

5<sup>E</sup> ÉDITION

CONGRÈS

# ONCOTRANS 2 & 3 FÉVRIER 2017



Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon



ÉVALUATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE :  
IMPLICATION POUR L'ONCOLOGIE MOLÉCULAIRE  
ET L'IMMUNOTHÉRAPIE DES CANCERS

## RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS (PROGRAMME SCIENTIFIQUE)

[www.oncotrans.fr](http://www.oncotrans.fr)



Ville de  
**Besançon**

CONGRÈS

# ONCOTRANS 2 & 3 FÉVRIER 2017

Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon



## SOMMAIRE

### JEUDI 2 FÉVRIER 2017

#### SESSION 1 ..... P. 3

- **P. 4 :** Les Classifications moléculaires dans les cancers du sein et applications cliniques, *Pr Pierre Fumoleau (Dijon, France)*
- **P. 6 :** Étude des polymorphismes génétiques pangénomiques (GWAS) : résultats de l'étude Signal, *David G. Cox (Lyon, France)*
- **P. 7 :** Nouvelle classification moléculaire et appréciation moléculaire de l'hétérogénéité tumorale dans les cancers du côlon, *Dr Alain Thierry (Montpellier, France)*
- **P. 8 :** Nouvelles classifications moléculaires du cancer colorectal : vers un traitement à la carte ? *Pr Thierry André (Paris, France)*

#### SESSION 2 ..... P. 10

##### Partie 1

- **P. 11 :** Nouveaux biomarqueurs pour la détection et la stratification des cancers de la prostate : enjeux techniques et validation clinique, *Dr Pierre-Jean Lamy (Montpellier, France)*
- **P. 12 :** Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes vivantes comme biopsie liquide du cancer, *Dr Catherine Alix-Panabières (Montpellier, France)*
- **P. 13 :** Intérêt du profiling moléculaire de l'hétérogénéité tumorale : des CTC à l'ADN libre plasmatique, *Dr François-Clément Bidard (Paris, France)*

##### Partie 2

- **P. 14 :** Tumor-derived-exosomes: potential in theranostic, *Jessica Gobbo (Dijon, France)*
- **P. 15 :** Utilization of circulating exosomal DNA for liquid biopsy, an update on current knowledge and understanding, *Dr David Guenat (Besançon, France & Stanford, États-Unis)*

### VENDREDI 3 FÉVRIER 2017

#### SESSION 3 ..... P. 16

- **P. 17 :** Immunothérapie en hématologie : état de l'art et actualités, *Pr Régis Costello (Marseille, France)*
- **P. 18 :** Recherche translationnelle en immuno-oncologie, *Pr Christophe Borg (Besançon, France)*
- **P. 19 :** Immunogenic cell death inducers trigger PD-L1 dependent adaptive immune resistance, *Pr François Ghiringhelli (Dijon, France)*
- **P. 20 :** How to enhance the anticancer effect of immunogenic chemotherapies? *Dr Lionel Apetoh (Dijon, France)*

#### SESSION 4 ..... P. 21

##### Session GPCO

- **P. 22 :** Pharmacologie des anticorps : vers une standardisation des techniques, *François Becher (Gif-sur-Yvette, France)*
- **P. 23 :** Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique pour l'individualisation posologique Bayésienne des inhibiteurs des tyrosine kinases, *Pr Chantal Csajka (Lausanne, Suisse)*
- **P. 24 :** Actualités - PK/PD des biothérapies : prêt pour le STP ? *Dr Joseph Ciccolini (Marseille, France)*

##### Session SIRIC

- **P. 25 :** Biomarqueurs immunologiques intra-tissulaires pour la définition du pronostic, *Pr Franck Pagès (Paris, France)*
- **P. 26 :** Détection des lymphocytes T antitumoraux polyspécifiques : biomarqueur des immunothérapies ? *Pr Marcello de Carvalho (Nancy, France)*
- **P. 27 :** Monitoring des Innate Lymphoid Cells (ILCs) en cancérologie, *Dr Camilla Jandus (Lausanne, Suisse)*

#### SESSION 5 ..... P. 28

- **P. 29 :** Le micro-environnement : une source d'outils cliniques pour le cancer du pancréas, *Pr Richard Tomasini (Marseille, France)*
- **P. 30 :** L'autophagie est-elle une cible thérapeutique ? *Pr Michaël Boyer-Guittaut (Besançon, France)*
- **P. 31 :** Du côté des phases I : les nouvelles molécules pour cibler le micro-environnement, *Dr Nicolas Isambert (Dijon, France)*





JEUDI 2 FÉVRIER 2017  
SESSION 1



## Les classifications moléculaires dans les cancers du sein et applications cliniques

---

Pr Pierre Fumoleau & Dr Sylvain Ladoire  
Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

Avant les années 2000, l'hétérogénéité des cancers du sein était essentiellement basée sur une classification anatomo-pathologique de l'OMS avec 21 types de carcinomes infiltrants. Cette classification morphologique où les carcinomes canaux infiltrants sont prédominants (environ 80%) ne tient pas compte de la biologie et de ce fait a une utilité limitée pour la prise en charge thérapeutique. Néanmoins l'expression des récepteurs hormonaux (RO & RP) et HER2 sont pris en compte pour le choix thérapeutique (facteurs pronostiques et prédictifs).

Le développement des analyses génomiques (analyses des niveaux d'expression des ARN complétées par les analyses ADN pan génomiques) permet d'analyser simultanément l'expression de nombreux gènes, de faire un « portrait » de chaque tumeur et de mettre ainsi en lumière l'hétérogénéité biologique des tumeurs du sein. Sorlie T et Perou CM (Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications PNAS 2001 ;98 :10869-74) ont été les premiers, en 2001, à subdiviser les cancers du sein en fonction du profil d'expression génique et ainsi décrire à partir d'une liste de gènes différents exprimés entre les types tumoraux et nommée « signature intrinsèque » le sous-type luminal A (25 à 40 % des cas) et B (20 à 25 % des cas), le sous-type HER2 (15 à 18 % des cas), le sous-type basal-like (15 à 18 % des cas) et le sous-type normal-like, ce dernier sous type étant vraisemblablement un artéfact lié à une forte contamination des premiers profils d'expression génique et n'ayant pas de réelle traduction en pathologie.

Les sous-types Claudin-low (Perou CM et al.), HER2-enriched (Prat A et al.) et apocrines (Farmer P et al.) ont été ensuite individualisés. Cette signature intrinsèque en sous types apporte des informations pertinentes en termes de pronostic, d'épidémiologie, de réponse à l'hormonothérapie et à la prédiction de réponse aux traitements ciblés anti-HER2.

**Luminal A** ; ce sous-type est caractérisé par le niveau d'expression le plus élevé des RO et des gènes régulés par les RO (GATA-3, FOX A1) et une faible expression des gènes liés à la prolifération (expression de Ki-67 faible). La mutation de p53 est de l'ordre de 15 %. En pratique clinique, il s'agit des carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes, de grade I ou II et avec un index de prolifération faible.

**Luminal B** ; ce sous-type est caractérisé par un niveau d'expression plus faible des RO & RP, des gènes régulés par les RO et une forte expression des gènes liés à la prolifération (expression de Ki-67 élevée). La mutation de p53 est de l'ordre de 65 %. En pratique clinique, il s'agit des carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes, de grade II ou III et avec un index de prolifération élevé.

**HER2** ; ce sous-type est caractérisé par une expression forte de l'amplicon de HER2, dont HER2 et GR7 avec une expression des RO (RO+) ou non RO-. Il existe le plus souvent une expression élevée des gènes liés à la prolifération et une mutation de p53 de l'ordre de 70 %.

**HER2-enriched** ; ce sous-type décrit par Prat et al. (CCR 2014) avec RO- correspond à 45 % des tumeurs HER2+ et est caractérisé par une expression élevée des protéines HER2/EGFR et phospho-(p)-HER2/p-EGFR. Ce sous-type est un facteur prédictif important d'une réponse avec un double blocage anti-HER2 en l'absence de chimiothérapie.

**Claudin-low** ; ce sous-type décrit par Pérou et al correspond à 5-10 % des cancers du sein, RO- RP- HER2- avec un enrichissement important des marqueurs de la transition épithélio- mésoenchymateuse, des gènes en rapport avec la réponse immunitaire et des profils cellules souches.

**Basal-like** ; ce sous-type est caractérisé par un très faible niveau d'expression des gènes des RO, HER2 associée à une forte expression des gènes tels que les cytokératines 5,6,17, EGFR, laminine, FAB7 et des gènes liés à la prolifération tumorale. En complément sur le plan génomique, ces carcinomes basal-like présentent de nombreuses altérations génomiques avec plusieurs gains et pertes de segments chromosomiques, des mutations de p53 dans presque 100 % des cas et très souvent une inactivation somatique du gène BRCA1. Sur le plan morphologique, ils sont de type canalaire, le plus souvent de grade III avec un index mitotique élevé. Sur le plan immunophénotypique, il s'agit le plus souvent de cancer du sein dit triple négatifs RO-, RP-, HER2- avec l'expression des cytokératines de haut poids moléculaire CK 5,6,17 et/ou EGFR. La majorité des carcinomes (environ 85%) survenant dans un contexte de mutation constitutionnelle héréditaire BRCA1 partage les caractéristiques moléculaires, morphologiques et immunophénotypiques de ce sous type basal-like.

**Les carcinomes apocrines** ; ce sous type RO-, RP- présent une signature avec activation de la voie de signalisation des récepteurs androgéniques (RA).

Les cancers du sein triple négatifs RO-, RP-, HER2- ; il ne s'agit pas d'un sous type issu d'une classification moléculaire mais d'une individualisation issue d'une définition immuno phénotypique : l'absence de récepteurs hormonaux et d'HER2. De plus les cancers basal-like ne sont pas à 100 % triple négatifs et inversement tous les cancers triple négatifs ne sont pas tous du sous type-basal like.

Lehman BD et al ont proposé une classification moléculaire transcriptomique des cancers triple négatifs avec 6 sous-types et de potentielles implications cliniques.

SOUS TYPE	GÉNOMIQUE	POTENTIELLES APPLICATIONS CLINIQUES
Basal-like 1 <b>BL1</b>	Altération de la réparation ADN Prolifération cellulaire	Sels de Platine, Inhibiteurs de PARP
Basal-like 1 <b>BL2</b>	Signalisation p53, EGFR, MET	Inhibiteurs de mTOR, de la transmission du signal
Immunomodulatory <b>IM</b>	Signalisation immunologique	Sels de Platine, Inhibiteurs de PARP PD-1, PDL-1 inhibiteurs
Mesenchymal <b>M</b>	EMT, Wnt, TGFbéta, IFR1R, Notch Prolifération cellulaire	Inhibiteurs de mTOR, de la transmission du signal, de Src
Mesenchymal <b>MSL</b>	EMT, Wnt, TGFbéta, MAPK, PI3K, PDGF	Inhibiteurs de mTOR, de la transmission du signal, de PI3K et MEK
Luminal androgen receptor <b>LAR</b>	Signalisation AR, FOXA1, HER4	Anti Androgènes

Les mêmes auteurs ont effectué, à partir de 374 échantillons, une comparaison directe entre les sous types intrinsèque PAM50 et cette classification moléculaire en sous type des cancers du sein triple négatifs. Comme anticipé, la majorité des cancers du sein triple négatif sont classé basal-like par le PAM50 (80,6 %). Cependant un nombre significatif est classé dans d'autres catégories : normal-like (14,6 %), luminal B (3,5 %), luminal A (1,1 %), et HER2 (0,2 %). À l'exception des sous types MSL et LAR, tous les autres sous types sont classé basal-like. Pour le sous-type MSL, environ, 50 % sont basal-like, 27,8 % sont normal-like, 13,9 % sont luminal B, et le reste 8 % est HER2 et luminal A. Au contraire des autres sous types, le sous type LAR est classé comme HER2 (74,3 %) et luminal B (14,3 %).

**En conclusion**, le consensus de St Gallen propose la classification suivante :

- 1/ Luminal A: RO et/ou RP positif, HER2-, Ki-67 bas ; *hormonothérapie*,
- 2/ Luminal B (HER2-): RO et/ou RP positif, HER2-, Ki-67 élevé ; *hormonothérapie – chimiothérapie*,
- 3/ Luminal (HER2+): RO et/ou RP positif, HER2+, Ki-67 bas/élevé ; *anti-HER2, chimiothérapie*,
- 4/ HER2+ enriched (non luminal): RO et/ou RP négatif, HER2+ ; *anti-HER2 (double blocage), chimiothérapie*,
- 5/ Triple négatif: RO et/ou RP négatif, HER2- ; *chimiothérapie*.

## Étude des polymorphismes génétiques pangénomiques (GWAS) : résultats de l'étude Signal

---

**David G. Cox**

*INSERM U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France*

Les premières études d'association pangénomique ont été publiées au début des années 2000. Ainsi, des milliers d'études ont mené à l'identification de dizaines de milliers de variants constitutionnels qui influencent la biologie humaine, notamment le risque de développer un cancer. En parallèle, notre connaissance de la biologie des tumeurs a considérablement évolué, et nous parlons désormais « des cancers ».

Pour mieux comprendre les cancers du sein, nous développons le programme SIGNAL/PHARE, une cohorte clinique de plus de 10 000 femmes atteintes d'un cancer du sein. Nous avons effectué une étude pangénomique dans SIGNAL/PHARE, avec entre autre l'objectif d'identifier des variants associés avec le type de cancer du sein.

Nous avons démontré que des variants localisés dans le gène *FGFR2* sont associés avec le statut des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein, et que cette association est limitée aux tumeurs qui ne surexpriment pas HER2. Par contre, nous n'avons pas pu identifier de variants associés avec la surexpression de HER2.

En conclusion, ces résultats nous éclairent sur les origines de l'hétérogénéité tumorale, qui peut être influencée en partie, par le fond génétique constitutionnel.

# Nouvelle classification moléculaire et appréciation moléculaire de l'hétérogénéité tumorale dans les cancers du côlon

---

**Dr Alain Thierry**  
INSERM, Montpellier, France

À partir d'informations obtenues sur la caractérisation de la structure et de l'origine des ADNcir issus des tumeurs, l'équipe d'Alain Thierry a mis au point une méthode de QPCR à allèle spécifique avec bloqueur dédiée à l'analyse de l'ADNcir et à la caractérisation de 5 paramètres (IntPlex). Ces 5 paramètres déterminés simultanément, sont la concentration en ADNcir total et muté, l'index de fragmentation, le pourcentage d'allèles mutés, et la présence de mutations ponctuelles. Ce test de détection de mutations hotspot ciblées est ultrasensible (<0.005 %), et utilisable et adaptable pour toutes les mutations, tous les gènes et tous les types de cancer. C'est la seule méthode multiparamétrique développée actuellement. Au travers de nos observations vers l'application des ADNcir en oncologie (plus bas), les différentes approches analytiques et méthodologiques seront comparées.

## **1. Première démonstration de la validation clinique de l'utilisation l'ADNcir en oncologie**

La validation clinique de la détection des mutations ponctuelles de KRAS et BRAF à partir d'un prélèvement sanguin a été apportée récemment par une étude (Kplex1) qui représente la première étude prospective en aveugle comparant la détection des mutations des gènes KRAS et BRAF par l'analyse standard à partir du tissu tumoral avec un test sanguin. L'analyse comparative (cohorte de patients atteints de cancer colorectaux métastatiques, n=106) montre une spécificité de 98%, une sensibilité de 92 % et une concordance de 96 % dans le cas de la détection des mutations du gène KRAS. En ce qui concerne la détection de la mutation BRAF, il y a 100 % de sensibilité, de spécificité, et de concordance. Ce travail est majeur puisqu'il constitue la première démonstration de la validation clinique de l'utilisation de l'analyse de l'ADNcir en oncologie.

## **2. Première démonstration de l'utilité clinique de l'analyse de l'ADN circulant pour la détection de mutations hotspot cliniquement actionnables (KRAS, NRAS, BRAF)**

L'étude Kplex2, identique à Kplex1 (prospective, en aveugle et multicentrique, n=140) mais réalisée en flux tendu et sans seuil de détection pour l'analyse plasmatique révèle que (i), près de 20 % d'échantillons en plus de ceux déterminés à partir du tissu se sont révélés mutés, (ii) la médiane de rendu du résultat déterminé à partir du plasma s'est avéré être de 1,3 jour alors qu'il est de 16 jours à partir du tissu et (iii), l'analyse des résultats discordants avec le tissu montre qu'ils apparaissent mieux converger avec la réponse thérapeutique anti-EGFR.

## **3. Étude de la résistance et de l'émergence de mutation suite au traitement au Cetuximab**

L'analyse du plasma de patients mCRC dont on a arrêté le traitement Folfox+ Cetuximab pour cause de progression, (n=47) montrent que : (i), certains patients initialement définis comme WT pour KRAS, sont en fait déterminés mutés à partir de l'analyse du plasma; (ii), une ou plusieurs mutations apparaissaient dans la majorité des cas, (iii), un sous-clone muté initialement à une très faible fréquence allélique (<0.01 %) peut être sélectionné sous l'effet du traitement et se développer conduisant à une sérieuse résistance au traitement, (iv), la nécessité d'une méthode très sensible (<0.0 1%) pour l'analyse des ADNcir, et (iv), les paramètres quantitatifs de l'ADNcir sont des biomarqueurs performants du suivi de la progression tumorale.

### **Références :**

- Thierry, A.R. et al. *Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer.* *EMBO Mol. Med.*, in press
- Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. *Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology.* *Cancer Metastasis Rev.* 2016 Sep;35(3):347-76.
- Thierry, A.R. et al *Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF point mutations from circulating DNA analysis.* *Nature Med* 20:430-5 (2014).

## Nouvelles classifications moléculaires du cancer colorectal : vers un traitement à la carte ?

---

Pr Thierry André

Service d'Oncologie médicale, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

Dans les cancers colo-rectaux (CCR), 6 classifications indépendantes ont été regroupées pour retenir finalement 4 sous-groupes moléculaires Consensus Molecular subtype (CMS 1 à 4), en fonction de différentes données cliniques, moléculaires et des données sur la survie. CMS1 (14 % : MSI avec activation immunitaire) ; CMS2 (37 % : canonical avec différenciation épithéliale et activation de la voie WNT/MYC) ; CMS3 : 13 % métabolique avec différenciation épithéliale et mutation de RAS) ; CMS4 (23%: mésenchymateux avec activation de la voie du TGF $\beta$  et de l'angiogénèse avec invasion du stroma)<sup>1</sup>.

Le groupe CMS 1 concernait majoritairement des femmes âgées atteintes d'un cancer du côlon droit, et ses caractéristiques biologiques étaient majoritairement une instabilité des microsatellites (MSI), avec parfois une mutation de *BRAF* et une hyperméthylation de certains gènes, avec une activation immunitaire. Ce groupe était caractérisé par une meilleure survie sans rechute (SSR), une Survie Globale (SG) intermédiaire, et une mauvaise Survie après rechute (SAR). Le groupe CMS 2 concernait plutôt des patients avec un cancer du côlon gauche, et ses caractéristiques biologiques consistaient en un type épithélial avec une importante instabilité chromosomique reflétée par un taux élevé de SCNA (Somatic Copy Number Alteration=Alteration du nombre de copie), l'existence de statut MSS, une mutation de *TP53*, et une activation de la voie WNT/MYC. Ce groupe était caractérisé par une SSR intermédiaire, une meilleure SG, une meilleure SAR. Le groupe CMS 3 (13 %, dérégulation métabolique) était caractérisé par un type épithélial, MSS (90 %) ou MSI (10 %), *RAS* muté avec une amplification de *MYC*, avec un taux faible de SCNA. Ce groupe était caractérisé par des survies intermédiaires. Le groupe CMS4 (20 %, mésenchymateux) concernait plutôt des patients jeunes, ayant un cancer de stade III ou IV, et une hyper-activation de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, lui conférant un type mésenchymateux, avec une infiltration stromale, un taux élevé de SCNA, un statut MSS, une activation de la voie TGF $\beta$  /VEGF, et une surexpression de *NOTCH3*. Ce groupe était caractérisé par une mauvaise SSR, une mauvaise SG, et une SAR intermédiaire. Les 21 % de patients restants étaient « non classifiés », il s'agissait de sous types mixtes épithélial et mésenchymateux en proportion variable. Ce groupe était caractérisé par des survies intermédiaires. Ces différentes études se sont intéressées à des prélèvements issus de patients essentiellement non métastatiques, ayant eu une biopsie ou une résection de leur tumeur primitive, dont le pronostic et la thérapeutique sont très différents des patients métastatiques, qui constituaient un très faible pourcentage des patients pour lesquels un échantillon était recueilli. La plupart des patients n'avaient pas reçu de chimiothérapie ou de thérapie ciblée avant la réalisation du prélèvement. Chez les patients non métastatiques, la situation est différente des patients métastatiques.

Beaucoup de questions sont posées, beaucoup de drivers moléculaires et de nouvelles pistes thérapeutiques sont ouvertes par cette nouvelle classification. Il s'agit d'une nouvelle classification qui se base sur la biologie moléculaire, et qui associe des techniques faites en routine (recherche du statut MSI, mutation de *RAS*, de *RAF*), avec de nombreuses techniques plus complexes qui ne sont pas faites en routine. Cette classification ouvre la voie à une nouvelle méthodologie de recherche clinique, et est probablement un tournant dans la conduite de la réflexion des essais thérapeutiques dans le CCR.

