélanome

## RESUME

Grâce aux progrès thérapeutiques de cette dernière décennie, le pronostic du mélanome métastatique s'est transformé. L'immunothérapie est l'un des piliers de cette révolution thérapeutique. Malheureusement, on se heurte à un phénomène d'immunotolérance induit en partie par les cellules tumorales aboutissant à des lymphocytes T aréactifs. IDO est un mécanisme responsable identifié. En associant un inhibiteur d'IDO au transfert adoptif de TILs, nous pourrions potentialiser leur activité cytotoxique vis-à-vis de la tumeur.

Quatre lignées tumorales BRAF V600E+ et trois sauvages pour lesquelles nous disposons de TILs autologues ont été utilisées, stimulées ou non par l'IFN- $\gamma$ . L'inhibiteur d'IDO était ensuite ajouté à la concentration de 500 $\mu$ M ou 1mM. La réactivité des TILs était évaluée par la production intracytoplasmique d'IFN- $\gamma$ . L'expression de molécules impliquées dans la réponse lymphocytaire a été étudiée (CMH-I, CMH-II, PD-L1). La production d'Il-6, CXCL9 et CXCL10 a été mesurée dans le surnageant de culture comme l'activité d'IDO, reflétée par le calcul du ratio kynurénine/tryptophane.

En présence de l'inhibiteur d'IDO, nous avons pu mettre en évidence une modulation de l'expression du CMH-I et -II en MFI, notamment après traitement des lignées par l'IFN- $\gamma$ . Le PD-L1 n'est exprimé par nos lignées qu'après stimulation par l'IFN- $\gamma$ . Le traitement par IFN- $\gamma$  entraîne une augmentation de la production de CXCL9 et CXCL10 par les lignées tumorales. Nous avons pu observer une variation de la cytotoxicité (exprimée par la production intracytoplasmique d'IFN- $\gamma$ ) de TILs autologues réactifs uniquement pour la lignée M301. Concernant IDO, son activité est diminuée par l'inhibiteur d'IDO de façon dose dépendante. Pour l'ensemble des résultats, il n'y avait pas d'influence du statut BRAF.

Bien que l'inhibiteur d'IDO puisse stimuler l'activité cytotoxique des TILs, ce mécanisme ne semble pas en lien avec la modulation d'expression de CMH-I et -II ni de PD-L1 par les cellules tumorales. En effet, malgré un profil d'expression similaire pour l'ensemble des lignées tumorales, l'inhibiteur d'IDO n'a permis d'augmenter l'activité cytotoxique des TILs que pour une seule lignée.

IDO est un mécanisme clé de l'immunotolérance mais son inhibition n'offre pas les bénéfices attendus en termes de lutte antitumorale.

## MOTS-CLES

Mélanome, Immunothérapie, Indoléamine 2,3 dioxygénase, Lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)