Les premières applications thérapeutiques découlant de cette classification ont été observées dans le groupe des patients avec CCR métastatiques CMS 1, ou l'immunothérapie, par l'intermédiaire des inhibiteurs de Check-Point (Anti-PD1, anti-PDL1, Anti-CTLA4), a montré des résultats très encourageants chez des patients avec tumeur présentant une instabilité micro satellitaire<sup>2-4</sup>. Dans cette même famille, l'inhibition de *Braf* par l'association d'inhibiteur de *Braf* avec un anticorps

anti-EGFR (cetuximab ou patitumumab) associé soit à un inhibiteur de MEK, soit à de l'irinotecan est une voie en court d'exploration<sup>4</sup>. Les patients avec CCR métastatiques CMS 2 sont les patients qui bénéficient probablement le plus des traitements conventionnels actuels, et dans la mesure où dans ce groupe les mutations de *Ras* sont rares, les anti-corps anti-EGFR, ont leur place dans cette famille. Les patients avec CCR métastatiques CMS 3 sont le plus souvent des cancers du côlon droit, *Ras* muté, de plus mauvais pronostic et ou en raison d'une dys-régulation majeure de leur métabolisme, un ciblage du métabolisme cellulaire semble une voie à évaluer. Enfin les patients avec CCR métastatiques CMS 4 de type mésenchymateux, ou il existe une importante inflammation, les inhibiteurs de TGF  $\beta$  et les anti-angiogéniques, pourraient être efficace. Grâce à ces nouvelles classifications moléculaires, et grâce à ces nouvelles cibles, la recherche clinique est totalement bouleversée, et nulle doute que les progrès viendront de traitement à la carte, en fonction de ces groupes basés sur des caractéristiques moléculaires.

**Références :**

1. Guinney J et al. *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. *Nat Med* 2015 Nov;21(11):1350-6.
2. Dans Le DT, et al. *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency*. *New England Journal of Medicine*. 2015;372:2509–20.
3. Overman MJ, et al. *Nivolumab  $\pm$  ipilimumab treatment (Tx) efficacy, safety, and biomarkers in patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): results from the CheckMate-142 study*. *Ann. Oncol.* 27, supplement 6 (abstract 479P) (2016).
4. Cohen R et al. *New Therapeutic Opportunities Based on DNA Mismatch Repair and BRAF Status in Metastatic Colorectal Cancer*. *Curr Oncol Rep* (2016).



JEUDI 2 FÉVRIER 2017  
SESSION 2



## Nouveaux biomarqueurs pour la détection et la stratification des cancers de la prostate : enjeux techniques et validation clinique

---

**Dr Pierre-Jean Lamy**

Directeur de l'Institut Médical d'Analyse Génomique, Montpellier, France

Co-responsable de l'Axe Epidémiologie Intégrative de l'ICF-uro

L'usage large du test PSA a conduit à révéler des cancers de petits volumes peu agressifs et avec des valeurs de PSA peu élevées (en particulier de 4 à 10 ng/mL). A ces valeurs, le PSA ne permet pas de différencier les cancers à haut risque de récurrence des cancers peu agressifs. En raison de ce manque de valeur pronostique dans ces valeurs peu élevées, le PSA peut entraîner un sur-diagnostic (diagnostic d'un cancer qui ne se serait jamais révélé du vivant de la personne) et un risque de sur-traitement (traitement sans impact sur le pronostic de la maladie). Par ailleurs, la reproductibilité inter et intra observateur du score de Gleason n'est pas optimale. À part le PSA et le Gleason, aucun marqueur biologique pronostique n'est utilisé en routine à ce jour dans la prise en charge du cancer de la prostate.

De nombreux biomarqueurs sanguins, urinaires ou tissulaires ont été développés afin de répondre à la nécessité d'adapter la prise en charge des patients et de distinguer, au sein d'une population atteinte de cancer de la prostate les formes agressives des formes non agressives. Leur niveau d'évaluation est variable ; des résultats encourageants ont été observés pour certains\*.

Qu'il s'agisse de marqueurs protéiques (PHI, OPKO), cellulaires (CTC) ou moléculaires (signatures ARN pronostiques comme Prolaris, GPS, Decipher, ou analyse de l'ADN circulant) leur objectif est :

- d'améliorer la capacité d'identification des cancers potentiellement agressifs pour lesquels le diagnostic précoce est souhaité, ce qui pourrait réduire le nombre de cancers supposés indolents diagnostiqués (sur-diagnostic), parfois traités agressivement (sur-traitement) ;
- d'orienter la prise en charge après confirmation du diagnostic et donc de distinguer une population avec un cancer de bon pronostic ou un cancer latent à faible risque de progression immédiate chez laquelle les risques de sur-traitement avec leurs effets indésirables potentiels pourraient être diminués ou *a contrario* une population avec un pronostic péjoratif pour laquelle, par exemple, la surveillance active serait contre-indiquée (valeur pronostique).
- de monitorer les patients après traitement initial, notamment sous hormonothérapie.

\* [www.urofrance.org/fileadmin/medias/icfuro/axe2/loe2-rapport-biomarqueurs-cancer-prostate.pdf](http://www.urofrance.org/fileadmin/medias/icfuro/axe2/loe2-rapport-biomarqueurs-cancer-prostate.pdf)

# Détection et caractérisation des cellules tumorales circulantes vivantes comme biopsie liquide du cancer

---

**Dr Catherine Alix-Panabières**

*Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier au CHU de Montpellier, France*

Très rapidement après la formation et la croissance d'une tumeur primaire (par ex., cancer du sein, de la prostate, du côlon), les cellules tumorales se décrochent activement de la tumeur primaire et circulent dans le compartiment circulant pour atteindre des organes distants (par ex., moelle osseuse, foie, poumon, cerveau). L'analyse des cellules tumorales circulantes (CTCs) est considérée comme *une biopsie liquide en temps réel* de la tumeur pour les patients malades d'un cancer<sup>(1)</sup>. Ces cellules tumorales circulantes (CTCs) peuvent être enrichies et détectées par différentes technologies qui se basent sur leurs propriétés physiques et biologiques pour les séparer des cellules hématopoïétiques normales environnantes<sup>(2)</sup>.

Notre groupe a focalisé sur la détection des CTCs vivantes *via* la technologie EPISPOT, la seule aujourd'hui à détecter des CTCs fonctionnelles. De plus, il est crucial d'identifier les sous-populations de CTCs les plus agressives que sont les cellules initiatrices de métastases<sup>(3)</sup> avec des propriétés de cellules souches.

Le faible nombre de CTCs dans le sang périphérique de la plupart des cancers solides challenge leur culture *in vitro*. Depuis des années, de nombreux groupes de recherche essayent de développer des cultures de cellules primaires ou des lignées cellulaires à partir de tumeurs primaires ou de métastases, partant de millions de cellules tumorales. Très récemment, quelques groupes ont développé les conditions de culture adéquates pour la culture *ex vivo* de CTCs isolées de patients ayant un cancer solide à un stade avancé pour avoir un nombre plus élevé de CTCs : établissement de lignées cellulaires CTCs *in vitro* et expansion de CTCs *in vivo* chez la souris avec la formation de xénogreffes.

Notre groupe a développé pour la première fois une lignée CTC colique stable > 3 années à partir d'un patient avec un cancer métastatique du colon<sup>(4)</sup>. L'analyse fine et détaillée de cette lignée CTC a montré des caractéristiques très intéressantes et un potentiel très particulier<sup>(5)</sup>. La capacité à détecter et à éradiquer ces sous-populations cellulaires à potentiel métastatique à un stade précoce pourra certainement diminuer la mortalité due au cancer.

Par ailleurs, le développement de nouvelles stratégies en immunothérapie semble très prometteur. Récemment, nous avons démontré pour la première fois que PD-L1 était fréquemment exprimé et de manière hétérogène sur les CTCs de patientes avec un cancer du sein métastatique<sup>(6)</sup>. Des analyses fonctionnelles des ces sous-populations de CTCs intéressantes pourraient révéler des propriétés immunosuppressives particulières de ces cellules tumorales. Nous proposons d'utiliser ce nouveau test pour stratifier les patients qui devraient recevoir un traitement basé sur l'immunothérapie et pour évaluer l'efficacité de ce traitement très rapidement après son initiation.

Globalement, il n'existe plus aucun doute sur le fait que les CTCs reflètent fidèlement la progression tumorale en temps réel et que cette information peut être très utile pour guider les cliniciens dans le choix des thérapies systémiques. Très prochainement, la détection et la caractérisation des CTCs pourrait guider le choix de thérapies ciblées pour une population de patients atteints d'un cancer dans une certaine fenêtre thérapeutique : la thérapie personnalisée.

#### Références :

1. Pantel K, Alix-Panabieres C. *Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. Trends Mol Med* 2010;16:398-406.
2. Alix-Panabieres C, Pantel K. *Challenges in circulating tumour cell research. Nat Rev Cancer* 2014;14:623-31.
3. Wicha MS, Hayes DF. *Circulating tumor cells: Not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. J Clin Oncol* 2011;29:1508-11.
4. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. *Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. Cancer Res* 2015;75:892-901.
5. Alix-Panabieres C, Cayrefourcq L, Mazard T, Maudelonde T, Assenat E, Assou S. *The molecular portrait of metastasis-competent circulating tumor cells in colon cancer reveals the crucial role of genes regulating energy metabolism and DNA repair. Clin Chem* 2016;In press.
6. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, et al. *Frequent expression of pd-11 on circulating breast cancer cells. Mol Oncol* 2015.

## Intérêt du profiling moléculaire de l'hétérogénéité tumorale : des CTC à l'ADN libre plasmatique

---

**Dr François-Clément Bidard**

*Oncologie médicale, Institut Curie, Paris, France*

Les biomarqueurs tumoraux circulants (CTC et ctDNA) ont d'abord démontré leur intérêt potentiel dans la prise en charge oncologique grâce à la détection d'évènements moléculaires « clonaux », partagés par la (quasi) totalité des cellules tumorales.

La détection et – pire – la quantification de l'hétérogénéité tumorale restent difficiles mais les premières applications commencent à être appréhendées en clinique, ciblant l'apparition de mécanismes de résistance en cours de traitement.

Nous verrons trois aspects de la détection de l'hétérogénéité tumorale par biomarqueurs circulants :

- 1/ Techniques et preuves de concept,
- 2/ Détection et quantification : pas si simple...
- 3/ Des premières applications en vue dans les cancers de prostate, les cancers colorectaux (essai FFCD), bronchiques (essai EORTC) et mammaires (essais DETECT III, CirCe T-DM1, PADA-1)...

## Tumor-derived-exosomes: potential in theranostic

---

Jessica Gobbo<sup>1,3</sup>, M. Cordonnier<sup>1</sup>, G. Chanteloup<sup>1</sup>, N. Isambert<sup>1,3</sup>, A. Bertaut<sup>2</sup>, P. Fumoleau<sup>3</sup> & C. Garrido<sup>1</sup>

1. INSERM U866, Dijon, France

2. Biostatistics and Epidemiological Unit, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

3. Early phase Unit, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

During the last ten years exosomes, which are small vesicles of 50-200 nm diameter of endosomal origin, have aroused a great interest in the scientific and clinical community for their roles in intercellular communication in almost all physiological and pathological processes. Most cells can potentially release these nanovesicles that share with the parent cell a similar lipid bilayer with transmembrane proteins and a panel of enclosed soluble proteins such as heat shock proteins and genetic material, thus acting as potential nanoshuttles of biomarkers. Exosomes surface proteins allow their targeting and capture by recipient cells, while the exosomes' content can modify the physiological state of recipient cells. Tumor-derived-exosomes by interacting with other cells of the tumor microenvironment modulate tumor progression, angiogenic switch, metastasis, and immune escape. Targeting tumor-derived exosomes might be an interesting approach in cancer therapy. Furthermore, because a key issue to improve cancer patients' outcome relies on earlier cancer diagnosis exosomes have been put forward as promising biomarker candidates for cancer diagnosis and prognosis.

We have recently shown that whereas exosomes released by tumoral cells express in their membrane the stress protein HSP70 (heat shock protein-70), exosomes released by normal cells do not. We have called this subpopulation of tumor-derived nanovesicles HSP70-exosomes. Our experiments *in vitro*, *in cellulo* and *in vivo* show that HSP70-exosomes have an immunosuppressor function and thereby favour tumor growth. Therefore HSP70-exosomes are interesting targets in cancer immunotherapy. The ability of a cancer cell to release HSP70-exosomes seems a very general feature. All cancers analyzed so far (breast, uterus, lung, ovary, and lymphoma) liberate these nanovesicles that can be quantified in the blood. One single cancer cell can release thousands of these exosomes and that happens very early in the tumorigenesis process. We believe release of HSP70-exosomes by a tumor cell might be an early mechanism of defense to avoid its immune clearance. Our hypothesis is that HSP70-exosomes might be used as biomarkers in cancer patients' follow-up (diagnosis, progression of the disease/ apparition of metastasis). We have patented a protocol to capture HSP70-exosomes (WO2015/189395 INSERM Transfer) that have allowed us to set the proof of principle that HSP70-exosomes can be quantified in blood samples. To confirm these results in a larger cohort of patients, we have started a 3-years prospective study called ExoDiag (Centre Georges-François Leclerc, Dijon). Our preliminary results in breast cancer suggest that the presence of HSP70-exosomes in the blood might be a predictive marker of metastasis. To conclude, exosomes opens future prospects for the medicine personalized by the liquid biopsy until targeted therapy.

# Utilization of circulating exosomal DNA for liquid biopsy, an update on current knowledge and understanding

---

**Dr David Guenat**

*Assistant Hospitalo-Universitaire, CHRU de Besançon, France*  
*Postdoctoral scholar, Stanford Cancer Institute, États-Unis*

Improving minimally invasive early cancer detection, tumor genotyping and monitoring of the residual disease under therapies are key challenges to better treat cancer patients. Important changes have occurred in the biological monitoring of cancer patients over the last decade. The improved knowledge about the cancer genomic landscapes and the optimized methods to isolate circulating nucleic acids, especially the circulating cell-free DNA (cfDNA), have allowed the development of effective low-invasive liquid biopsy technologies<sup>1</sup>. However, despite an increasing use of cfDNA for the assessment of cancer genetics, little is already known about the natural history, the origins and the biochemical forms of circulating DNA<sup>2</sup>. Besides, there is a growing interest in circulating exosomes as a source of genetic material easily accessible for liquid biopsy<sup>3</sup>.

Exosomes are microvesicles measuring between 30-100nm that are physiologically secreted in all biofluids. During their biogenesis exosomes are packed with biologically active molecules such as nucleic acids and proteins through what is believed to be a non-random mechanism. Circulating exosomes can be isolated in virtually all biofluids and might be used for liquid biopsy with the advantage of preserving a diverse molecular content from the degradation by endogenous nucleases into a phospholipid bilayer membrane. Exosomes isolated from plasma of healthy donors as well as cancer patients reportedly contain high molecular weight double-stranded DNA. Whole genome sequencing has shown that DNA extracted from exosomes represents the entire genome and, when isolated from a cancer patient, it contains a high tumor fraction<sup>4</sup>. However, those pilot studies involved a very limited number of cases (less than 10 total) and used disparate methodologies.

Moreover, those previous works were limited to the study of exosomal fraction of circulating DNA from cancer patients without any comparison either between cfDNA and exosomal fraction or between cancer patient and normal healthy controls. Of note, evidences of DNA exosomal content are still poor and more investigations are needed to validate the presence of DNA inside the exosomes and to determine its characteristics compared to the cfDNA. Here, we aim to discuss the pros and the cons of the utilization of circulating exosomal DNA for liquid biopsy, based on a review of the current literature and considering few of our preliminary data on the topic.

#### References:

1. Newman, A. M. et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* 20, 548–554 (2014).
2. Snyder, M. W. et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 164, 57–68 (2016).
3. Thakur, B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 24, 766–769 (2014).
4. San Lucas, F. A. et al. Minimally invasive genomic and transcriptomic profiling of visceral cancers by next-generation sequencing of circulating exosomes. *Ann. Oncol.* 27, 635–641 (2016).



VENREDI 3 FÉVRIER 2017  
SESSION 3



## Immunothérapie en hématologie : état de l'art et actualités

---

**Pr Régis Costello**

PU-PH, chef de service Hématologie et thérapie cellulaire, CHU La Conception, Marseille, France

L'intérêt potentiel de l'immunothérapie dans le traitement des cancers était déjà évoqué aux débuts de l'immunologie, mais son application restait impossible pour des raisons technologiques. Le premier grand jalon a sans nul doute été l'essor des anticorps monoclonaux, avec comme réussite particulièrement éclatante l'utilisation de l'anti-CD20 « historique », à savoir le rituximab, dans les hémopathies lymphoïdes. Les anticorps monoclonaux restent au premier plan de l'immunothérapie en hématologie. Il peut s'agir « simplement » d'améliorations significatives de la molécule comme le montre l'exemple de l'obinutuzumab, plus efficace dans la lyse tumorale que le rituximab tout en ayant la même cible, le CD20.<sup>(1)</sup> La cible tumorale peut être diverse, et l'anticorps couplé à une toxine, dont on sait à l'heure actuelle mieux maîtriser la toxicité, comme le montre l'utilisation du brentuximab vedotin (anti-CD30 couplé à l'auristatine E) dans les lymphomes de Hodgkin<sup>(2)</sup>. Mais il peut s'agir de modification beaucoup plus significative, comme la synthèse d'anticorps monoclonaux bispécifiques qui vont créer un lien entre la cible tumorale et l'effecteur lymphocytaire. Le meilleur exemple en est le blinatumomab, qui est un Bispecific 6-cell Engager (BiTE®) anticorps monoclonal<sup>(3)</sup>. Le blinatumomab a révolutionné la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques, remettant en cause même certaines indications de l'allogreffe. Mais les avancées de l'immunothérapie en hématologie ne se limitent pas à l'amélioration de la technologie anticorps mais aussi à la définition de nouvelles cibles innovantes. Alors que jusqu'à récemment les monoclonaux visaient à détruire plus ou moins directement les cellules tumorales en ciblant les antigènes exprimés par ces dernières, les nouveaux concepts se focalisent sur la modulation des « immune checkpoints », à savoir comment enlever les freins à la réponse immune<sup>(4)</sup>. Les cibles peuvent être CTLA-4 ou bien PD1 ou son ligand PD1-L, comme le nivolumab et le pembrolizumab, monoclonaux d'intérêt tout particulier dans les lymphomes (notamment la maladie de Hodgkin). Il faut noter que ces approches ne se limitent pas à l'hématologie car les modulateurs des « immune checkpoints » présentent aussi une efficacité dans plusieurs types de tumeurs solides. Enfin, parmi les avancées majeures de l'immunothérapie il faut citer les Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-lymphocytes<sup>(5)</sup>. Il s'agit de lymphocytes T chez lesquels un récepteur antigénique chimérique spécifique d'un antigène tumoral donné a été transfecté, stimulant efficacement la cytotoxicité car sa portion intra-cytoplasmique a été couplée à plusieurs séquences d'activation. Si cette thérapie est spécifique à chaque patient, le modèle économique actuel se développe à grande vitesse avec la commercialisation par des biotech privées de CAR T-cell « à façon » pour chaque patient.

### Références :

1. Illidge T, Klein C, Sehn LH, Davies A, Salles G, Cartron G. Obinutuzumab in hematologic malignancies: lessons learned to date. *Cancer Treat Rev.* 2015 Nov;41(9):784-92.
2. Novakovic BJ. Immunotoxin - a new treatment option in patients with relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Radiol Oncol.* 2015 Nov 27;49(4):315-9.
3. Zhu M, Wu B, Brandl C, Johnson J, Wolf A, Chow A, Doshi S. 1. Blinatumomab, a Bispecific T-cell Engager (BiTE®) for CD-19 Targeted Cancer Immunotherapy: Clinical Pharmacology and Its Implications *Clin Pharmacokinet.* 2016 Oct;55(10):1271-88.
4. Matsuki E, Younes A. Checkpoint Inhibitors and Other Immune Therapies for Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2016 Jun;17(6):31.
5. Brown CE, Adusumilli PS. Next frontiers in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics.* 2016 Nov 30;3:16028. eCollection 2016.

## Recherche translationnelle en immuno-oncologie

---

**Pr Christophe Borg**

*UMR1098 UBFC/EFS/INSERM, CHRU Besançon, France*

L'avènement des immunothérapies permet aujourd'hui d'envisager, dans les tumeurs solides, l'introduction des inhibiteurs de checkpoint immunologique (CKI) en lieu et place de la chimiothérapie ou des inhibiteurs de tyrosine kinase dans le mélanome, les cancers du poumon, les cancers de vessie et du rein, les cancers liés à une infection virale (HPV, Merckel), ainsi que les cancers porteurs d'une instabilité génique...

L'enjeu est aujourd'hui l'identification de biomarqueurs qui permettront demain d'identifier les patients pour lesquels les CKI pourront être prescrits en monothérapie dès le début de la prise en charge afin de générer des réponses durables. Chez ces patients, le suivi immunitaire devra également déterminer le stade où les réponses immunologiques mémoires pourront permettre l'arrêt des traitements.

À l'inverse, l'analyse intégrée des interactions cancer-microenvironnement sera nécessaire pour définir les résistances aux CKI et déterminer comment prescrire des combinaisons thérapeutiques permettant de restaurer une efficacité optimale des immunothérapies. Nous effectuerons une revue systématique des études translationnelle qui indique déjà aujourd'hui comment comprendre les mécanismes de résistance aux TKI. Il est d'ores et déjà envisageable de proposer une médecine personnalisée immunologique en intégrant des données du statut génomique des cancers, de l'activité transcriptionnelle, de la charge antigénique, du contexte lié au microenvironnement (hypoxie, métabolisme, stroma) et de la compétence du système immunitaire.

## Immunogenic cell death inducers trigger PD-L1 dependent adaptive immune resistance

---

**Pr François Ghiringhelli**

*Full Professor of Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France*

Some chemotherapeutic drugs trigger an immunogenic form of tumor cell death, which elicits CD8 T cell-dependent anticancer immune responses. However, chemotherapy-driven anticancer immunity fails to induce permanent tumor regression in mice and shows limited efficacy in the clinic. The reasons why CD8 T cell anticancer responses triggered by immunogenic chemotherapies are transient remain elusive.

Here we show in tumor-bearing mice that immunogenic chemotherapies elicit *in vivo* tumor expression of PD-L1, which drives the dysfunction of tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes and compromises their ability to eradicate tumors. The induction of tumor PD-L1 expression by chemotherapies was dependent on their ability to drive immunogenic cell death and IFN $\gamma$ -producing CD8 anticancer T cells, thereby defining PD-L1 tumor expression as an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapies. In human colon cancer patients, immunogenic chemotherapies also promoted PD-L1 in the tumor microenvironment, which was correlated with CD8 T cell infiltration and immunogenic cell death markers. Finally, in two mouse colon cancer models, therapeutic prevention of CD8 T cell dysfunction using anti PD-1 monoclonal antibody *in vivo* synergized with immunogenic chemotherapy and led to complete tumor regressions.

Our study thus uncovers a novel negative feedback mechanism impeding the anticancer efficacy of immunogenic chemotherapies.

## How to enhance the anticancer effect of immunogenic chemotherapies?

---

**Dr Lionel Apetoh**

*Responsable d'équipe au sein de l'INSERM UMR1231, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France*

While the efficacy of anticancer therapies was usually considered to only rely on their cytotoxic effect on tumor cells, we and others reported that several anticancer drugs also promoted the development of CD8 T cell-dependent anti-cancer immunity, which made a decisive contribution to the therapeutic outcome<sup>(1-3)</sup>.

However, chemotherapy or radiotherapy-driven anticancer immunity fails to induce permanent tumor regression in mice and shows limited efficacy in the clinic. The reasons why CD8 T cell anticancer responses triggered by immunogenic chemotherapies are transient remain elusive.

In this presentation, I will show results that uncover what we believe to be a novel negative feedback mechanism impeding the anticancer efficacy of immunogenic chemotherapies. I will also discuss the possibilities of therapeutic interventions to enhance the anticancer efficacy of immunogenic chemotherapies.

**References:**

1. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13: 1050-1059.
2. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009; 15: 1170-1178.
3. Vincent J, Mignot G, Chalmin F et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010; 70: 3052-3061.



VENDREDI 3 FÉVRIER 2017  
SESSION 4



## Pharmacologie des anticorps : vers une standardisation des techniques

---

François Becher<sup>1</sup>, Joseph Ciccolini, Diane-Charlotte Imbs, Clémence Marin, Claire Fournel, Charlotte Dupuis, Aurélie Ghetta, Alain Pruvost, Christophe Junot, Florence Duffaud, Bruno Lacarelle & Sébastien Salas

1. Pharm.D. Ph.D. CEA Saclay, DSF/iBiTec-S / Service de Pharmacologie et d'Immuno-analyse, Gif-sur-Yvette, France

Le suivi thérapeutique pharmacologique nécessite de disposer de techniques analytiques robustes, précises et adaptées à des dosages de routine, point critique pour une application aux anticorps thérapeutiques.

La spectrométrie de masse permet d'atteindre un haut niveau de spécificité et de robustesse, notamment par le biais des appareils triple quadripolaires fonctionnant en mode SRM (Selected Reaction Monitoring)<sup>(1)</sup>. L'intérêt de cette technique est déjà bien connu pour le dosage des petites molécules. L'utilisation de la spectrométrie de masse pour la quantification absolue de protéines, biomarqueurs ou protéines thérapeutiques, a récemment émergé en complément des tests immunologiques<sup>(2,3)</sup>. Néanmoins, la nature protéique de l'analyte reste un challenge pour des analyses sensibles de routine en raison de la masse moléculaire élevée et de l'abondance et de la diversité des protéines endogènes plasmatiques. Ainsi, la préparation de l'échantillon avant l'analyse par spectrométrie de masse est un élément déterminant des performances de la méthode.

Cetuximab est un anticorps chimérique utilisé pour le traitement de diverses tumeurs solides. Plusieurs études ont illustré l'influence de la pharmacocinétique sur la survie des patients<sup>(4,5)</sup>. En collaboration avec le Dr Joseph Ciccolini du CHU de La Timone, nous avons montré la possibilité de suivre les concentrations plasmatiques de cetuximab par une nouvelle méthode LC-MS/MS (SRM) adaptée à des dosages en routine clinique. Un protocole simplifié et rapide de préparation de l'échantillon plasmatique, n'utilisant aucun réactif d'affinité, a été développé. Il comprend une précipitation des protéines par solvant organique et une digestion accélérée du culot de protéines, complétées par un court fractionnement des peptides issus de la digestion de l'anticorps sur cartouche SPE. La méthode a été validée (répétabilité, reproductibilité, linéarité, sensibilité, stabilité) selon les critères EMA puis appliquée à la mesure des concentrations résiduelles et maximales de 25 patients traités par cetuximab.

Cette méthodologie simple et rapide pourrait s'implémenter dans divers laboratoires pour réaliser, à terme, un suivi thérapeutique du cetuximab comme le laisse envisager les résultats prometteurs obtenus.

### Références :

1. Picotti, P. et al. *Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions*. *Nat. Methods* 30, 555-66 (2012).
2. Addona, T.A. et al. *Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma*. *Nat. Biotechnol.* 27, 633-41 (2009).
3. Barthelemy NR et al. *Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity*. *J Proteome Res.* 15, 667-76 (2016)
4. Pointreau, Y. et al. *Cetuximab Pharmacokinetics Influences Overall Survival in Patients With Head and Neck Cancer*. *Ther. Drug Monit.* 38, 567-72 (2016).
5. Azzopardi, N. et al. *Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients*. *Clin. Cancer Res.* 17, 6329-37 (2011).

# Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique pour l'individualisation posologique Bayésienne des inhibiteurs des tyrosine kinases

---

**Pr Chantal Csajka**

*Prof Associée de pharmacie clinique*

*Division de Pharmacologie clinique, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois et Université de Lausanne ;  
École de Pharmacie, Université de Genève et Université de Lausanne, Suisse*

La plupart des inhibiteurs des tyrosines kinases (ITKs) sont commercialisés à doses fixes, malgré une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques, susceptible de conduire à une toxicité ou à un manque d'efficacité. En raison de cette grande variabilité pharmacocinétique, de l'absence de marqueur clair de réponse et la présence d'une relation entre les concentrations et l'efficacité et/ou la toxicité, la plupart des médicaments de cette classe paraissent de bons candidats au suivi thérapeutique pharmacologique. Bien que les intervalles thérapeutiques doivent encore être mieux caractérisés pour certaines molécules, des cibles thérapeutiques ont été proposées et l'utilité clinique d'un suivi thérapeutique pharmacologique a été démontrée pour certaines d'entre elles.

Le suivi thérapeutique pharmacologique Bayésien est une méthode d'ajustement posologique basé sur des approches de modélisation pharmacocinétique de population, dont le but est de fournir une interprétation d'une ou plusieurs concentrations mesurées chez un patient, pondérée par les connaissances a priori des caractéristiques du médicament dans la population d'intérêt. Ces outils permettent d'évaluer si les concentrations observées chez un patient sont attendues compte tenu de la posologie et de prédire leur évolution après ajustement des doses.

Au travers de l'exemple de l'imatinib, notre nouvel outil Bayésien d'assistance à l'adaptation posologique Tucuxi® sera présenté. Les concepts de pharmacocinétique de population, de percentiles de concentrations *a priori* et *a posteriori* dérivés du modèle et d'ajustement Bayésien seront illustrés par le cas d'un patient traité par ce médicament. Nous discuterons des enjeux importants liés à l'individualisation des posologies d'anticancéreux ciblés pour optimiser leur efficacité, leur sécurité et leur économicité.

## Actualités - PK/PD des biothérapies : prêt pour le STP ?

---

**Dr Joseph Ciccolini**

*SMARTc INSERM UMR S\_911, Marseille & GPCO-Unicancer, France*

Les biothérapies sont devenues incontournables en oncologie, dans la prise en charge des syndromes myelodysplasiques, des tumeurs solides et dernièrement avec l'avènement des immune check-point inhibitors dans un nombre croissant d'indications.

Pendant longtemps, on a cru que l'efficacité des biothérapies ne dépendait que de l'expression de la cible et/ou du statut mutationnel ou génétique des voies de signalisation sous-jacentes. Ce paradigme a donné lieu au développement de la médecine bioguidée, qui repose sur la caractérisation en amont de la tumeur et la recherche préalable de biomarqueurs prédictifs de réponse. Malgré les énormes ressources engagées dans le développement systématique de la pharmacogénomique en pratique clinique de routine, près de la moitié des patients screenés sur une base génétique ou moléculaire peineront à bénéficier d'une réponse clinique durable après traitement par biothérapie.

Une hypothèse, encore largement sous-estimée, serait que des concentrations circulantes insuffisantes en biothérapies pourraient, en partie, expliquer les échecs thérapeutiques constatés chez des patients pourtant sélectionnés sur la base de leur statut génétique et moléculaire somatique. Des données cliniques issues de l'utilisation du rituximab, du trastuzumab, du cétuximab, du bévacizumab, du ramucirumab suggèrent en effet qu'il existe probablement des seuils d'exposition prédictifs de la réponse thérapeutique et/ou de la toxicité avec ces biothérapies. De façon plus notable encore, les produits d'immunothérapie, pour lesquels aucun biomarqueur n'est encore clairement validé, pourraient également voir leur efficacité corrélée à la pharmacocinétique, comme cela a été montré récemment avec l'ipilimumab dans le mélanome métastatique.

Bien qu'encore limitées et éparses, l'ensemble de ces données plaide pour une réflexion quant à l'intérêt de développer, à l'instar de certaines thérapies ciblées (imatinib) ou chimiothérapies (MTX), des programmes de suivi thérapeutique pour les anticorps monoclonaux avec stratégie d'individualisation posologique, pour une véritable médecine personnalisée en oncologie.

## Biomarqueurs immunologiques intra-tissulaires pour la définition du pronostic

---

**Pr Franck Pagès**

*Responsable de la plateforme d'analyse du micro-environnement tumoral,  
Service d'Immunologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France*

Les concepts biologiques dominants du XX<sup>e</sup> siècle ont favorisé un paradigme « centro-cellulaire » du cancer. Ce paradigme semble avoir atteint un niveau de connaissance très abouti ne pouvant expliquer à lui seul le comportement tumoral. Une rupture conceptuelle s'est progressivement imposée devant la démonstration de la capacité du système immunitaire à détruire les cellules cancéreuses ou à contenir leur expansion associée à la capacité des cellules cancéreuses d'induire un état d'épuisement et d'inactivation des lymphocytes T. Les données du microenvironnement tumoral et en particulier de sa composante immunitaire sont ainsi apparues comme essentielles pour mieux appréhender l'évolution du processus tumoral.

Sur le plan pronostique, une forte infiltration en lymphocytes T CD3+, T CD8+ cytotoxiques et en T CD45RO+ mémoires, s'est révélée associée à une survie sans récurrence et une survie globale prolongée dans de nombreuses tumeurs solides<sup>(1)</sup>. Dans le cancer colorectal, l'impact pronostique de la composante immunitaire localisée dans la tumeur et le front (ou marge) d'invasion a conduit à l'élaboration d'un test puissant et robuste, appelé « Immunoscore » basé sur la quantification en imagerie de populations immunitaires intra-tumorales (CD3+, CD8+)<sup>(2)</sup>. Ce critère immunitaire se révèle être un paramètre indépendant des données d'extension tumorale (stade TNM) pour discriminer les patients à risque de récurrence et de décès<sup>(1, 3)</sup>. Afin de favoriser un transfert clinique de l'Immunoscore, une plateforme d'immunomonitoring de la réponse immunitaire intra-tumorale a été développée au sein de l'HEGP.

Une étude rétrospective internationale sous l'égide du SITC (The Society for Immunotherapy of Cancer) regroupant 23 centres dans 17 pays a eu pour objectif de valider le test Immunoscore dans les cancers du côlon. Plus de 3 800 échantillons de patients atteints de cancer du côlon de stade I à III n'ayant pas reçu de traitement néo-adjuvant ont été analysés par chacun des centres investigateurs sous le contrôle et la coordination de la plateforme d'immunomonitoring de l'HEGP. Les premiers résultats de cette étude viennent d'être présentés à l'ASCO 2016<sup>(4)</sup>. Les analyses statistiques ont été réalisées de façon indépendante par un groupe statistique de la Mayo Clinic (Pr. D Sargent) selon un plan méthodologique préalablement établi. L'Immunoscore a permis de prédire le temps avant récurrence, lorsque les patients étaient classés en 2 groupes (HR entre 0.41-0.51;  $p < 0.0001$ ) ou en 3 groupes (HR = 0.2-0.51;  $p < 0.0001$ ). De plus, l'Immunoscore en 2, 3 ou 5 groupes constituait sur l'ensemble des cohortes un paramètre indépendant en analyse multivariée ajustés sur l'âge, le sexe, le stade T et N et le statut MSI. Ainsi, cette étude a montré que l'Immunoscore était un test robuste qui permet de façon indépendante du TNM de préciser le devenir clinique des patients présentant un cancer du côlon de stade I-III. Les applications cliniques potentielles de l'Immunoscore pourraient être aussi bien pronostiques que théranostiques.

### Références :

1. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predicts Clinical Outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960-4.
2. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pagès F. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol.* 2016;28(8):373-82.
3. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):610-8.
4. Galon J, Mlecnik B, Marliot F, Ou F-S, Bifulco CB, Lugli A, ..., Pagès F. Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *ASCO Meet Abstr* 2016;34:3500

## Détection des lymphocytes T antitumoraux polypécifiques : biomarqueur des immunothérapies ?

---

**Pr Marcello de Carvalho**

*PU-PH, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine et CHRU de Nancy, France*

Le développement potentiel de cancers est constamment arrêté par le système immunitaire qui détruit les cellules anormales par le biais d'un système raffiné d'immunosurveillance anti-tumorale. Les cellules tumorales, en contrepartie, développent des stratégies d'échappement pour permettre leur croissance. L'apparition d'un cancer décelable est ainsi le fruit d'un long processus au cours duquel les différents mécanismes de destruction immunologique ont été neutralisés par les cellules tumorales, selon le concept « d'immunoediting ». Cependant, une trace des efforts du système immunitaire pour éliminer la tumeur persiste et peut être mise en évidence chez certains patients. Ainsi, les patients chez qui des lymphocytes T spécifiques d'antigènes associés aux tumeurs (AATs) sont détectables ont un pronostic favorable et une meilleure réponse aux chimiothérapies. Il existe donc un intérêt majeur à déterminer cette réponse spécifique d'AATs au moment du diagnostic, mais également pendant le suivi thérapeutique de patients cancéreux.

Parmi les mécanismes d'échappement tumoral, l'état dysfonctionnel dit « d'épuisement » des lymphocytes T spécifiques d'AATs joue un rôle majeur. Cet état est caractérisé par une perte d'efficacité fonctionnelle des lymphocytes T et est induit par la liaison entre certains récepteurs inhibiteurs exprimés par les lymphocytes T et leurs ligands respectifs exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes et/ou les cellules tumorales elles-mêmes. En l'absence d'apoptose, cet état d'épuisement est réversible et plusieurs études ont démontré que des anticorps dirigés contre ces récepteurs inhibiteurs et/ou leurs ligands peuvent restaurer la fonction des lymphocytes T spécifiques. Cette stratégie de « checkpoint blockade » a un grand potentiel pour améliorer le pronostic des maladies néoplasiques, avec des réponses cliniques durables. Cependant, cette efficacité est variable, environ 50 % des patients seulement présentant une réponse clinique. Les mécanismes déterminant la réponse clinique au checkpoint blockade sont multifactoriels, mais des travaux récents suggèrent l'importance majeure de la présence préalable d'une réponse immune spécifique anti-tumeur. Ceci renforce l'importance d'un immunomonitoring des réponses spécifiques d'AATs dans la prise en charge thérapeutique de ces patients. Nous utilisons une approche innovante d'immunomonitoring des réponses lymphocytaires T spécifiques d'AATs basée sur la détection des cytokines intracellulaires par cytométrie en flux multiparamétrique, après stimulation par des AATs en présence *in vitro* d'anticorps monoclonaux ciblant les checkpoints inhibiteurs. Cette approche a permis la détection d'un nombre accru de lymphocytes T spécifiques d'AATs, associée à une augmentation de la production de cytokines par ces cellules. Des réponses polyfonctionnelles sont également identifiées. De plus, la cytométrie en flux multiparamétrique permet l'identification précise des sous-populations impliquées dans cette réponse spécifique (TCM, TEM, TEFF et TSCM). L'analyse combinée des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques permet ainsi une caractérisation approfondie de la qualité de réponses spécifiques d'antigènes.

Nous présenterons et discuterons nos résultats préliminaires ainsi que l'intérêt potentiel des approches innovantes dans l'immunomonitoring des patients atteints d'un cancer. Ces résultats suggèrent que cette méthode pourrait accroître significativement l'efficacité de l'immunomonitoring anti-AATs, permettant d'identifier des réponses présentes mais non-détectables avec les protocoles courants.

## Monitoring des Innate Lymphoid Cells (ILCs) en cancérologie

---

**Dr Camilla Jandus**  
*Lausanne, Suisse*

Innate Lymphoid Cells (ILCs) were recently identified as a distinct family of lymphocytes playing an important role in immunity. ILCs are devoid of antigen receptors and are stimulated to expand and differentiate by the cytokine environment. They can be identified as lineage negative, IL-7 receptor alpha (CD127) positive cells, and further divided into 3 functional subgroups (ILC1, ILC2 and ILC3), that mirror the transcriptional regulation and functional specialization of CD4 T cells (Th1, Th2 and Th17). While ILCs have been implicated in different human pathologies, their role in human anti-tumor immunity remains largely unknown. Therefore, in preliminary experiments we investigated frequency and function of ILCs in samples from treatment-naive patients with different hematologic and solid malignancies. We identified tumor-type specific dysfunction within the ILC compartment, both in peripheral blood and directly in tumor tissues.

I will discuss the potential opposite roles of ILC2 and ILC3 in human anti-tumor immunity and provide initial evidence for an implication of ILCs in immunoregulation in patients suffering from different solid and liquid tumor types. Thus, ILCs-targeting might represent a novel immunotherapeutic approach to favor human anti-tumor responses.



VENREDI 3 FÉVRIER 2017  
SESSION 5



## Le micro-environnement : une source d'outils cliniques pour le cancer du pancréas

---

**Pr Richard Tomasini**

*INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, France*

Les données récentes en épidémiologie sur le cancer du pancréas sont parmi les plus négatives en cancérologie ; une incidence en forte hausse (sans cause évidente), un diagnostic toujours tardif et des possibilités de prises en charges réduites de par le faible arsenal thérapeutique disponible. Parmi les causes avancées à l'inefficacité de la majorité des traitements se trouvent l'architecture tissulaire de ces tumeurs et la présence d'une réaction desmoplastique extensive. En effet, la richesse et la complexité cellulaire et acellulaire qui composent ces tumeurs sont autant d'éléments variés pouvant permettre aux cellules tumorales de survivre dans un environnement à priori hostile, fréquemment hypoxique et appauvri en nutriment.

De nombreuses études ont fait part de l'importance du dialogue inter-cellulaire dans ce contexte et tout particulièrement des réseaux de communication s'établissant entre cellules tumorales et stromales, notamment les CAFs (fibroblastes associés au cancer) et les macrophages. Ainsi les différents échanges transmis permettent aux cellules tumorales de supporter leur environnement, tout en potentialisant leur capacité de dissémination et d'agressivité. Ces communications établies à travers la sécrétion de vésicules extra-cellulaires (Leca et al., 2016) ou de protéines (Secq et al., 2015) permettent de modifier le comportement des cellules tumorales ou le devenir de la tumeur.

De nos jours, les avancées réalisées dans ce domaine permettent de montrer la complexité du dialogue inter-cellulaire dans le cancer du pancréas tout en ouvrant la voie à une source extrêmement riche d'outils cliniques.

En effet, les molécules impliquées dans la communication inter-cellulaire au sein de la tumeur sont autant de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques potentielles permettant l'amélioration de la prise en charge des patients.

## L'autophagie est-elle une cible thérapeutique ?

---

### Pr Michaël Boyer-Guittaut

Professeur des Universités, Responsable du Groupe « Autophagie, TEM et immunité anti-tumorale » au sein de l'équipe TIM-C, « Thérapeutique Immuno-Moléculaire des Cancers », de l'UMR1098 « Interactions Hôte-Greffon-Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Génique », Université de Franche-Comté, Besançon, France

L'autophagie est un processus « d'auto-cannibalisme cellulaire » décrit pour la première fois dans les années 60 par Christian De Duve et dont le nom provient du grec *auto*, « soi-même » et *phagos*, « manger ». Le processus d'autophagie, qui est contrôlé par plus de 40 protéines ATGs (*AuTophagy related proteins*), nécessite la formation de vésicules intracellulaires à double membrane qui permettent le recyclage des constituants cellulaires ainsi que l'élimination de molécules toxiques, de protéines anormales et d'organelles endommagées en situations de stress.

La régulation de l'autophagie dans les processus cancéreux semble primordiale mais son rôle dans le mécanisme oncogénique demeure encore mal compris. Ainsi, une augmentation de l'autophagie semble protéger les cellules de leur transformation en cellule tumorale en inhibant l'apparition de mutations ou de dommages de l'ADN en conditions de stress mais, dans les tumeurs en croissance, l'autophagie semble favoriser la résistance des cellules cancéreuses à une carence nutritionnelle ou un manque d'oxygène, des conditions retrouvées dans les tumeurs solides.

Du fait de l'importance de l'autophagie au cours des différentes étapes de la formation et du développement tumoral, ce processus est devenu au cours de la dernière décennie une cible thérapeutique, avec notamment l'utilisation en essai clinique d'inhibiteurs de l'autophagie tels que l'hydroxychloroquine. Néanmoins, l'efficacité de ces inhibiteurs reste encore à démontrer et, étant donné le rôle paradoxal de l'autophagie au cours de différentes étapes du processus tumoral, ces protocoles nécessiteront une meilleure caractérisation des tumeurs à cibler notamment *via* la recherche de marqueurs pronostic spécifiques de ce processus.

C'est pourquoi au laboratoire nous nous intéressons à la recherche et la caractérisation de ce type de biomarqueurs en ciblant différents effecteurs de l'autophagie tel qu'ATG8 ou ATG9. Nous nous intéressons également à leur régulation génique et plus particulièrement leur régulation épigénétique au cours du développement tumoral.

#### Références :

- Berthier, A., Seguin, S., Sasco, A.J., Bobin, J.Y., De Laroche, G., Datchary, J., Saez, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Tolle, F., Fraichard, A., Boyer-Guittaut, M., Jouvenot, M., Delage-Mourroux, R. and Descotes, F. High expression of *gabap11* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2010. 102(6), 1024-31.
- Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bôle-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama FZ, Fraichard A, Darley-Usmar VM, Despouy G, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Zhang J. The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy*. 2014, Jun;10(6):986-1003.
- Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, Pérez V, Fraichard F, Adami P, Despouy G, Monnier F, Algros MP, Jouvenot M, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. The Autophagy GABARAPL1 gene is Epigenetically Regulated in Breast Cancer Models. *BMC cancer*. 2015, Oct 17;15:729. doi: 10.1186/s12885-015-1761-4.
- Claude-Taupin A, Boyer-Guittaut M, Delage-Mourroux R, Hervouet E. Use of epigenetic modulators as a powerful adjuvant for Breast Cancer therapies. *Methods in molecular biology*. 2015, 1238:487-509. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1\_25.

## Du côté des phases I : les nouvelles molécules pour cibler le micro-environnement

---

**Dr Nicolas Isambert**

*Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France*

Le développement tumoral implique des altérations génétiques et épigénétiques qui pose de nos jours les fondamentaux de la biologie du cancer. Cependant, ce développement n'est pas limité à l'accumulation d'anomalies intrinsèques. En effet, il a été démontré l'importance des interactions entre les cellules précancéreuses et cancéreuses avec leur micro-environnement au cours des différentes étapes de l'évolution de la maladie.

De ce fait, la caractérisation du rôle du micro-environnement est devenue un objectif crucial en cancérologie afin de mieux comprendre et mieux traiter le cancer.

Dans un premier temps, l'étude du microenvironnement tumoral s'est axée sur les interactions avec les cellules immunitaires, mais aujourd'hui les différents éléments entourant la cellule tumorale sont pris en considération. En effet, les cellules communiquent entre elles ainsi qu'avec le stroma de manière dynamique afin de moduler le micro-environnement.

Cette communication se fait de manière directe par des interactions fonctionnelles (récepteurs de surface) ou indirect par la sécrétion de facteurs solubles dans le milieu extracellulaire tels que les facteurs de croissance, les hormones, les chemokines... Certaines molécules ont déjà été identifiées dans le stroma tumoral tel que le VEGF, TGF-B.

Des traitements anti-cancéreux ont déjà été développés (bevacizumab, sunitinib,...) et démontrer un impact majeur en clinique. Ainsi, la prise en compte de cet environnement tumoral permet de nos jours le développement des thérapies de demain.

Les nouvelles approches thérapeutiques ciblant le micro-environnement seront présentées.

5<sup>E</sup> ÉDITION

CONGRÈS

# ONCOTRANS 2 & 3 FÉVRIER 2017



Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon



ÉVALUATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE :  
IMPLICATION POUR L'ONCOLOGIE MOLÉCULAIRE  
ET L'IMMUNOTHÉRAPIE DES CANCERS

## COMMUNICATIONS ORALES SÉLECTIONNÉES

[www.oncotrans.fr](http://www.oncotrans.fr)



Ville de  
**Besançon**

CONGRÈS

# ONCOTRANS

## 2 & 3 FÉVRIER 2017

Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon



## SOMMAIRE

### JEUDI 2 FÉVRIER 2017

#### SESSION 1 ..... P. 3

- **P. 4 :** Assessment of the prognostic role of a 94-single nucleotide polymorphisms risk score in early breast cancer in the SIGNAL/PHARE prospective cohort: no correlation with clinico-pathological characteristics and outcomes, *Elsa Curtit (Besançon, France)*
- **P. 5 :** From ER $\alpha$ 66 to ER $\alpha$ 36: a new predictive marker for cancer progression and therapeutic response in breast tumors ? *Charlène Thiebaut (Vandoeuvre-les-Nancy, France)*
- **P. 6 :** Un nouveau marqueur pronostique dans le cancer du sein Her2+ : l'héparane-sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A), *Sandrine Gulberti (Vandoeuvre-les-Nancy, France)*
- **P. 7 :** Glioma-initiating cells support glioblastoma heterogeneity at the level of integrin  $\alpha 5\beta 1$ , *Marie-Cécile Mercier (Illkirch, France)*
- **P. 8 :** Lymphome à cellules B primitif du médiastin : régulation transcriptionnelle de FOXP1 par miR-92a, *Guillaume Gapihan (Paris, France)*

#### SESSION 2 ..... P. 9

- **P. 10 :** Accelerated BRAF mutation analysis using a fully automated PCR platform improves the management of patients with metastatic melanoma: MELFAST trial, *Alexandre Harlé (Vandoeuvre-les-Nancy, France)*
- **P. 11 :** Technical insights into highly sensitive isolation and molecular characterization of circulating tumor cells for early detection of tumor invasion, *Patrizia Paterlini-Brechot (Paris, France)*
- **P. 12 :** L'hétérogénéité tumorale : de la théorie à la routine clinique, *Jean-François Laes (Gosselies, Belgique)*
- **P. 13 :** A bioinformatic approach to analyse ANGPT2 gene expression in colorectal cancer patients, *Marine Jary (Besançon, France)*

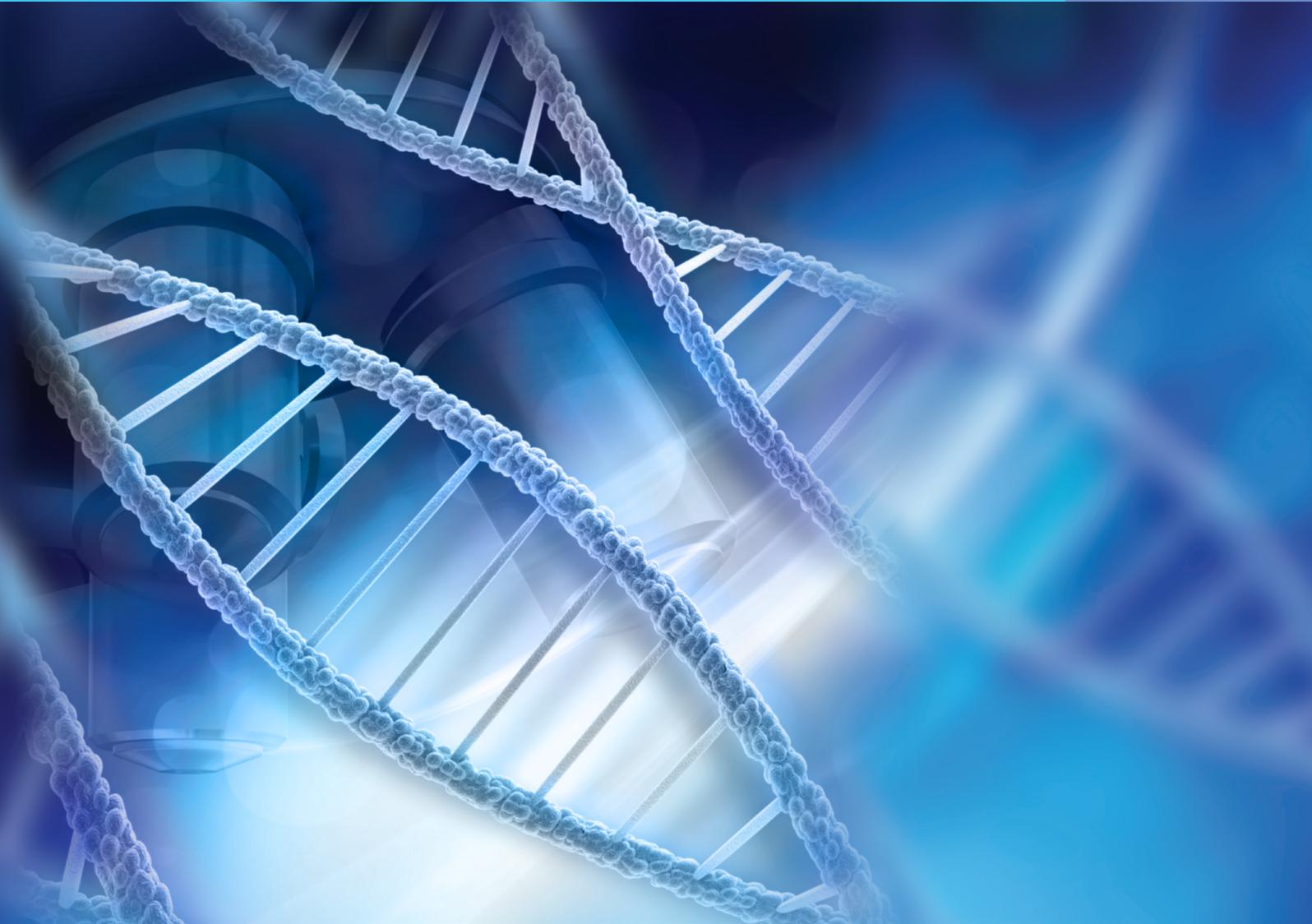
### VENDREDI 3 FÉVRIER 2017

#### SESSION 4 ..... P. 14

- **P. 15 :** Dual impact of mTOR inhibition on antitumor T cell responses in metastatic renal cell carcinoma patients, *Laura Mans (Besançon, France)*
- **P. 16 :** Receptor tyrosine kinase identification/quantification using LC/MSMS, *Patrick Vitaux (Montigny-le-Bretonneux, France)*
- **P. 17 :** Immunogenic cell death inducers trigger PD-L1 dependent adaptive immune resistance to cancer, *Magalie Dosset (Besançon, France)*

#### SESSION 5 ..... P. 18

- **P. 19 :** Schéma métronomique : nouvelle stratégie de prise en charge de l'hétérogénéité intratumorale pour contrôler la résistance au traitement, *Maryna Bondarenko (Marseille, France)*
- **P. 20 :** Caractérisation of autophagic events during EMT of cancer cells, *Marine Jacquet (Besançon, France)*
- **P. 21 :** Targeting autophagy inhibits tumor growth by enhancing NK-cell infiltration in a CCL5-dependent manner, *Bassam Janji (Luxembourg)*
- **P. 22 :** Le récepteur matriciel syndécane-1 (SDC1) module la réponse œstrogénique des cellules de carcinome mammaire humain MCF-7, *Emmanuelle Fleurot (Caen, France)*



JEUDI 2 FÉVRIER 2017  
SESSION 1



# Assessment of the prognostic role of a 94-single nucleotide polymorphisms risk score in early breast cancer in the SIGNAL/PHARE prospective cohort: no correlation with clinico-pathological characteristics and outcomes

---

**Elsa Curtit**

*Oncologie médicale, CHRU Besançon - IRFC, Besançon, France*

## INTRODUCTION

Genome Wide Association Studies (GWAS) have to date identified 94 genetic variants (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) associated with risk of developing breast cancer. A score based on the combined effect of the 94 risk alleles can be calculated to measure the global risk of breast cancer. We aimed to test the hypothesis that the 94-SNP-based risk score is associated with clinico-pathological characteristics, breast cancer subtypes and outcomes in early breast cancer.

## METHODS

A 94-SNP risk score was calculated in 8703 patients in the PHARE and SIGNAL prospective case-cohort. Clinical data and outcomes were prospectively registered. Genotyping was obtained from a GWAS study. A two-staged genotyping strategy was carried out.

## RESULTS

The median 94-SNP risk score in 8703 breast cancer patients with early breast cancer was 77.5 (ranges: 58.1 – 97.6). The risk score was not associated with usual prognostic and predictive factors (age, TNM status, Scarff-Bloom-Richardson grade, inflammatory feature, estrogen receptor status, progesterone receptor status, HER2 status) and did not correlate with breast cancer subtypes. 94-SNP risk score did not predict outcomes represented by overall survival and disease free survival.

## CONCLUSIONS

In a prospective cohort of 8703 patients, a risk score based on 94 SNPs was not associated with breast cancer characteristics, cancer subtypes or patient's outcomes. If we hypothesize that prognosis and subtypes of breast cancer are determined by constitutive genetic factors, variants associated with breast cancer subtypes and prognosis should be different from variants involved in the risk of developing a breast cancer.

## From ERα66 to ERα36: a new predictive marker for cancer progression and therapeutic response in breast tumors?

---

**Charlène Thiebaut<sup>1</sup>, Chloé Morel<sup>1</sup>, Alexandre Harlé<sup>2</sup>, Amand Chesnel<sup>1</sup>, Agnès Leroux<sup>1</sup>, Clémence Chamard-Jovenin<sup>1</sup>, Taha Boukhobza<sup>1</sup>, Jean-Louis Merlin<sup>2</sup> & Hélène Dumond<sup>1</sup>**

**1. CRAN UMR CNRS UL 7039, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France**

**2. Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France**

Breast cancer is the main cause of cancer-induced morbidity and mortality in women. Breast tumors are usually classified according to the canonical estradiol receptor alpha (ERα66) expression status. Such a classification led to the use of endocrine therapeutic agents against [ER+] tumors.

Nevertheless, numerous therapeutic failures are observed due to unclear resistance mechanism. ERα66 was considered as the unique functional estrogen receptor in hormone sensitive breast tumor until the recent identification of membrane bound 36kDa ERα splice variant (ERα36). Our previous results indicated that a high ERα36 expression level correlates with hormone independent growth and enhanced metastatic potential (Chamard-Jovenin et al, 2015; doi: 10.1186/s12918-015-0178-7). So, we were led to the hypothesis of a link between, the ERα36 promoter methylation status, the onset of its expression/activity, activation of tumorigenic signaling pathways and acquired resistance to cancer treatment.

60 mammary tumor samples, containing at least 70% of cancer cells and clinically classified as ER-positive or ER-negative were selected from the tumor bank of the Lorraine Cancer Institute. Formalin-fixed and paraffin embedded tissues were used for immunohistochemistry analysis of ERα36 expression and intracellular localization. Cryo-conserved pieces of the same tumors were used for gene expression (RT-QPCR, western-blot), phosphoprotein (Bioplex®) and methylation analyses (methylated-CpG Island recovery assay).

To date, we have confirmed that ERα36 expression is highly variable in ER+ as well as in ER- tumors. Commercially available antibodies display a low specificity toward this variant and therefore do not allow to ascertain subcellular or intra-tumoral specific localization of the protein. ERα36 mRNA expression levels is not directly related to the methylation status of its promoter. This contradicts the hypothesis of an epigenetically controlled onset of its expression. However, ERα36 mRNA expression levels correlate with the HER2 dependent activation of PI3K/AKT/p70 signaling pathway, supporting the key role of ERα36 as a dominant positive activator of non genomic estrogen signaling pathways.

Therefore, the ongoing study of ERα36 expression and/or activation regulation processes in ERα36 high vs ERα36-low expressing tumors will help to disentangle molecular bases of ERα36 dependent therapeutic failures.

This work was supported by Ligue contre le Cancer and CCIR-GE.

# Un nouveau marqueur pronostique dans le cancer du sein Her2+ : l'héparane-sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A)

---

**Sandrine Gulberti**

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine (IMoPA), Vandoeuvre-les-Nancy, France

## INTRODUCTION

Les protéoglycanes à héparane-sulfates (HSPGs) sont des macromolécules ubiquitaires situées à la surface des cellules et au sein des matrices extracellulaires jouant un rôle-clé dans le contrôle du micro-environnement tumoral. Leur biosynthèse est assurée par une machinerie enzymatique impliquant glycosyltransférases et sulfotransférases, lesquelles ajoutent des motifs sulfatés en différentes positions de la chaîne glucidique. Elles confèrent ainsi aux HSPGs la capacité d'interagir avec de nombreux ligands comme les facteurs de croissance et leurs récepteurs.

## OBJECTIFS

Cette étude est consacrée à une famille de sulfotransférases modifiant les HS, les 3-O-sulfotransférases, impliquées dans le développement tumoral, en particulier l'isoforme 3A (3-OST3A), dont le rôle dans ce processus a été précédemment mis en évidence par notre équipe (1).

## MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Nous avons mis en évidence une régulation épigénétique du gène 3-OST3A dans un panel de lignées cellulaires cancéreuses mammaires et montré un caractère pro- ou anti-prolifératif de la 3-OST3A dépendant de la signature moléculaire des cellules tumorales. Une étude clinique, réalisée en parallèle sur une cohorte de 109 patientes atteintes de cancer du sein, a montré qu'un fort taux d'expression de la 3-OST3A est associé à un risque de rechute accru, uniquement chez les patientes atteintes d'un cancer de sous-type HER2+ (2). De façon complémentaire, une analyse multivariée a permis d'identifier que 71 % des patientes dont les tumeurs présentaient (i) un fort taux d'expression de la 3-OST3A, (ii) ayant au moins une tumeur de diamètre supérieur à 21 mm et (iii) présentant au moins un ganglion lymphatique envahi de cellules cancéreuses ont fait une rechute, résultat qui devient significatif pour le clinicien et justifie la mise en place d'une personnalisation du traitement. Pour comprendre les mécanismes qui expliquent les conséquences délétères de la forte expression de la 3-OST3A sur l'agressivité du cancer du sein HER2+, nous avons étudié l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur la prolifération des cellules SKBR3, qui surexpriment le récepteur HER2, par une approche de type « gain ou perte de fonction ». Les résultats indiquent que la surexpression de la 3-OST3A a un effet pro-prolifératif dans les cellules SKBR3 et augmente la phosphorylation de HER2, témoignant de son activation. L'étude des cascades de signalisation médiées par l'activation de ce récepteur est en cours.

## CONCLUSIONS ET RETOMBÉES ATTENDUES

Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence un rôle fonctionnel de la 3-OST3A en tant que régulateur du comportement tumoral des cellules cancéreuses mammaires et permettent de l'envisager comme marqueur pronostique de l'évolution du sous-type de tumeur mammaire HER2.

*Mots clés : héparane-sulfates, 3-OST3A, marqueur pronostic, cancer du sein HER2+.*

# Glioma-initiating cells support glioblastoma heterogeneity at the level of integrin $\alpha 5\beta 1$

---

Marie-Cécile Mercier  
MR7213, Illkirch, France

## BACKGROUND

Glioblastomas (GBM) represent the most aggressive brain tumor with 15 months median survival after diagnosis despite radio-chemotherapies. We previously discovered a correlation between integrin  $\alpha 5\beta 1$  expression and patient survival. We also demonstrated the implication of this integrin in glioblastoma chemoresistance. Immunohistochemical analysis of patient tumors indicates an inter- and intratumoral heterogeneity for  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression. GBM contains self-renewing, tumorigenic glioma-initiating cells (GIC) implicated in tumor initiation, therapeutic resistance and recurrence. Our goal was to determine if differential expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in GIC may explain the tumoral heterogeneity and if  $\alpha 5$ -positive GIC may be implicated in tumor aggressiveness.

## METHODS

A cohort of patient-derived GIC was used in this study; GICs are cultured either as neurospheres in DMEN medium supplemented with growth factors (EGF and bFGF) or as adherent differentiated tumoral cells after addition of serum in the medium. Expression of proteins was analyzed by Western Blots with specific antibodies and mRNAs by RT-qPCR with specific primers. Several markers either associated with stemness (CD133, CD44, nestin, sox2...) or with differentiation in glial, neuronal or oligodendroglial lineages (GFAP, Tuj, BMP...) were investigated as well as the expression of integrins. Phenotypical characteristics are evaluated by *in vitro* proliferation and migration assays and by the capacity of GSC to initiate tumors *in vivo* when xenografted in nude mice. NCH421k cell line was also engineered to express  $\alpha 5$  integrin by transduction of a lentiviral vector containing the human integrin gene.

## RESULTS

Two populations of GICs were characterized. Both of them do not express the  $\alpha 5$  integrin when cultured in stem/neurosphere medium although one population proved able to express the integrin after differentiation. Integrin expression conferred proliferative and migratory advantages *in vitro* that are inhibited by specific integrin antagonists and an increase in tumor aggressiveness *in vivo*. Similar results (enhanced proliferation/migration and tumorigenesis) were obtained when  $\alpha 5$  expression was forced in  $\alpha 5$ -negative cells suggesting that the integrin was indeed involved in these characteristics. Interestingly, expression of  $\alpha 5$  integrin seemed to induce a proneural to mesenchymal transition of GIC.

## CONCLUSIONS

Although  $\alpha 5\beta 1$  integrin does not appear as a glioma stem cell marker, its expression is differentially observed when stem cells differentiate to form the bulk tumor *in vitro* and *in vivo*. Tumoral heterogeneity may be preprogrammed at the GIC level. Forced expression of  $\alpha 5$  integrin in stem cells seemed to induce a switch from proneural to mesenchymal stem cells, these latter already proposed to be more aggressive in patients. Our results confirm that  $\alpha 5\beta 1$  integrin, a sensor of the tumor microenvironment, is an important player in glioblastoma aggressiveness and that it may represent a pertinent therapeutic target.

**Keywords:**  $\alpha 5\beta 1$  integrin, glioblastoma heterogeneity, stem cells.

## Lymphome à cellules B primitif du médiastin : régulation transcriptionnelle de FOXP1 par miR-92a

---

Guillaume Gapihan<sup>1</sup>, Martha Romero<sup>2</sup>, Luis Jaime Castro Vega<sup>3</sup>, Andrés Acevedo<sup>2</sup>, Li Wang<sup>4</sup>, Zhao Wei Li<sup>4</sup>, Morad El Bouchtaoui<sup>1</sup>, Mélanie Di Benedetto<sup>1</sup>, Jean-Paul Feugeas<sup>5</sup>, Philippe Ratajczak<sup>1</sup>, Catherine Thieblemont<sup>6</sup>, Carlos Saavedra<sup>2</sup> & Anne Janin<sup>1</sup>

1. U1165, Université Paris Diderot Paris 7, Paris, France

2. Service de pathologie, Hospital Universitario-Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, Colombia

3. UMR970, INSERM, Paris, France

4. Pathologie moléculaire, Institut d'hématologie de Shanghai, Shanghai, China

5. U1137, INSERM, Paris, France

6. Service d'hématologie, Hopital Saint-Louis, Paris, France

Les lymphomes à grandes cellules B primitifs du médiastin (PMBL) partagent des caractéristiques pathologiques avec les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), et des caractéristiques moléculaires communes aux lymphomes de Hodgkin classiques (cHL). Le cluster oncogénique miR-17-92, localisé au niveau du chromosome 13q31, est un gène amplifié dans les DLBCL.

Dans notre étude, nous avons comparé le niveau d'expression de chaque membre du cluster miR-17-92 dans une série de prélèvements de patients de 40 PMBL, 20 DLBCL et 20 cHL, et étudié les gènes cibles liés aux microARN dérégulés dans les PMBL.

Nous avons montré un niveau plus élevé de miR-92a dans les PMBL que dans les DLBCL, mais pas dans les cHL. La combinaison d'une analyse *in silico* prédictive des cibles de miR-92a et d'une analyse transcriptomique nous a permis d'identifier FOXP1 comme la cible principale de miR-92a dans les PMBL, un résultat qui n'avait jusqu'alors pas été établi. Cette observation a été confirmée par le test 3'UTR, le niveau d'expression ARN et protéique dans les lignées cellulaires transduites. Les études *in vivo* sur les souris à partir des cellules transduites nous a permis de démontrer l'effet tumeur suppresseur de miR-92a et l'effet oncogénique de FOXP1.

L'expression plus élevée de miR-92a et la sous-expression de FOXP1 au niveau ARN et protéique a également été retrouvée dans les prélèvements humains de PMBL, alors que le niveau d'expression de miR-92a était bas et FOXP1 était haut dans les DLBCL.

Nous en avons conclu à une régulation post-transcriptionnelle de FOXP1 par miR-92a dans les PMBL, avec une relevance clinico-pathologique pour mieux caractériser les PMBL.

**Mots clés :** lymphomes à grandes cellules B primitifs du médiastin, lymphomes diffus à grandes cellules B, cluster oncogène miR-17-92, FOXP1, approche bioinformatique.



JEUDI 2 FÉVRIER 2017  
SESSION 2

# Accelerated BRAF mutation analysis using a fully automated PCR platform improves the management of patients with metastatic melanoma: MELFAST trial

---

Alexandre Harlé<sup>1</sup>, Delphine Serre<sup>2</sup>, Julia Salleron<sup>3</sup>, Marie Husson<sup>1</sup>, Agnès Leroux<sup>1</sup>,  
Lionnel Geoffrois<sup>2</sup> & Jean-Louis Merlin<sup>1</sup>

1. *Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France*

2. *Département d'Oncologie Médicale, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France*

3. *Cellule Data Biostatistiques, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France*

## BACKGROUND

Molecular diagnosis has become a standard of care in many cancers and BRAF mutations analysis in FFPE tumor specimens is needed to initiate personalized therapy using BRAF tyrosine kinase inhibitor (vemurafenib, dabrafenib) in BRAF-mutated metastatic melanoma. Accelerated BRAF mutation analysis is achievable using CE-IVD fully automated (FA) PCR-based platform (Idylla, Biocartis) and enables the determination of BRAF mutational status in less than 2 hours including sample preparation and proved suitable for routine molecular diagnosis of metastatic melanoma (Harlé et al. *PLoS ONE* 11(4); e0153576).

## PATIENTS AND METHODS

MELFAST trial is an observational monocentric study aiming at evaluating the clinical impact of reducing BRAF status determination delay in patients with metastatic melanoma. 40 patients (pts) were included in MELFAST trial, 31 pts were included retrospectively with BRAF mutation analysis being performed according to standard operating procedures (SOP) using conventional PCR, 10 pts were included prospectively with BRAF mutation analysis being performed using FA-PCR.

## RESULTS

Among the 40 pts included, 3 pts were excluded because of violation of inclusion criteria. 37 pts that were analyzed (29 pts with retrospective inclusion and 8 pts with prospective inclusion). BRAF mutational status was not known at the time of treatment decision in 11/29 (38%) pts included retrospectively and in all the pts included prospectively. Using FA-PCR enables to provide BRAF mutational status within the same day for most of the samples and the reporting delay was significantly reduced using FA-PCR as compared to SOP (0 vs 7 days,  $p < 0.001$ ) and the delay of initiation of anti-BRAF therapy was subsequently reduced (16 vs 26 days,  $p = 0.035$ ). This reduced delay was found to be consistent with that observed when BRAF mutational status had been anticipated and was already available at the time of treatment line decision (20 days,  $p = 0.798$ ).

## CONCLUSION

As compared to conventional SOP, using FA-PCR accelerates BRAF mutation analysis reporting and significantly reduces the delay before initiation of personalized therapy in pts with metastatic melanoma. This warrants the investigation of the impact on the patients outcome i.e. progression free and overall survival.

# Technical insights into highly sensitive isolation and molecular characterization of circulating tumor cells for early detection of tumor invasion?

---

**Patrizia Paterlini-Brechot**

*INSERM U1151, University Paris Descartes, Paris, France*

## INTRODUCTION

An unsolved technical issue in the Circulating Tumor Cells (CTC) field is how to obtain highly sensitive and unbiased collection of these fragile and heterogeneous cells, in both live and fixed form, for their molecular study when they are extremely rare, thus at the beginning of the invasion process.

## MATERIAL AND METHODS

We have explored the potential of ISET® (Isolation by SizE of Tumor Cells), an open platform developed for marker-independent isolation of tumor cells from blood, to collect intact fixed and live cancer cells by using spiking analyses with extremely low numbers of fluorescent cultured cells. Then we have assessed the feasibility of Next Generation Sequencing (NGS) analyses targeted to single cells enriched by ISET using the hotspot cancer panel v2 on the Ion Torrent platform. This panel can detect 6893 possible COSMIC mutations over 50 oncogenes and tumor suppressor genes.

## RESULTS AND DISCUSSION

Our results consistently show the feasibility of isolating fixed and live tumor cells with a sensitivity close to one cancer cell per 10 ml of blood. We also demonstrate the feasibility of NGS analysis of single live cells enriched by ISET® with Ion Torrent Platform. Our data provide evidence that the analysis of three single cells enriched by ISET® is sufficient to reliably identify the mutated allele frequency in the target cell population.

## CONCLUSIONS

These technical improvements should help the study of circulating cancer cells at the early steps of tumor invasion.

# L'hétérogénéité tumorale : de la théorie à la routine clinique

---

**Jean-François Laes**

*R&D, OncoDNA SA., Gosselies, Belgique*

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le concept d'hétérogénéité inter et intra-tumorale est un phénomène bien connu qui, avec l'explosion de la médecine personnalisée, l'arrivée des traitements ciblés, l'apparition de mécanismes de résistances et les difficultés éthiques / pratiques des re-biopsies en série, est devenu un défi à résoudre rapidement. Comment intégrer cette biopsie liquide dans la routine de l'oncologue et les « guidelines » officiels ?

## MÉTHODE

Afin de répondre à ces questions et valider une approche intégrée de la biopsie solide (FFPE) et liquide (sang), nous avons développé une solution OncoSTRAT&GO qui permet de (1) séquencer plus de 150 gènes, identifier 350 fusions et caractériser l'expression d'une dizaine de protéines à partir de la biopsie solide et (2) séquencer les mutations hotspot de 28 gènes à partir de la biopsie liquide.

## RÉSULTATS

À base line au stade métastatique, nous avons observé 85 % de corrélation entre les deux types de biopsies. Dans 7,5 % des cas, des mutations n'ont été observées que dans l'une des deux biopsies. Nous avons par la suite sélectionné certaines de ces mutations pour lesquelles nous avons développé un panel personnalisé pour le patient afin de suivre l'évolution de la tumeur *via* le sang. Nous avons observé une corrélation de 99 % entre la présence ou non de ces mutations dans le sang et les paramètres cliniques. Pour certains patients, nous avons pu mettre en évidence la réapparition de mutations soit (1) en contradiction avec les résultats d'imagerie non-supervisée mais qui en supervisée ont montré la résistance d'une sous-population, soit (2) non liées à une récurrence de la maladie, et qui disparaissaient par la suite.

## DISCUSSION / CONCLUSION

Nos résultats montrent l'utilité de la biopsie liquide afin de mieux caractériser l'hétérogénéité tumorale au stade métastatique dans la pratique clinique. Cependant nos résultats démontrent aussi que la biopsie solide garde son importance et qu'il est sans doute prématuré de ne plus l'utiliser. Au niveau du suivi de l'évolution de la réponse tumorale, bien que nous ayons des évidences de son utilité, de nombreuses questions se posent au niveau de la temporalité du suivi ainsi que de l'interprétation des résultats. En effet, à partir de quel pourcentage de présence et de degré d'évolution de ces pourcentages, est-il judicieux de changer de thérapie ? Quelle combinaison de traitements appliquer dans le cas de présence de marqueurs multiples dont on ne connaît pas l'origine ? Faut-il continuer le suivi longitudinal de première ligne, deuxième ligne, troisième ligne et ainsi de suite ou appliquer des nouvelles stratégies cycliques en fonction des mutations identifiées ?

# A bioinformatic approach to analyse ANGPT2 gene expression in colorectal cancer patients

---

Marine Jary<sup>1</sup>, R. Hasanova<sup>2</sup>, Christophe Borg<sup>2</sup> & Jean-Paul Feugeas<sup>2</sup>

1. *Oncologie médicale, UMR 1098 / CHRU J Minjoz, Besançon, France*

2. *UMR 1098, Besançon, France*

## INTRODUCTION

Tumor microenvironment plays a major role in progression and treatment' responses. The prognostic of cancer patients is then closely linked to the stroma equilibrium. The role of Angiopoietin 2 in angiogenesis is described in many tumors, and a high plasmatic level is correlated to a poorer overall survival, notably in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. Recently, a consensus molecular subtyping classification has been adopted for CRC, defining 4 distinct entities (CMS), correlated to patients' survival data. The mesenchymal CMS4 reflects the poorer prognosis.

To date, high Angiopoietin 2 (ANGPT2) CRC patients are not well characterized, neither are the signaling pathways implied in their poorer survival. The aim of our study was then to determine the prognostic role of ANGPT2 genomic expression, to describe the ANGPT2 linked-pathways and genes, and to study the association between ANGPT2 and the different CMS.

## METHODS

Twenty-three data collections were provided by GEO, TCGA and Array Express databases. Localized and metastatic CRC microarray and RNAseq samples, and survival and clinical annotations, were implemented. These large public transcriptomic and clinical data were analyzed by R statistical software. Functional orientation of genomic signatures was realized by MCP-counter R package and Principal Composant Analysis.

## RESULTS

Discretization in ANGPT2 expression categorized patients with high and low values, and their phenotypic characterization was described with clinical and molecular features (MMRd, MMRp, KRAS mutation, BRAF mutation, etc...). The two groups were comparable. Recidive Free Survival (RFS) was assessed in 705 localized CRC patients. According to ANGPT2 expression, the median RFS was significantly better in patients with low expression than in patients with high ANGPT2 expression ( $p= 0.0382$ ). We next assessed the pathways and the CMS correlated to ANGPT2, showing that ANGPT2 was not only over-expressed in the angiogenic CMS4 subgroup. Gene signatures could then be developed to further synthesize each CMS. Gene of interest are summarized in the heatmap.

## CONCLUSION

High transcriptomic expression levels of ANGPT2 is related to poor prognosis in CRC patients, validating the published plasmatic data. This expression is not specific to one CMS subtype, and could be related to different cellular signatures, and not only the vessel signature. A better comprehension of high ANGPT2 associated genes is mandatory. Based on these analyses, simplified specific CMS signatures could then be developed to allow plasmatic simple assessment in routine practice.



VENDREDI 3 FÉVRIER 2017  
SESSION 4

## Dual impact of mTOR inhibition on antitumor T cell responses in metastatic renal cell carcinoma patients

---

Laura Mansi<sup>1</sup>, Laurent Beziaud<sup>2</sup>, Laura Boullerot<sup>3</sup>, Tristan Maurina<sup>1</sup>, Guillaume Mouillet<sup>1</sup>, Eric Tartour<sup>4</sup>, Christophe Borg<sup>1</sup>, Antoine Thiery-Vuillemin<sup>1</sup>, Yann Godet<sup>3</sup> & Olivier Adotévi<sup>1</sup>

1. *Oncologie Médicale, CHRU J Minjoz, Besançon, France*

2. *EPFL, Lausanne, Switzerland*

3. *EFS, Besançon, France*

4. *Oncologie Médicale, APHP, Paris, France*

Mammalian target of rapamycin (mTOR) plays an important role in the regulation of cell growth and metabolism and is also a key regulator of T cell activation and homeostasis. The rapalogs are mTOR inhibitors used as anticancer drugs to inhibit tumor growth while they are also prescribed in organ transplant patients to promote immune suppression.

Here we investigated the influence of rapalog treatment on antitumor T cell responses. A dynamic immunomonitoring study in 23 metastatic renal cell carcinoma patients showed that everolimus promoted high expansion of FoxP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> regulatory CD4 T cells (Tregs). We showed that everolimus-exposed Tregs highly express CTLA-4, ICOS, GITR and CD39 and exhibit high suppressive properties in a contact-dependent manner. Paradoxically, a concurrent activation of tumor-specific Th1 immunity was detected in mRCC patients treated by everolimus. In addition a high rate of circulating Eomes<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells was found in patients after a long-term mTOR inhibition. Search of a relationship between everolimus-mediated immune modulation and disease outcome revealed that patients could be classified into two immune groups showing distinct evolution. Patients presenting an early shift towards high anti-tumor Th1 response and a decrease of Tregs (Th1hi/Tregslo) showed a better survival as compared to the group presenting an early shift towards Th1lo/Tregshi group (PFS 13.2 versus 4.1 respectively P= 0.02).

Thus, we report for the first time a dual impact on host antitumor T cell immunity after everolimus treatment that differentially influences its efficacy. Our results highlight the interest to take into account the immunomodulatory effect of rapalogs in the management of cancer patients and also prompt everolimus association with immunotherapies such as Tregs or immune checkpoint blockade.

**Keywords:** mTOR, anti tumor immunity, modulation.

## Receptor tyrosine kinase identification/ quantification using LC/MSMS

---

Patrick Vitaux<sup>1</sup> & Yann Courbebaisse<sup>2</sup>

1. Bioreagent, Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France

2. ADME, Bertin Pharma, Orléans, France

### INTRODUCTION

Les solutions pour phénotyper les cellules humaines et mesurer de manière précise et sélective le nombre des récepteurs tyrosine kinases, sont particulièrement laborieuses et souffrent souvent de problèmes de spécificité des outils utilisés (anticorps), ou de validation des méthodes employées (méthodes relatives).

Pour les mêmes raisons, l'évaluation multiplexe d'un panel de différents récepteurs membranaires nécessite en réalité l'optimisation de la méthode pour chacun des récepteurs recherchés.

### OBJECTIFS

Proposer une solution de quantification multiplexée des cibles thérapeutiques afin d'affiner / optimiser, au travers des profils obtenus, le choix de la solution thérapeutique la plus adaptée pour chaque patient.

### MÉTHODE

MS2Plex est une technologie basée sur la spectrométrie de masse qui permet de quantifier en mode multiplexe les protéines membranaires sur la base de leurs peptides signatures. Cette technologie a été validée selon les critères stricts de validation bio-analytiques. Sur la base d'échantillons de tissus, les fractions membranaires cytoplasmiques sont préparées. Les protéines membranaires sont extraites et purifiées. Leurs peptides signatures sont obtenus par hydrolyse enzymatique et quantifiés par spectrométrie de masse à l'aide de standards internes déterminés *in silico*.

### RÉSULTATS

Présentation d'un cas de patient réfractaire au traitement de première intention, et qui après analyse va montrer l'absence du récepteur cible de la thérapie de première intention. Orientation vers une seconde stratégie sur la base du profil MS2plex obtenu qui verra la tumeur régresser démontrant l'intérêt de l'analyse.

### DISCUSSION

Comme toute nouvelle solution, MS2Plex apporte des informations jusqu'alors très difficile d'accès, mais présente également des limites. Certaines sont économiques ou structurelle (les équipements nécessaires et les compétences ne sont pas facilement accessibles) mais également technologiques. Le phénotypage précis de cellules dans un environnement tissulaire est actuellement restreint par la sélection des cellules cibles dans ces tissus. Par ailleurs, les modifications post-traductionnelles des récepteurs ne sont pas accessibles.

# Immunogenic cell death inducers trigger PD-L1 dependent adaptive immune resistance to cancer

---

Magalie Dosset<sup>1</sup>, Thaiz Rivera Vargas<sup>2</sup>, Anaïs Lagrange<sup>2</sup>, Romain Boidot<sup>2</sup>, Frédérique Végran<sup>2</sup>, Aurélie Roussey<sup>2</sup>, François Martin<sup>2</sup>, Bernhard Ryffel<sup>2</sup>, Christophe Borg<sup>1</sup>, Olivier Adotévi<sup>1</sup>, François Ghiringhelli<sup>2</sup> & Lionel Apetoh<sup>2</sup>

1. U1098 INSERM/EFS/UBFC, EFS-BFC, Besançon, France

2. U866 INSERM, Université BFC, Dijon, France

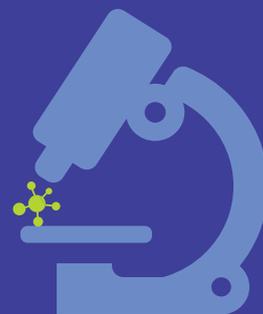
Chemotherapies remain the first-line therapy to treat advanced cancers. But even if some chemotherapies were recently described to have additional immunomodulatory effects beyond direct tumor cell killing, their antitumor efficacy is only transient and not curative.

The reasons accounting for tumor-resistance to immunogenic chemotherapies are still very elusive. In this study, we delineate a detailed cellular and molecular mechanism explaining why the antitumor effect of immunogenic chemotherapies is limited and provide a way to avoid this tumor-resistance to the treatment.

By studying the FOLFOX chemotherapy in different model of colorectal tumor-bearing mice, we found that its transient antitumor effect is accompanied with a strong tumor expression of the programmed cell death ligand-1 (PD-L1) and a massive infiltration of tumors by functional PD-1+ CD8 T lymphocytes. An extensive study with other drugs demonstrated that the induction of PD-L1 positively correlates with the ability of chemotherapy to drive immunogenic tumor cell-death and activate the immune system. Importantly, this tumor PD-L1 expression *in vivo* after chemotherapy was far superior to the one observed upon direct tumor cell exposure to the drug *in vitro*. We demonstrated that IFN- $\gamma$  secreted by CD8 T cells following immunogenic chemotherapy triggers a progressive induction of PD-L1 on tumor cells, which finally leads to the dysfunction of tumor-infiltrating PD1+ CD8 T cells and compromises their ability to eradicate tumors. Prevention of CD8 T cell exhaustion by disruption of PD1/PD-L1 signaling using anti-PD1 blocking antibodies in association with immunogenic (but not non-immunogenic) chemotherapies results in complete and long-lasting tumor cure.

These data define tumor PD-L1 expression as an adaptive immune resistance mechanism induced in response to immunogenic chemotherapy treatment. Recently, checkpoint inhibitor therapy raised great interest because of tremendous durable responses obtained in different cancers. However up to 60-80% of patients are refractory to this treatment, especially those suffering from colorectal cancers. In this regard, it provides a strong rationale to combine immunogenic chemotherapies with checkpoint inhibitors blockade agents like the recently FDA-approved anti-PD1 antibodies in order to improve the clinical benefit and survival for different cancers.

**Keywords:** immunogenic tumor cell death, chemotherapy, immune checkpoint, adaptative immunity.



VENDREDI 3 FÉVRIER 2017  
SESSION 5

## Schéma métronomique : nouvelle stratégie de prise en charge de l'hétérogénéité intratumorale pour contrôler la résistance au traitement

---

Maryna Bondarenko<sup>1</sup>, Manon Carré<sup>1</sup>, Marie-Pierre Montero<sup>1</sup>, Laurence Borge<sup>2</sup>, Diane Braguer<sup>1</sup>, Alice Carrier<sup>2</sup>, Sophie Vasseur<sup>2</sup> & Nicolas André<sup>3</sup>

1. CRO2 Inserm UMR911, Marseille, France

2. CRCM Inserm U1068, Marseill, France

3. APHM Hôpital Timone, Marseille, France

De nos jours encore, la résistance des cancers aux traitements n'est prise en compte que lorsqu'elle se produit, et reste un véritable défi pour les patients et les oncologues. L'hétérogénéité intratumorale – i.e. la diversité des clones cellulaires au sein d'une même masse tumorale – existe dès le diagnostic et se révèle être un mécanisme central dans la résistance thérapeutique. Décortiquer les relations entre cellules cancéreuses résistantes et sensibles, et caractériser l'impact de l'hétérogénéité intratumorale sur la réponse au traitement, est devenu essentiel pour améliorer notre compréhension de la biologie des tumeurs et proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

Nous avons développé des systèmes de co-cultures 2D et 3D permettant de suivre l'évolution des cellules d'adénocarcinome pulmonaire sensibles et résistantes à divers agents de chimiothérapie sur le long terme. Grâce à la détection quotidienne de fluorochromes de chaque sous-population, nous avons montré qu'en l'absence de traitement une partie des cellules forment une population dominante et exercent un effet répresseur sur la croissance des cellules co-cultivées. L'utilisation des systèmes Transwell® et de surnageants conditionnés a révélé que cet effet inhibiteur ne requérait pas de contact direct cellule-cellule. Par ailleurs, l'implication des vésicules extracellulaires a été exclue dans la communication entre clones tumoraux. Grâce aux technologies YSI et SeaHorse, nous avons montré que les cellules résistantes se caractérisent par une utilisation majoritaire de la phosphorylation oxydative, alors que les cellules sensibles privilégient la voie métabolique glycolytique. La mesure de l'impédance en temps réel et les tests de cytotoxicité ont révélé l'effet protecteur de l'inhibiteur de lactate déshydrogénase A (FX11) sur la prolifération des cellules résistantes. L'extinction de l'enzyme par ARN interférence a confirmé l'implication du lactate comme élément de communication entre ces populations cancéreuses pulmonaires.

De plus, dans nos modèles de co-cultures nous avons montré qu'un traitement réduisant drastiquement le nombre de cellules sensibles (dose cytotoxique, une fois par semaine) conduit irrémédiablement à la sélection de clones tumoraux résistants. A l'inverse, le schéma de traitement métronomique – i.e. administration fréquente et prolongée de faibles doses de médicaments – réduit l'expansion des cellules sensibles tout en prévenant de l'émergence des sous-populations résistantes. Ainsi, la chimiothérapie métronomique pourrait être une solution de choix pour moduler finement l'hétérogénéité intratumorale et contrôler la résistance au traitement sur le long terme. Une approche par modélisation mathématique en cours permettra de définir un schéma de traitement optimal pour maîtriser au mieux le volume tumoral global et l'équilibre entre clones intratumoraux.

**Mots clés :** cancer du poumon, hétérogénéité intratumorale, résistance au traitement, schéma métronomique, lactate.

## Characterisation of autophagic events during EMT of cancer cells

---

**Marine Jacquet, Eric Hervouet, Annick Fraichard, Michael Boyer-Guittat & Gilles Despouy**  
*UMR1098, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France*

Autophagy is a self eating process controlled by ATG protein (AuTophagy related protein) during stress condition (hypoxia, starvation, DNA damaged...) that permits homeostasis maintains. During autophagy a double membrane vesicle called autophagosome is formed and its fusion with lysosome allows component recycling. Autophagy was considered for long time to be a random component degradation, but recently it has been described as a selective mechanism of long lived protein or damaged organelle degradation which imply ATG8 proteins (GABARAP and LC3). mTOR (mammalian target of rapamycin) protein plays an important role in signal integration during early step of autophagy. Autophagy regulation during cancer progression seems to be important, but its role is misunderstood. Autophagy protects cell to tumor transformation but also permits cancer cell survival during stress condition (condition find in tumor environment).

Some inducer of autophagy process (hypoxia, nutrient starvation) also induce Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). EMT is associated to cancer, it mainly permits tissue invasion, metastasis formation and treatment resistance characterizing cancer aggressiveness. Moreover, mTOR inhibition lead to EMT process. This is why EMT and autophagy seems to be closely linked. EMT is a reversible mechanism that can be a good target for therapeutic treatment. However today there is not EMT specific treatment available this is why is seems to be necessary to elucidate this mechanism and its link with autophagy.

As describe below, autophagy role during EMT is controversial so the aim of the study is to determine the role of autophagy and particularly the ATG8 proteins roles during EMT.

For this experiment, we performed knock out of GABARAPL1 (GL1) gene in A549 (Human Lung carcinoma cells) by CRISPR/CAS9 technology and used GL1 knock down model (MDA-MB-436 shGL1, breast cancer cell) and GL1 overexpression models (MCF-7 GL1, breast cancer cells)

Firstly, we have validated our A549 EMT model by the study of an epithelial marker (E-Cadherin) which decrease, a mesenchymal marker (Vimentin) and an EMT transcription factor (TWIST) which both increase during EMT by RTqPCR and WB during TGF $\beta$ /TNF $\alpha$  treatment. Next, we have studied the impact of the EMT inducer on the autophagic flux by Western blot. We showed that TGF $\beta$ /TNF $\alpha$  induction caused autophagic flux oscillations. The modification of autophagic flux correlates with TWIST protein levels. Our hypothesis is that TGF $\beta$ /TNF $\alpha$  induced autophagy and TWIST is degraded by autophagy. Finally, we have examined the implication of GL1 in TWIST degradation in MDA-MB-436 shGL1 and MCF-7 GL1 cells. The restoration of TWIST expression in MDA-MB-436 shGL1 cells and the decrease of TWIST in MCF-7 GL1 cells suggest that TWIST may be degraded by selective autophagy *via* GL1 which may increase the mesenchymal phenotype by the restauration of TWIST expression. This result will be confirm in our EMT models A549 KO GL1.

The link between EMT and autophagy may give us fundamental knowledge on different molecular EMT and autophagy associated pathway, may lead to the identification of new therapeutic target which can be modulated by autophagy inhibitory and fight against cancer cell agressivity.

**Keywords:** cancer EMT Autophagy ATG8.

## Targeting autophagy inhibits tumor growth by enhancing NK-cell infiltration in a CCL5-dependent manner

---

**Bassam Janji**

*Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg City, Luxembourg*

It is now well established that the immunosuppressive tumor microenvironment prevents the recruitment of immune cells into the tumors, thereby constituting a barrier to achieve successful immune checkpoint blockade-based immunotherapy.

Therefore, enhancing the infiltration of immune cells to the tumor bed constitutes a major challenge and a cutting-edge issue in the field of tumor immunity. In this study, we investigated the impact of targeting autophagy on the infiltration of natural killer (NK) cells into melanoma tumors. We showed that, in addition to its effect in inhibiting tumor growth, targeting autophagy gene BECN1 increased the infiltration of functional NK cells into tumors.

This effect relied on the ability of autophagy-defective tumors to overexpress CCL5, since such infiltration and the associated tumor regression were abrogated by silencing CCL5. Similar to BECN1, Targeting ATG5, or inhibiting autophagy pharmacologically, also induced the expression of CCL5 in melanoma cells.

The overexpression of CCL5 was mechanistically related to an increase in c-Jun phosphorylation. Clinically, a positive correlation between CCL5 and NK cell marker NKp46 expression was found in melanoma patients and a high expression level of CCL5 was correlated with an improvement of melanoma patients' survival.

To our best knowledge, this is the first study highlighting the impact of targeting autophagy on the infiltration of NK cells into tumors and its benefit as a novel therapeutic approach to improve NK-based immunotherapy.

**Keywords:** *tumor microenvironment, natural killer, immune cell infiltration, CCL5.*

## Le récepteur matriciel syndécane-1 (SDC1) module la réponse œstrogénique des cellules de carcinome mammaire humain MCF-7

---

**Emmanuelle Fleurot, Vincent Hanoux, Pierre Jacques Bonnamy & Jérôme Levallet**  
*Laboratoire OeReCa, Unicaen, Caen, France*

Le Syndécane-1 (SDC1) est un protéoglycane à héparane sulfate transmembranaire ayant un rôle clé dans l'adhésion, le maintien de la morphologie cellulaire et l'intégrité tissulaire. De plus, grâce à ses interactions avec le microenvironnement cellulaire (co-récepteur des facteurs de croissance, partenaire des intégrines...), il contrôle des processus cellulaires tels que la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse. Paradoxalement même si le SDC1 est souvent considéré comme un garant du phénotype épithélial, il est surexprimé dans les carcinomes mammaires ER (-) les plus agressifs et chimiorésistants. Ces données suggèrent une interaction entre la signalisation œstrogénique et l'environnement matriciel au sein des tumeurs mammaires pouvant contrôler leurs croissances et l'acquisition de la résistance thérapeutique.

Nous avons ainsi recherché l'existence d'un dialogue entre la signalisation œstrogénique et l'expression du SDC1 ainsi que ses conséquences fonctionnelles sur les cellules de carcinome mammaire ER positif MCF-7.

Dans les cellules MCF-7, le 17 $\beta$ -estradiol inhibe de façon dose dépendante l'expression génique (à 24H) et protéique du SDC1. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPER) a permis d'identifier ER $\alpha$  comme le médiateur principal de cette répression. Ces résultats étant confirmés dans des cellules de la lignée MDA-MB-231 (ER $\alpha$ - et Er $\beta$ +) par l'absence d'effets du 17 $\beta$ -estradiol sur l'expression du SDC1. De plus, nous montrons que la perte d'ER $\alpha$  induite par le Fulvestrant (selective estrogen receptor down-regulator (SERD)) supprime la répression du SDC1 induite par les œstrogènes, mais également augmente l'expression génique et protéique du SDC1.

Parallèlement nous montrons que la baisse d'expression du SDC1 induite par l'œstradiol (ou reproduite par extinction du SDC1 par siRNA) potentialise la réponse mitogénique des cellules MCF-7 à l'œstradiol. Inversement, la surexpression sur SDC1 induit une résistance des MCF-7 à l'effet prolifératif de l'œstradiol. Il semble également que cette résistance ne soit pas la conséquence d'une perte d'expression d'ER $\alpha$  mais apparait associée à une modification de sa distribution subcellulaire susceptible d'affecter leurs fonctionnalités.

L'antagonisme fonctionnel entre la signalisation œstrogénique et celle liée au SDC1 semble donc moduler les effets mitogéniques des œstrogènes dans les tumeurs ER+ et pourrait expliquer la surexpression du SDC1 dans les carcinomes mammaires ER négatif. Ainsi, Le syndécane-1 pourrait constituer une cible potentielle pour de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des carcinomes mammaires agressifs et/ou résistants aux thérapies anti-hormonales.

**Mots clés :** *syndécane-1, carcinome mammaire, ER $\alpha$ , MCF-7.*

5<sup>E</sup> ÉDITION

CONGRÈS

# ONCOTRANS 2 & 3 FÉVRIER 2017



Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon



ÉVALUATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE :  
IMPLICATION POUR L'ONCOLOGIE MOLÉCULAIRE  
ET L'IMMUNOTHÉRAPIE DES CANCERS

## POSTERS

[www.oncotrans.fr](http://www.oncotrans.fr)



Ville de  
**Besançon**

CONGRÈS

# ONCOTRANS 2 & 3 FÉVRIER 2017

Maison de l'Économie, CCI du Doubs, Besançon

## SOMMAIRE

### MODÈLES PRONOSTIQUES ET MÉDECINE PERSONNALISÉE CANCERS DU SEIN ET DU CÔLON ..... P. 3

- **P. 4 :** Développement d'un test prédictif de l'efficacité des médicaments anti-cancéreux, *Dominique Bagnard (Strasbourg, France)*
- **P. 5 :** DiaDx, liquid biopsy for personalized medicine in oncology: new research use only services and diagnostic kits for companion diagnostics, *Safia El Messaoudi (Montpellier, France)*
- **P. 6 :** Évaluation de l'agressivité tumorale chez la femme de moins de 40 ans de l'ouest algérien, *Youcef Guedouar (Oran, Algérie)*

### TECHNOLOGIES ET ANALYSE DE LA MALADIE RÉSIDUELLE ET DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE ..... P. 7

- **P. 8 :** Apport de l'imagerie vibrationnelle en histopathologie, *Olivier Piot (Reims, France)*
- **P. 9 :** Cancer bronchique non à petites cellules mutées EGFR : où et quand apparaissent les mutations de résistance ? *Aurore Vozy (Paris, France)*
- **P. 10 :** Tumor heterogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma, *Jean-Luc Prétet (Besançon, France)*

### BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES ET TECHNOLOGIQUES POUR LE SUIVI IMMUNOLOGIQUE DES CANCERS ..... P. 11

- **P. 12 :** Caractérisation des cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de cancer du poumon, *Émilie Picard (Besançon, France)*
- **P. 13 :** Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4 Th1 responses against telomerase in cancer patients, *Caroline Laheurte (Besançon, France)*

### MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL ..... P. 14

- **P. 15 :** Canal SK3 et cancer du sein, *Julie Delvallée (Tours, France)*
- **P. 16 :** Les profils hémodynamiques impactent l'arrêt et l'extravasation des cellules tumorales circulantes, *Gautier Follain (Strasbourg, France)*
- **P. 17 :** PD-L1 dans les mésothéliomes malins péritonéaux épithéloïdes : expression et valeur pronostique sur une série multicentrique du réseau RENAPE, *Prudence Colpart (Besançon, France)*
- **P. 18 :** The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class II presentation of tumor-derived endogenous peptide, *Leïla Fonderflick (Besançon, France)*

- **P. 19 :** Type I collagen aging facilitate breast cell growth in a 3D matrix model, through a differential activation of DDR1, *Charles Saby (Reims, France)*

- **P. 20 :** Understanding the anti-tumor immune modulation mediated by chemoradiation to improve immunotherapy efficacy, *Élodie Lauret Marie Joseph (Besançon, France)*

### PHARMACOLOGIE DES AGENTS ANTI-CANCÉREUX ..... P. 21

- **P. 22 :** Pharmacocinétique des thérapies ciblées dans le cancer du rein métastatique chez le patient insuffisant rénal chronique hémodialysé, *Ulrich Stein (Besançon, France)*

### AUTRES CATÉGORIES ..... P. 23

- **P. 24 :** Cancer du sein chez un sujet très jeune, *Hafid Remouche (Mostaganem, Algérie)*
- **P. 25 :** Circulating exosomes: how to improve early cancer diagnosis, *Marine Cordonnier (Dijon, France)*
- **P. 26 :** Effet anti-tumoral de la combinaison de chimiothérapies (FOX) et d'un donneur de monoxyde d'azote (GTN), *Lucile Dondaine (Dijon, France)*
- **P. 27 :** Heparan sulfate proteoglycans promote telomerase internalization and MHC cClass II presentation on dendritic cells, *Jeanne Galaine (Besançon, France)*
- **P. 28 :** identification de la période de « normalisation » vasculaire induite par le bevacizumab, *in vivo*, à l'aide d'un algorithme de traitement d'images, *Karima El Alaoui Lasmali (Nancy, France)*
- **P. 29 :** Identification of tumor-associated immunogenic neoepitopes induced after treatment with Alkylating agent, *Sindy Vrecko (Besançon, France)*
- **P. 30 :** Modulation d'un biomarqueur de chimiorésistance au docétaxel, la clusterine, par le GTN (glyceryl trinitrate), un donneur de monoxyde d'azote (NO), dans des cellules cancéreuses prostatiques, *Sarra Bouaouiche (Dijon, France)*
- **P. 31 :** Novel syngeneic PD-L1 positive sarcoma like tumor for preclinical evaluation of antitumor immunotherapies in HLA-A\*0201/DRB1\*0101 transgenic mice, *Laurie Rangan (Besançon, France)*
- **P. 32 :** Plateforme préclinique de radiothérapie 3D guidée par l'image, *Céline Mirjolet (Dijon, France)*
- **P. 33 :** Tumor antigen SALL4 hosts T cell epitopes that are recognized by pre-existing naïve and memory T cells in both healthy donors and cancer patients, *Laurie Spehner (Besançon, France)*



MODÈLES PRONOSTIQUES  
ET MÉDECINE PERSONNALISÉE  
CANCERS DU SEIN ET DU CÔLON

## Développement d'un test prédictif de l'efficacité des médicaments anti-cancéreux

---

**Dominique Bagnard<sup>1</sup>, Justine Fritz<sup>2</sup>, Aurore Fernandez<sup>2</sup> & Laurent Jacob<sup>2</sup>**

**1. INSERM U1109, Université de Strasbourg, Illkirch, France**

**2. Université de Strasbourg, Illkirch, France**

La montée en puissance des thérapies ciblées du cancer révolutionne la prise en charge des patients atteints par un cancer. Qu'il s'agisse d'anticorps anti ligands (anti-VEGF comme Avastin) ou d'anti récepteurs (anti-HER2 comme Herceptin) les résultats obtenus sont très encourageants. Cependant, ces approches se heurtent à une caractéristique majeure des cancers : l'hétérogénéité tumorale. En effet, les tumeurs sont de vastes écosystèmes cellulaires composés d'une grande variété de cellules normales ou tumorales, de cellules immunitaires ou vasculaires. Cette complexité se traduit par des différences marquées d'un patient à l'autre pour un même type histologique de tumeur avec pour conséquence des réponses variables aux thérapies ciblées. L'enjeu actuel est donc de développer des tests de diagnostic moléculaires pouvant guider le choix d'une thérapie adaptée à chaque patient. Ces approches de médecine personnalisée sont essentiellement menées par des méthodes de profilage génétique des tumeurs à grande échelle et la recherche de mutations pouvant expliquer l'absence de réponse à un médicament. Nous avons développé au laboratoire un test prédictif de l'efficacité des médicaments anti-cancéreux basé sur l'analyse par RT-QPCR de l'expression d'une série limitée de gènes (24) permettant la hiérarchisation des voies pro-tumorales dans les tumeurs grâce à une méthode de normalisation des résultats. Nous avons obtenu les signatures pour 25 tumeurs colorectales (10 adénocarcinomes, 15 PDX).

Certains gènes inclus dans la signature sont des cibles thérapeutiques déjà validées pour lesquelles des médicaments sont disponibles. Nous avons alors recherché dans deux modèles de xéno greffes de tumeurs du côlon (réalisés de manière indépendante par la société Oncodesign) la valeur prédictive des scores calculés pour l'efficacité des médicaments correspondants. Les résultats obtenus montrent que le test permet de hiérarchiser les voies protumorales.

De plus, l'inhibition des voies présentant les scores les plus élevés permet l'inhibition tumorale la plus importante. De manière intéressante, il a été possible d'établir avec la cohorte de PDX une corrélation entre le taux de réponse à Cetuximab et le score calculé pour EGFR. L'ensemble de ces données précliniques montre que la méthode de normalisation mise au point permet de hiérarchiser les voies protumorales et que le classement de ces voies reflète l'efficacité thérapeutique. L'extension de l'approche dans des études rétrospectives à plus grande échelle permettra de conforter l'intérêt de ce nouveau test facilement applicable en routine clinique.

# DiaDx, liquid biopsy for personalized medicine in oncology: new research use only services and diagnostic kits for companion diagnostics

---

Safia El Messaoudi<sup>1</sup> & Alain Thierry<sup>2</sup>

1. DiaDx, Montpellier, France

2. INSERM U1194, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Montpellier, France

## BACKGROUND

Spatial and temporal clonal tumor heterogeneity limits accuracy of mutations identification when tumor molecular characterization is conventionally performed from tumor tissue (TT) specimen or biopsy.

## ACTIVITIES

By using its proprietary IntPlex® technology, DiaDx offers RUO services and assays for a pro-active diagnosis with a simple blood sample allowing whole and real-time molecular tumor characterization. IntPlex® provides unique multiparametric analysis of circulating DNA with unprecedented sensitivity level for mutation detection < 0.005% (KRAS, NRAS, EGFR, PIK3CA...). Clinical validation through peer-reviewed publications in metastatic colorectal cancer: IntPlex® could replace TT analysis. A global concordance rate of 96% for KRAS exon 2 and BRAF V600E mutations between both approaches was found in a blinded study (n=106 patients). A retrospective blinded clinical study (n=48) showed that IntPlex® allowed tracking acquired resistance conferring mutations in the course of treatment enabling prediction of relapse earlier than CT-Scan. Mutant allele frequencies < 0.01% were found responsible for acquired resistance highlighting the crucial need of high sensitive method such as IntPlex® as compared to other technical such as NGS. Recently, a real-time, blinded, multicenter and prospective clinical study (n=140) revealed clinical utility of IntPlex® under standard management care: the data turnaround time was 2 days while being 16 days for TT analysis; 25% of samples scored WT by TT analysis were found mutant by IntPlex® illustrating the fact that tumor-tissue analysis cannot provide a global spatial and temporal snapshot of the tumor as can do IntPlex®. In addition, mutant status as determined by IntPlex® was better correlated with clinical outcomes than TT analysis.

## CONCLUSION

Ultrasensitive IntPlex® technology provides optimal mutation profile and offers to physicians a best-in-class assay.

*Keywords: liquid biopsy, circulating DNA, personalized cancer medicine, clonal tumor heterogeneity, high sensitivity.*

## Évaluation de l'agressivité tumorale chez la femme de moins de 40 ans de l'ouest algérien

---

**Youcef Guedouar & Zohra Bekkouche**

*Département de biologie, Université Ahmed Ben Bella, Oran, Algérie*

En Algérie, le cancer du sein est actuellement la tumeur maligne la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer chez la femme. C'est une maladie complexe et hétérogène. Cette hétérogénéité se retrouve au niveau histologique, phénotypique et moléculaire. Il demeure une maladie mal connue, et les classifications cliniques et histologiques actuelles ne permettent pas de prédire totalement les paramètres pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements, ce qui est source de traitements inappropriés.

L'étude, réalisée de janvier 2014 à mars 2016, intéresse 382 patientes porteuses d'un carcinome infiltrant. L'âge s'étend de 20 à 89 ans (moyenne : 46 ans). Le carcinome canalaire infiltrant CCI prédomine (78,49 %) et le carcinome lobulaire infiltrant CLI (21,50 %). Parmi les 382 patientes, 90 sont des jeunes femmes de moins 40 ans soit 30,41 %, (âge moyen : 37 ans) avec 79,45 % pour le CCI et 20,54 % pour CLI.

L'objectif de notre étude est d'effectuer une analyse des caractéristiques clinique, histopathologique chez la jeune femme de moins de 40 ans en précisant leur proportion relative et leurs caractéristiques biologiques comparées à l'ensemble des cas tout âge confondu.

La détermination de l'expression l'antigène Ki67, les récepteurs hormonaux nucléaires RE, RP et l'oncoprotéine HER2 au niveau de la composante infiltrante est réalisée par la technique immunohistochimie IHC.

Caractéristiques des carcinomes chez les jeunes femmes de moins de 40 ans comparés à ceux de l'ensemble des patientes de notre série : taille tumorale pT3 : 24,63 % *versus* 18,68 % ; grade histopronostique SBR III : 78,37 % *versus* 72,01 % ; présence d'envahissement ganglionnaire pN+ : 75,75 % *versus* 70 % ; index mitotique élevé Ki67 : 78,57 % *versus* 72,01 % ; absence d'expression des récepteurs hormonaux : récepteurs estrogéniques RE- 71,62 % *versus* 64,92 %, récepteurs de progestérones RP- 81,08 % *versus* 78,15 % ; expression de l'oncoprotéine HER2 48,65 % *versus* 46,49 %.

L'analyse des résultats montre que les tumeurs chez les jeunes femmes sont agressives et de mauvais pronostic : tumeurs de grande taille et de grade histopronostique élevé avec une importante activité mitotique et un envahissement ganglionnaire dominant.

**Mots clés :** cancer mammaire, jeunes femmes, ouest algérien, carcinomes infiltrants, immunohistochimie.



TECHNOLOGIES ET ANALYSE  
DE LA MALADIE RÉSIDUELLE  
ET DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE

## Apport de l'imagerie vibrationnelle en histopathologie

---

**Olivier Piot**

*Biophotonique et Technologies pour la Santé, UMR 7369 MEDyC, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France*

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle (diffusion Raman et absorption infrarouge) permettent d'apporter des informations complémentaires à l'histologie conventionnelle, en exploitant la nature moléculaire des données spectrales. Ces techniques reposent sur une interaction non destructive de la lumière avec le tissu biologique ; et en sondant les liaisons chimiques des molécules, elles donnent accès, de manière simultanée, à la composition en lipides, en protéines, en acides nucléiques ou encore en carbohydrates. De plus, il est possible d'obtenir in situ certaines informations d'ordre structural, telles que la structure secondaire des protéines, en préservant l'intégrité de l'échantillon. L'analyse d'une coupe tissulaire va générer une image hyperspectrale dont l'exploitation nécessite le recours à des méthodes de traitement statistique multivarié. Ce traitement comporte deux phases : d'abord la construction de librairies de marqueurs spectroscopiques par confrontation des données vibrationnelles avec une vérité-terrain, puis l'implémentation de modèles de prédiction permettant une identification et classification automatique d'un échantillon de diagnostic inconnu. Cette approche, qualifiée d'histopathologie spectrale, permet une détection automatique, objective et sans marquage, des structures tissulaires. Cette méthodologie permet non seulement de retrouver la morphologie du tissu mais également d'accéder à des informations complémentaires à l'histologie conventionnelle. Nos expérimentations menées sur des échantillons lésionnels de côlon ou de peau ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité tumorale, sur la base de l'identification de signatures spectrales spécifiques des constituants tissulaires. Cette approche d'histopathologie spectrale offre une nouvelle façon de caractériser l'organisation tissulaire avec une visualisation des images tissulaires au moyen de codes couleurs. Cette reconstruction d'images pseudo-couleurs permet également d'accéder automatiquement à des données quantifiées sur la répartition de différentes structures identifiées au sein d'un tissu. L'exploitation des données vibrationnelles aboutit à des informations diagnostiques avec une détection automatique des composantes tumorales, cellulaires et stromales. De façon plus exploratoire, la comparaison de mélanomes cutanés de différents degrés d'agressivité semble indiquer une relation entre l'hétérogénéité spectrale révélée par imagerie vibrationnelle, et l'agressivité tumorale.

Les travaux que nous avons menés ont démontré le potentiel de l'imagerie vibrationnelle pour établir de nouvelles générations de biomarqueurs spectroscopiques, à visée diagnostique voire pronostique. Contrairement aux marqueurs usuellement considérés qui ciblent une ou quelques molécules d'intérêt, les marqueurs spectroscopiques présentent l'avantage de sonder la composition moléculaire globale de l'échantillon.

*Mots clés : histopathologie spectrale, marqueurs spectroscopiques.*

## Cancer bronchique non à petites cellules mutées EGFR : où et quand apparaissent les mutations de résistance ?

---

**Aurore Vozy**

*Pneumologie, Tenon, Paris, France*

Dès le diagnostic de cancer bronchique non à petites cellules, la recherche d'addiction oncogénique est systématique dont la mutation du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) ou le ré-arrangement Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) avec un impact thérapeutique en première ligne.

La mutation de l'EGFR est la plus fréquente avec 20 % des patients concernés et peut entraîner une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti EGFR (ITK) (délétion de l'exon 19 ou la mutation L858R de l'exon 21) ou une résistance (mutation T790M de l'exon 20 primaire ou secondaire).

L'avènement des ITK anti EGFR a nettement amélioré le pronostic des patients porteurs d'un cancer bronchique muté EGFR mais des mutations surviennent en cours de traitement. Le profil moléculaire évolue par 2 mécanismes principaux : sélection de clone résistant pré existant non détecté à la biopsie initiale ou apparition de mutation de résistance de la voie ciblée ou d'une autre voie sous traitement. La difficulté de prise en charge de ces patients repose sur la détection de l'apparition de ces résistances qui pose le problème de l'hétérogénéité tumorale. Faut-il rebiopsier à chaque progression et quoi, la tumeur initial, la lésion métastatique ou encore faire une recherche d'ADN circulant (ADNc) ?

Pour illustrer ce problème, voici le cas d'une patiente de 60 ans non fumeuse ayant présenté un adénocarcinome pulmonaire métastatique d'emblée (hépatique et osseux), ne présentant pas d'addiction oncogénique (EGFR, KRAS, BRAF, Her2, PI3K) au diagnostic et traité par un doublet cisplatine-pemetrexed puis maintenance par pemetrexed. À un an et 2 mois, la patiente progresse sur le plan pulmonaire et débute une deuxième ligne par erlotinib avec une bonne réponse initiale des 2 mois. À 10 mois, la patiente progresse sur le plan pulmonaire et est rebiopsiée sous fibroscopie avec une immuno histochimie (IHC) ROS négative et cMET positive (pas assez de matériel pour confirmation FISH). Une ponction trans-thoracique retrouve une FISH cMET négative, délétion exon 19 EGFR sans mutation T790M. Une troisième ligne par carboplatine-taxol débute. La mutation T790M est détectée dans l'épanchement pleural apparu à progression après 3 cycles et une quatrième ligne débute par osimertinib. L'osimertinib a permis une réponse partielle à 2 mois puis une progression à 8 mois. L'ADNc retrouve la délétion EGFR et la mutation T790M mais la rebiopsie retrouve la délétion de l'EGFR sans la mutation T790M avec une amplification de MET. Une cinquième ligne par crizotinib débute. La progression apparaît à 5 mois et l'ADNc retrouve la délétion EGFR et la mutation T790M. Une sixième ligne débute en rajoutant l'osimertinib au crizotinib. 2mois plus tard la patiente a pris de façon intermittente le crizotinib pour mauvaise tolérance et présente une réponse partielle avec un ADNc positif pour la délétion EGFR et la mutation T790M. L'osimertinib est poursuivi en monothérapie.

Ce cas illustre parfaitement l'hétérogénéité tumorale, la nécessité de re biopsier les patients à progression tant sur la lésion primitive que sur les lésions secondaires faciles d'accès et l'ADNc et surtout de toujours refaire une biologie moléculaire complète afin de détecter une nouvelle addiction oncogénique driver afin d'adapter au mieux le traitement.

**Mots clés :** CBNPC, mutation EGFR, T790M, mutations de résistance, ADN circulant sanguin et pleural.

## Tumor heterogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma

---

Jean-Luc Prétet<sup>1</sup>, Charlée Nardin<sup>1</sup>, Eve Puzenat<sup>1</sup>, David Guenat<sup>1</sup>, Marie-Paule Algros<sup>2</sup>,  
Christiane Mougin<sup>1</sup> & François Aubin<sup>1</sup>

1. *Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France*

2. *CHRU Besançon, France*

Since the detection of BRAF V600 mutations has a direct impact in treatment decision, the precise screening for BRAF mutations in patients with advanced or metastatic melanoma is mandatory. However, conflicting results have been obtained concerning heterogeneity of BRAF mutation status in patients with metastatic melanoma. The intra-patient heterogeneity of BRAF V600 mutation status was investigated in primary tumors and different metastases of melanoma patients.

Paired samples of lymph node, visceral, subcutaneous metastases or primary melanoma from 45 metastatic melanoma patients were tested for BRAF mutation using pyrosequencing and Sanger sequencing.

Overall, 114 paired samples from 45 patients were analyzed. A BRAF mutation was observed in 44% of samples and a global homogeneity was found between the BRAF genotype of the first tumor sample tested and the second sample within a patient (91%). Agreement rate analysis according to the Cohen's Kappa coefficient was excellent ( $k=0.81$ ;  $p<0.001$ ). Only nine percent of patients (4/45) demonstrated discordant results. For these cases, all sentinel lymph nodes exhibited a wild type genotype while other tumoral samples were mutated.

In conclusion, our results show that tumor heterogeneity for BRAF status is not frequent in melanoma. We nevertheless point out that repeated BRAF genotyping may be useful when sentinel lymph node is negative to identify all carriers of melanoma with BRAF mutation (Nardin et al., *Melanoma Res*, 2015).

**Keywords:** *melanoma, BRAF, genotyping.*



BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES  
ET TECHNOLOGIQUES POUR LE SUIVI  
IMMUNOLOGIQUE DES CANCERS

## Caractérisation des cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de cancer du poumon

---

Émilie Picard<sup>1</sup>, C. Laheurte Ait-Ali<sup>1</sup>, E. Lauret<sup>1</sup>, B. Gaugler<sup>1</sup>, V. Westeel<sup>1,2</sup>, P. Jacoulet<sup>2</sup>, Y. Godet<sup>1</sup>, C. Borg<sup>1,2</sup>, A. Caignard<sup>3</sup> & O. Adotevi<sup>1,2</sup>

1. INSERM 1098, Université de Franche-Comté, Besançon, France

2. Département d'Oncologie Médicale, Université Hôpital de Besançon, France

3. INSERM 1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Les cellules NK sont des cellules à cytotoxicité naturelle qui exercent leur activité cytotoxique sans reconnaissance préalable d'un antigène. Leur capacité à lyser les cellules tumorales est notamment gouvernée par leurs récepteurs activateurs de type NCR (NKp30, NKp44, NKp46) ou NKG2D. L'implication des NK dans l'immunosurveillance des cancers est bien connue. Cependant la nature et le rôle des sous-populations de cellules NK circulantes dans le cancer du poumon est peu décrit. Dans cette étude nous avons analysé chez des patients souffrant de cancers bronchiques, 3 différentes sous-populations de cellules NK circulantes telles que les NKdim (CD56+ CD16+) qui ont une forte activité cytotoxique, les NKbright (CD56bright CD16-) qui ont une activité plutôt régulatrice et les NKint (CD56+ CD16-). L'analyse a porté sur 177 patients et 41 donneurs sains comme contrôle. Les résultats montrent que les patients présentent un pourcentage de cellules NKdim plus faible que les donneurs sains (75 % versus 82 % p=0.0129). Inversement, il y a un taux plus élevé de cellules NKint chez les patients que chez les donneurs sains (19 % versus 10 % p=0.019). Aucune différence n'est observée entre le pourcentage de cellules NKbright chez les patients et chez les donneurs sains. L'analyse des différentes sous-populations NKdim, NKbright et NKint exprimant les différents récepteurs activateurs a montré une diminution de ses sous-populations exprimant NKp30, NKp46 et NKG2D chez les patients comparés aux donneurs sains. Cette différence est particulièrement marquée sur les cellules NKint (64 % versus 73 % p=0,0256 et 15 % versus 22 % p=0.0127 respectivement). Nous n'avons observé aucune différence entre les taux des différentes sous-populations de cellules NK circulantes entre les patients de stades localisés VS métastatiques. En perspective, nous analyserons l'interaction entre ces différentes sous-populations NK et les réponses T anti-tumorales mesurées chez ces patients ainsi que leur impact sur la survie des patients.

**Mots clés :** cellules NK, cancer du poumon, NKp30, NKp46, NKG2D8.

## Immunoprevalence and magnitude of HLA-DP4 versus HLA-DR-restricted spontaneous CD4 Th1 responses against telomerase in cancer patients

---

Caroline Laheurte<sup>1</sup>, Jeanne Galaine<sup>1</sup>, Magalie Dosset<sup>2</sup>, François Aubin<sup>3</sup>, Virginie Westeel<sup>4</sup>, Christophe Borg<sup>5</sup>, Éric Tartour<sup>6</sup>, Yann Godet<sup>2</sup>, Maillere Bernard<sup>7</sup> & Olivier Adotevi<sup>8</sup>

1. UMR1098, établissement Français du Sang, Besançon, France
2. UMR1098, Université de Bourgogne Franche Comté, Besançon, France
3. Dermatologie, CHRU Besançon, Besançon, France
4. Pneumologie, CHRU Besançon, Besançon, France
5. Oncologie, CHRU Besançon, Besançon, France
6. UMR970, HEGP, Paris, France
7. Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, CEA, Gif-sur-Yvette, France
8. UMR1098, Université Bourgogne Franche Comté, Besançon, France

Cumulative evidence supports that CD4 Th1 cells play a key role in antitumor immunity. We previously reported the presence of spontaneous HLA-DR-restricted CD4 Th1 responses against telomerase reverse transcriptase (TERT) in various cancers by using promiscuous HLA-DR epitopes. Here, we described novel highly immunogenic HLA-DP4-binding epitopes from TERT named TERT541-555, TERT573-587, TERT613-627 and TERT911-925 and addressed the question about the immunoprevalence and magnitude of the naturally occurring antitumor CD4 T cell responses restricted by HLA-DP4 or HLA-DR, the two most common HLA class II.

Direct comparative study of spontaneous anti-TERT CD4 T cell responses in a cohort of 87 lung cancer patients showed that HLA-DP4 and HLA-DR sustained specific Th1 responses in 10.1% and 25.2% of cancer patients respectively ( $P=0.01$ ). The magnitude of the HLA-DR-restricted responses was 2 to 3 times significantly higher than HLA-DP one ( $P=0.005$ ). Similar results were found in other cancers such as melanoma, breast cancer, renal cell carcinoma and colon cancer. Thus, our results describe for the first time in a large cohort of cancer patients a high immunoprevalence of HLA-DR-restricted spontaneous anti-TERT Th1 immunity compared to HLA-DP restriction. These results provide a new tool for comprehensive monitoring of antitumor CD4 Th1 response in various cancers.

**Keywords:** CD4 Th1 cells, HLA-DP4, HLA-DR, telomerase, immunomonitoring.



MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL

## Canal SK3 et cancer du sein

---

**Julie Delvallée**

Tours, France

### CONTEXTE

Le canal SK3 est un canal potassique activé par le calcium. Dans le cancer du sein, il est impliqué dans la migration des cellules cancéreuses *in vitro* et dans l'apparition de métastases osseuses chez l'animal.

### OBJECTIF

Rechercher un lien entre l'expression du canal SK3 au niveau des tumeurs mammaires et les caractéristiques anatomopathologiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Étude rétrospective sur une cohorte de patientes prises en charge pour une chimiothérapie adjuvante ou dans le cadre du traitement de métastases d'un cancer du sein dans le service de cancérologie du CHU de Tours de novembre 2012 à novembre 2014.

Les caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs ont été recueillies sur les pièces opératoires. Pour chaque tumeur, il a été réalisé trois prélèvements afin de réaliser un immuno-marquage SK3 par TMA (*Tissue Micro array*).

### RÉSULTATS

Cent trois 103 patientes ont été incluses. L'âge moyen était de 55,7 ans (31-88), les patientes étaient ménopausées dans 65 % des cas. Toutes les femmes ont bénéficié d'une chirurgie mammaire. Le type histologique canalaire était majoritaire (79,6 %) et un contingent *in situ* était retrouvé dans 72,8 % des cas (si présent, à 67 % de haut grade).

L'immuno-marquage a pu être lu que chez 88 patientes (85,4 %).

Le phénotype HER 2 était significativement associé à un marquage positif du canal SK3 ( $p=0,01$ ).

Il existe une différence de survie en faveur des patientes avec une tumeur exprimant SK3 ( $p=0,05$ ).

Il n'existe pas de différence significative concernant le polymorphisme de l'allèle SK3 pour toutes les données étudiées.

### CONCLUSION

Il existe un lien entre le marquage positif du canal SK3 et le phénotype HER 2 des tumeurs mammaires.

De plus, la survie est augmentée chez les patientes porteuses de tumeurs exprimant SK3.

*Mots clés : cancer du sein, immuno-marquage, phénotypes moléculaires.*

## Les profils hémodynamiques impactent l'arrêt et l'extravasation des cellules tumorales circulantes

---

Gautier Follain<sup>1</sup>, Naël Osmani<sup>1</sup>, Sébastien Harlepp<sup>2</sup> & Jacky Goetz<sup>1</sup>

1. MN3T, INSERM UMRS\_1109, Strasbourg, France

2. DON, IPCMS, Strasbourg, France

La progression tumorale débute par la formation d'une tumeur primaire d'où certaines cellules se détachent pour rejoindre la circulation sanguine. Celles qui survivent quittent la circulation lors du processus d'extravasation et peuvent former des métastases. Selon le concept séculaire du « seed and soil », seul le microenvironnement local d'un organe distant favorise la genèse d'un foyer métastatique. À l'inverse, l'hypothèse mécanique postule que l'architecture, et les contraintes physiques et hémodynamiques imposées par le système vasculaire régulent l'arrêt et l'extravasation des cellules tumorales, précédant la formation de métastases. Ainsi, une contribution microenvironnementale et mécanique pourrait expliquer l'efficacité de la croissance métastatique.

Dans notre laboratoire, nous développons des outils d'imagerie de pointe qui nous permettent de suivre les cellules métastatiques à hautes résolutions spatiale et temporelle tant chez la souris que chez le poisson zèbre (ZF). Mon projet de thèse vise à élucider l'impact du flux sanguin sur l'arrêt, l'adhésion et l'extravasation des cellules tumorales circulantes *in vivo* en combinant l'imagerie intravitale à haute vitesse avec des approches biophysiques permettant de mesurer les paramètres du débit sanguin. Dans ce but, je pratique des xénogreffes de cellules tumorales issues de cancer mammaire murin dans des embryons de poisson zèbre. Lors de l'injection de cellules tumorales dans la circulation des embryons, nos résultats montrent que l'arrêt des cellules tumorales se produit principalement dans des vaisseaux hémodynamiquement favorables dans la vasculature caudale. Pour aller plus loin, nous utilisons des approches pharmacologiques permettant de modifier l'activité cardiaque des embryons, changeant ainsi la vitesse et la pulsativité du flux sanguin dans l'ensemble de l'animal. Ces traitements modifient les sites d'arrêt et d'extravasation des cellules tumorales circulantes, des résultats confirmés *in vitro* par des approches de microfluidique.

De plus, grâce à des approches de microscopie corrélative permettant d'observer à haute résolution par microscopie électronique à transmission, des événements observés par microscopie optique, nous pouvons décrire très précisément les différentes étapes de l'extravasation. Ainsi, nous sommes en mesure de montrer que l'extravasation dépend également du flux sanguin par un mécanisme reposant sur la capacité de l'endothélium à migrer autour des cellules tumorales, induisant l'exclusion des cellules tumorales et donc, de manière passive, leur extravasation.

En conclusion, ces résultats démontrent que les profils hémodynamiques peuvent réguler des étapes importantes de la cascade métastatique.

**Mots clés :** *extravasation, hémodynamique, poisson zèbre.*

# PD-L1 dans les mésothéliomes malins péritonéaux épithélioïdes : expression et valeur pronostique sur une série multicentrique du réseau RENAPE

---

**Prudence Colpart**

*Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHRU Jean Minjot, Besançon, France*

## INTRODUCTION

Les mésothéliomes malins péritonéaux (MMP) sont des tumeurs rares et de mauvais pronostic. La classification OMS 2015 décrit trois types histologiques : épithélioïde (MMPE), sarcomatoïde et biphasique. Le MMPE est le plus fréquent. Une chirurgie de cytoréduction extensive (CC) associée à une chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) est proposée pour améliorer la survie. Le Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) est un biomarqueur théranostique récemment évalué dans plusieurs cancers. L'objectif de cette étude était d'étudier l'expression de PD-L1 et d'évaluer sa valeur pronostique dans les MMPE.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude immunohistochimique a été effectuée sur Tissu Micro-Array de 45 cas de MMPE provenant de la base clinico-biologique française RENAPE. Deux anticorps (Ac) anti-PD-L1 (clone E1L3N et SP142) ont été évalués. Pour chaque Ac, ont été étudiés, sur cellules mésothéliales et immunes, (1) la concordance inter-observateurs de l'immuno-marquage, (2) le taux d'expression de PD-L1 et (3) la concordance inter-immunomarquage des deux Ac. La valeur pronostique en terme de survie (OS, PFS), a été étudiée en analyses uni et multivariée sur 37 cas incluant: âge, sexe, index de carcinose péritonéale, traitement, type histologique, qualité de l'exérèse, intensité de la stroma réaction intra et péri-tumorale, marquage des cellules tumorales et immunes pour chaque Ac.

## RÉSULTATS

La concordance inter-observateurs de l'immuno-marquage par l'E1L3N est moyenne sur cellules mésothéliales et immunes ( $\kappa=0,57$  et  $0,55$ , respectivement). Pour le clone SP142, elle est médiocre sur cellules mésothéliales ( $\kappa=0,38$ ) et mauvaise ( $\kappa=0$ ) sur cellules immunes. Après relecture consensus, le taux d'expression de PD-L1 est de  $31,1\%$  ( $14/45$  cas) et  $15,6\%$  ( $7/45$ ) pour l'E1L3N et de  $22,2\%$  ( $10/45$  cas) et  $26,7\%$  ( $12/45$  cas) pour le SP142, sur cellules mésothéliales et immunes respectivement. La concordance inter-anticorps est moyenne sur cellules mésothéliales ( $\kappa=0,55$ ) et immunes ( $\kappa=0,54$ ). En analyse univariée, le traitement par CC+CHIP est associé à une meilleure PFS ( $p=0,03$ ), le sous-type solide à une moins bonne PFS et OS (respectivement  $p=0,03$  et  $p=0,01$ ) et l'expression de l'anticorps E1L3N par la réaction inflammatoire à une meilleure PFS et OS ( $p=0,03$  et  $p=0,02$  respectivement). En analyse multivariée, seul le sous-type solide est un facteur pronostique d'OS ( $p=0,02$ ).

## DISCUSSION

L'immunomarquage de l'E1L3N est membranaire. Celui du SP142 est cytoplasmique granuleux et/ou membranaire. Cette difficulté d'interprétation peut expliquer la mauvaise concordance inter-observateur. L'intensité de marquage est faible à modérée et le pourcentage de cellules positives très faible quelque soit l'Ac utilisé, incitant à préconiser des biopsies de taille suffisante pour éviter les faux-négatifs. L'utilisation d'un TMA et le faible nombre de cellules positives par cas peut expliquer la concordance moyenne inter-anticorps.

## CONCLUSION

Le clone E1L3N donne un marquage membranaire et semble plus facile d'utilisation que le clone SP142. Une minorité de MMPE exprime le PD-L1 (entre un quart et un tiers des tumeurs) toujours avec un faible pourcentage de cellules marquées. L'expression de PD-L1 par les cellules mésothéliales ou les cellules immunes n'est pas un facteur pronostique indépendant en termes d'OS ou de PFS.

# The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class II presentation of tumor-derived endogenous peptide

---

Leïla Fonderflick<sup>1</sup>, Yann Godet<sup>1</sup>, Olivier Adotévi<sup>1</sup>, Michaël Boyer-Guittaut<sup>1</sup>,  
Pascale Adami<sup>1</sup> & Régis Delage-Mourroux<sup>2</sup>

1. *Equipe TIM-C, UMR INSERM 1098, EFS, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France*

2. *UMR INSERM 1098, UMR INSERM 1098, EFS, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France*

The word autophagy, derived from the Greek meaning 'self-eating', refers to a catabolic self-digestion process in which portions of cytosol or organelles are delivered to the lysosome. This mechanism is regulated by more than 40 ATG (AuTophagy-related) proteins. Among these factors, the ATG8 proteins have been described to play a key role in the elongation and maturation of the double membrane autophagic vesicle, called autophagosome, before its fusion with the lysosome. The mammalian ATG8 family comprises the LC3 subfamily (LC3A, B and C) and the GABARAP subfamily (GABARAP, GABARAP-L1 and GABARAP-L2). Autophagy has been described to play a major role in different physiological processes and in particular in immunity, mainly by processing and delivering peptides during the antigen presentation process. Therefore, the aim of our study is to investigate the role of autophagy and ATG8 proteins in the presentation of endogenous tumor-specific antigenic peptides and to modulate autophagy in order to increase the immune response. Ovalbumine (OVA) was chosen as an antigen to take advantage of our model of OT-II specific transgenic mice which express CD4<sup>+</sup> T-cells specific to OVA epitopes.

Firstly, we generated B16-OVA GABARAPL1-Knock-out melanoma cells using the CrispR/Cas9 technology to specifically study the role of GABARAPL1 in MHC II presentation. When GABARAPL1 is knocked down in B16-OVA, we demonstrated that basal autophagic flux and proliferation are significantly decreased. Then we will inject these cells into C57/Bl6 mice and study tumor infiltrating lymphocytes. We hypothesised that a lower autophagic flux might induce decreased antigen presentation and lower CD4<sup>+</sup> lymphocyte efficiency. Secondly, to increase antigen targeting to autophagosomes, plasmids encoding fusion proteins ATG8-OVA have been created. Stable B16-OVA-LC3B and B16-OVA-GABARAP cells have been established in order to confirm the capacity of the ATG8 proteins to specifically target OVA antigen into autophagosomes.

Finally, normal mouse dendritic cells will then be transfected with these vectors in order to evaluate their ability to generate an immune response which could inhibit B16-OVA tumor development. This project will provide new data on the recruitment of antigenic peptides to the phagophore meanwhile evaluating the role of ATG8 proteins in this process. This project may lead to the development of an innovative anti-tumor immunotherapy strategy based on the targeting of autophagy factors able to stimulate tumor antigen-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes activity.

**Keywords:** *autophagy, antigen presentation, ATG8 members, B16-OVA, GABARAP, GABARAPL1, LC3B, MHC class II.*

## Type I collagen aging facilitate breast cancer cell growth in a 3D matrix model, through a differential activation of DDR1

---

Charles Saby<sup>1</sup>, Hassan Rammal<sup>1</sup>, Kevin Magnien<sup>1</sup>, Sylvie Pasco-Brassart<sup>2</sup>, Laurence Van-Gulick<sup>1</sup>, Erik Maquoi<sup>3</sup>, Pierre Jeannesson<sup>1</sup> & Hamid Morjani<sup>1</sup>

1. University of Reims, Faculty of Pharmacy, MEDyC CNRS UMR7369, Reims, France

2. University of Reims, Faculty of Medicine, MEDyC CNRS UMR7369, Reims, France

3. University of Liège, GIGA, Tumour and Developmental Biology, Liège, Belgium

During breast carcinoma development, cells are confronted to a type I collagen-rich environment which induces anti-proliferative and pro-apoptotic responses (Maquoi et al., *Oncogene*, 2012). These effects occurred only in 3D cell matrix and involved Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) but not  $\beta 1$  integrin (Assent et al., *PlosOne*, 2015). During aging, type I collagen undergoes post-translational modifications which have a detrimental effect on type I collagen fibrillar organization (Aït-Belkacem, *J Biomed Optics*, 2012 ; Guilbert et al., *Oncotarget*, 2016). This property is well known to be requested to activate DDR1. Here, we address the effect of type I collagen aging on cell proliferation inhibition and apoptosis induction in breast carcinoma cells, in a 3D cell confinement system.

Type I collagen was extracted from tail tendons of 2 months (adult) and 2 years (old) rats, and MCF-7 and ZR-75-1 breast carcinoma cells were used as an experimental model. We provide evidence for a decrease in cell proliferation induced by adult collagen but not by the old one. This effect involves a higher phosphorylation of DDR1 in presence of adult collagen when compared to the old one. Inhibition of DDR1 kinase activity by the specific inhibitor DDR1-IN-1 induced an increase in cell proliferation to a level similar to that observed in old collagen. An increase in cell proliferation was also observed using siRNA targeting DDR1 mRNA. At the opposite of old collagen, adult collagen was also able to triggers apoptosis by inducing an increase in expression of the pro-apoptotic protein (BIK). Inhibition of DDR1 kinase activity induced a decrease in BIK expression and apoptosis.

Taken together, these results support the concept that aging contributes to the loss of the growth suppression and pro-apoptotic effects of collagen on breast carcinoma, but only in 3D cell confinement model, by inactivating the DDR1-BIK signaling axis *via* a downregulation of DDR1 activation. Finally, these finding underlines the importance of aging-mediated ECM structural changes that may influence tumor cell behavior in the elderly patients.

**Keywords:** type I collagen, aging, DDR1, apoptosis, breast carcinoma.

## Understanding the anti-tumor immune modulation mediated by chemoradiation to improve immunotherapy efficacy

---

Elodie Lauret Marie Joseph<sup>1</sup>, Caroline Bonin<sup>2</sup>, Laurie Rangan<sup>1</sup>, Laura Boullerot<sup>1</sup>, Jihane Boustani<sup>3</sup>, Caroline Laheurte<sup>4</sup>, Stephanie Servagi<sup>5</sup> & Olivier Adotevi<sup>1</sup>

1. UMR1098, Besançon, France

2. Radiothérapie, CHRU Minjoz, Besançon, France

3. CHRU Minjoz, Besançon, France

4. URM1098, Besançon, France

5. Institut Jean Godinot, Reims, France

Recently, immune checkpoint inhibitors (anti-PD1/PD-L1, anti-CTLA4...) raised great interest because of tremendous durable responses obtained in different human cancers. (Topalian et al. 2012, Hodi et al. 2010). These impressive clinical benefits were positively correlated with the presence of preexisting antitumor immune responses. However, up to 60-80% of lung cancer patients remains refractory to these treatments. To improve the efficacy of these innovative immunotherapies, a strategy would be to combine it with conventional cancer therapies such as chemotherapy (CT) or radiotherapy (RT). Recent studies have demonstrated the ability of CT and RT to modulate host anti-tumor T cell responses (Zitvogel et al.2013, Formenti et al.2012). The synergistic action of concomitant chemoradiotherapy (cRTCT) administration has been shown in lung cancer but its impact on anti-tumor T cell responses is still unclear.

In this project we analyzed *in vivo* in different mouse lung and colorectal tumor models the impact of cRTCT on anti-tumor CD8 T cell responses. Our first results showed that, cRTCT favor tumor infiltration by anti-tumor CD8 T cells and immunosuppressive cells such as regulatory T cells (Treg) and Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC). However, these tumor-infiltrating CD8 T cells (CD8 TILs) were not functional as they were not able to specifically produce IFN $\gamma$  in response to a tumor peptide. Interestingly, the conditional elimination of Treg significantly improved the anti-tumor efficacy of cRTCT but did not restore the functionality of antitumor CD8 T cells. On the other hand, we found that tumor-specific CD8 TILs from cRTCT-treated mice expressed high levels of PD1 and TIM3 inhibitory receptors. Concomitantly a strong induction of PD-L1 inhibitory ligand was observed on tumor cells, suggesting that combining cRTCT to anti-PD1/PDL1 blocking antibodies may be an appropriate strategy to improve the antitumor efficiency of cRTCT. Taken together, our results strongly suggest that there is a rationale to combine cRTCT with immune checkpoint inhibitors in order to restore antitumor T cell responses and therefore favor the clinical outcome.

**Keywords:** lung cancer, immunotherapy, immune checkpoints, antitumor T responses.



PHARMACOLOGIE  
DES AGENTS ANTI-CANCÉREUX

# Pharmacocinétique des thérapies ciblées dans le cancer du rein métastatique chez le patient insuffisant rénal chronique hémodialysé

---

Ulrich Stein<sup>1</sup>, Elodie Klajer<sup>1</sup>, Fabien Calcagno<sup>1</sup>, Guillaume Mouillet<sup>1</sup>, Tristan Maurina<sup>1</sup>, Philippe Monctuquet<sup>1</sup>, Thierry Nguyen<sup>1</sup>, Hamadi Almotlak<sup>1</sup>, Emeline Orillard<sup>1</sup>, Stephane Bouchet<sup>2</sup>, Bernard Royer<sup>1</sup> & Antoine Thiery-Vuillemin<sup>1</sup>

1. *Oncologie, CHRU Jean Minjot, Besançon, France*

2. *Pharmacologie, CHU Pellegrin, Bordeaux, France*

## INTRODUCTION

Selon le type de chirurgie initiale, le pourcentage d'évolution des patients suivis pour un cancer du rein métastatique vers l'insuffisance rénale chronique terminale ou la dialyse est situé entre 2 et 3 %. Nous présentons l'expérience franc-comtoise dans la prescription des thérapies ciblées en termes de pharmacocinétique dans le cancer du rein métastatique hémodialysé.

## MÉTHODOLOGIE

Cohorte prospective multicentrique régionale des patients traités en Région Franche-Comté par thérapie ciblée, pour un cancer du rein métastatique en situation d'hémodialyse pour insuffisance rénale chronique terminale, définie par une clairance inférieure à 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> en CKD-EPI. Nous avons évalué l'impact de l'hémodialyse sur la pharmacocinétique des thérapeutiques.

## RÉSULTATS

Quatre patients sont reportés : un patient traité par Sunitinib (schéma 37,5/j 4 semaines sur 6 puis modifié à 50 mg/j 2 semaines sur 3 du fait de toxicités de grade 2), deux patients traités par Everolimus et un patient sous Axitinib. La cause de l'insuffisance rénale bilatérale était pour les trois premiers patients la néphrectomie bilatérale.

Pour le patient sous Sunitinib il n'a pas été observé de modification des concentrations plasmatiques.

De même, chez les deux patients sous Everolimus, il n'a pas été observé de modification des concentrations plasmatique par rapport à un sujet sain.

## CONCLUSION

L'hémodialyse ne modifie pas les concentrations plasmatiques de Sunitinib et d'Everolimus chez le patient traité pour un cancer du rein métastatique en situation d'insuffisance rénale terminale.

Les données concernant le patient sous Axitinib seront présentées oralement.

*Mots clés : pharmacocinétique, thérapies ciblées, hémodialyse.*



AUTRES CATÉGORIES



## Cancer du sein chez un sujet très jeune

---

**Hafid Remouche**

*Chirurgie générale, EPH, Mostaganem, Algérie*

### INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le cancer du sein connaît une incidence qui croît avec l'âge. Ainsi dans la majorité des cas il survient à partir de 45 ans. La survenue du cancer du sein chez un sujet de moins de 20 ans est exceptionnelle.

### MÉTHODE ET RÉSULTAT

Nous rapportant le cas d'une patiente R.H âgée de 19 ans aux antécédents familiaux de cancer du sein chez la mère admise au service de chirurgie générale pour la prise en charge d'un nodule du sein suspect dont la biopsie excisée est revenue en faveur d'un carcinome lobulaire RH(+) et HER (-).

### CONCLUSION

Le cancer du sein de la femme jeune pose de nombreuses problématiques aux chirurgiens et aux oncologues en terme de thérapeutique.

*Mots clés : cancer du sein, chirurgie, chimiothérapie, sujet jeune.*

## Circulating exosomes: how to improve early cancer diagnosis

---

Marine Cordonnier<sup>1</sup>, Gaetan Chanteloup<sup>1</sup>, Jessica Gobbo<sup>2</sup> & Carmen Garrido<sup>1</sup>

1. U866, INSERM, Dijon, France

2. CGFL, Dijon, France

### BACKGROUND

Cancer is one of the most lethal disease due to the lack of early diagnosis. A major advance for the cancer diagnosis has been the detection of circulating tumor cells (CTCs) in the blood. Although this method is non-invasive, it suffers from a main limitation: CTCs are rare events (only one single CTC in a background of as many as  $10^9$  normal blood cells).

Broad ranges of cells including tumor cells release exosomes, nanovesicles derived from endosomal pathway. A single cancer cell can release thousands of exosomes which can be found in body fluids (i.e. blood, urine, saliva). Thus, it represents a potential non-invasive biomarker for early diagnosis and patient's follow-up. We have found that tumor cells release exosomes that express heat shock protein-70 on their membrane (HSP70-exosomes), contrary to normal cells (Gobbo et al, JNCI, 2015).

We have set up a clinical study (ExoDiag) to capture these tumor-derived-exosomes, both from the urine and the blood of cancer patients using an innovative technical approach (patent EP143058980, 2014). The aim of ExoDiag is to determine if HSP70-exosomes can be used for cancer diagnosis or/and as predictive markers of the response to treatment.

### METHODS

A total of 60 patients with newly diagnosed non-small cells lung cancer, ovarian cancer or breast cancer and 20 healthy subjects (aged 50-70 years) are enrolled. All patients are treated with standard anti-cancer treatment. HSP70-exosomes are isolated from fresh plasma and urine by ultracentrifugation and characterized by Nanosight, Western-blotting and Biolayer Interferometry analysis. Our primary purpose is to determine the concentration of HSP70, by ELISA test, in exosomes from urine and plasma of the patients compared to controls, and establishes a detection threshold in cancer compared to healthy donors. Then, the concentration in HSP70-exosomes from urine and plasma will be correlated with response to treatment and survival.

This is a one-year study started in September 2015. We hope this study will provide crucial information regarding the suitability of HSP70-exosomes for early diagnosis in cancer and lead to more individualized therapy decisions.

**Keywords:** exosomes, diagnosis, cancer, heat shock proteins.

## Effet anti-tumoral de la combinaison de chimiothérapies (FOX) et d'un donneur de monoxyde d'azote (GTN)

---

Lucile Dondaine, Cindy Racœur, Nadhir Yousfi, Ali Bettaieb & Catherine Paul  
EA7269 uB/EPHE, EPHE, Dijon, France

Il est maintenant bien établi que certaines chimiothérapies peuvent, en plus de leur capacité cytotoxique, induire un mécanisme de mort cellulaire immunogène (ICD) caractérisée entre autre par l'externalisation de la calréticuline (CRT). Cette ICD joue un rôle important dans l'efficacité des thérapies conventionnelles, voir également celles ciblant les points de contrôle immunitaire. Malgré de nombreuses publications portant sur l'externalisation de la CRT, le mécanisme exact n'est à ce jour pas totalement décrit. Dans cette étude nous mettons en évidence le rôle primordial du monoxyde d'azote (NO) dans le mécanisme d'externalisation de la calréticuline. En effet, un donneur de NO, le GTN, à la capacité de potentialiser l'effet anti-tumoral de chimiothérapies conventionnelles telles que le FOX (oxaliplatine et 5-Fluorouracile) dans un modèle syngénique de tumeurs d'origine colique. Cet effet est totalement absent dans des modèles de souris immunodéficientes, impliquant ainsi le système immunitaire.

Nous avons recherché si l'effet sensibilisateur du GTN pouvait passer par l'induction de l'ICD et avons alors montré que la proportion de cellules présentant de la calréticuline membranaire est fortement augmentée en présence de GTN + FOX, un phénomène complètement inhibé en présence d'un agent chélatant le NO (c-PTIO). Le rôle du monoxyde d'azote (NO) et des modifications post-traductionnelles qu'il génère (S-nitrosylation et Tyr-nitration) sur la calréticuline mais également sur les protéines clés dans les mécanismes d'externalisation de cette protéine ont été recherchés.

*Mots clés : cancer, côlon, monoxyde d'azote, chimiothérapies, mort immunogène.*

## Heparan sulfate proteoglycans promote telomerase internalization and MHC class II presentation on dendritic cells

---

Jeanne Galaine<sup>1</sup>, Guillaume Kellermann<sup>2</sup>, Yves Guillaume<sup>3</sup>, Romain Boidot<sup>4</sup>, Emilie Picard<sup>1</sup>, Romain Loyon<sup>1</sup>, Lise Queiroz<sup>1</sup>, Laura Boullerot<sup>1</sup>, Laurent Beziaud<sup>1</sup>, Marine Jary<sup>1</sup>, Laura Mansi<sup>1</sup>, Claire Andre<sup>1</sup>, Lydie Lethier<sup>3</sup>, Evelyne Ségal-Bendirdjia<sup>5</sup>, Christophe Borg<sup>6</sup>, Yann Godet<sup>1</sup> & Olivier Adotevi<sup>6</sup>

1. INSERM UMR1098, EFS, Besançon, France

2. INSERM, UMR S1007, University of Paris Descartes, Paris, France

3. Equipe d'Accueil 481, Laboratoire de Chimie Analytique Bioanalytique et Physique, Besançon, France

4. INSERM, UMR 866, Platform of Transfer in Cancer Biology, Georges François-Leclerc Center, Dijon, France

5. INSERM, UMR S1007, 2University of Paris Descartes, Paris, France

6. Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon France

Telomerase is a prototype-shared tumor Ag and represents an attractive target for anticancer immunotherapy. We have previously described promiscuous and immunogenic HLA-DR-restricted peptides derived from human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and referred as universal cancer peptide (UCP). In non-small cell lung cancer, the presence of spontaneous UCP-specific CD4 T cell responses increases the survival of chemotherapy-responding patients. However, the precise mechanisms of hTERT's uptake, processing, and presentation on MHC-II molecules to stimulate CD4 T cells are poorly understood. In this work, by using well-characterized UCP-specific CD4 T cell clones, we showed that hTERT processing and presentation on MHC-II involve both classical endolysosomal and nonclassical cytosolic pathways.

Furthermore, to our knowledge, we demonstrated for the first time that hTERT's internalization by dendritic cells requires its interaction with surface heparan sulfate proteoglycans. Altogether, our findings provide a novel mechanism of tumor-specific CD4 T cell activation and will be useful for the development of novel cancer immunotherapies that harness CD4 T cells.

**Keywords:** hTERT, CD4 T cells, antigen processing pathways.

## Identification de la période de « normalisation » vasculaire induite par le bevacizumab, *in vivo*, à l'aide d'un algorithme de traitement d'images

---

**Karima El Alaoui Lasmali, El-Hadi Djermoune, Jean-Baptiste Tylcz, Dominique Meng, François Plénat, Noémie Thomas & Béatrice Faivre**  
CRAN, Université de Lorraine, Nancy, France

Les agents anti-angiogènes sont largement utilisés dans la thérapie anti-cancéreuse, en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie, pour leurs effets vasculaires. Ils sont supposés induire des modifications morphologiques et fonctionnelles au sein du réseau vasculaire tumoral qui permettraient d'accroître l'efficacité de ces thérapies grâce à l'amélioration de la distribution de la chimiothérapie au sein de la tumeur et à l'amélioration de l'oxygénation tumorale. Cependant, il reste difficile de trouver la séquence de traitements permettant d'avoir une efficacité thérapeutique optimale car il n'y a à ce jour aucun consensus dans la littérature définissant quand le réseau vasculaire est amélioré et pendant combien de temps.

Nous avons développé un algorithme de traitement d'images capable d'analyser les structures vasculaires observées sur des images en microscopie optique du réseau vasculaire et nous avons suivi leurs modifications, *in vivo*, au cours du temps, à l'aide du modèle de la chambre dorsale. L'algorithme a été appliqué pour suivre l'évolution de paramètres vasculaires (surface vasculaire, embranchements, bourgeons, longueur) en réponse ou non au bevacizumab (anti-VEGF, 10 mg/kg/jour) pour déterminer une période de « normalisation » du réseau vasculaires par comparaison à des réseaux vasculaires sains.

Les résultats présentés ici démontrent que le choix de la région d'intérêt au sein du réseau vasculaire doit se faire en dehors des régions présentant une hiérarchie artériole-capillaire-veinule afin de pouvoir déterminer la période de « normalisation » vasculaire. L'analyse à l'aide de l'algorithme de traitement d'images a permis de définir que la période de « normalisation » se situait entre 8 et 12 jours de traitement par bevacizumab et a été confirmé par analyses immunohistochimiques et évaluation de la fonctionnalité vasculaire (perméabilité, perfusion).

**Mots clés :** thérapie anti-angiogène, normalisation vasculaire, quantification algorithmique, imagerie intravitale.

## Identification of tumor-associated immunogenic neoepitopes induced after treatment with Alkylating agent

---

**Sindy Vrecko<sup>1</sup>, Bernard Royer<sup>2</sup>, Virginie Mougey<sup>1</sup>, Jean-Paul Feugeas<sup>3</sup>, Romain Boidot<sup>4</sup>, Marine Jary<sup>5</sup>, Fabien Calcagno<sup>5</sup>, Olivier Adotévi<sup>5</sup>, Christophe Borg<sup>5</sup> & Yann Godet<sup>1</sup>**

1. UMR1098, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

2. Pharmacovigilance et de Pharmacologie, CHRU, Besançon, France

3. UMR1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris cité, France

4. UMR866, Centre Georges François Leclerc, Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Dijon, France

5. Oncologie médicale, CHRU, Besançon, France

Cancer cells evolve by undergoing DNA mutations. These non-synonymous mutations could be a source of mutated peptides (neopeptides), which are processed, presented by HLA molecules on cancer cells and recognized by CD4+ or CD8+ T cells. The recognition of HLA-neopeptide complex by TCR could lead cancer cells. Neopeptides are only expressed by cancer cells, making them good targets for cancer immunotherapy. Several cancer therapies, modulate the immune system, among which alkylating agent known to induce mutations in specific DNA sequences (AG, GG, 5'AG and 5'GG), creating a mutational signature.

In addition to the cytotoxic chemotherapy effect, we purpose that Oxaliplatin, an alkylating agent, could induce non-synonymous mutation in cancer cells, which lead to immune responses against neoepitopes.

To study the existence of immunogenic neoepitopes, after treatment by Oxaliplatin, we used a RNA sequencing from non-treated and Oxaliplatin-treated HT29 cells (HT29-Oxa). In order to identify the missense mutations potentially immunogenic, we generated a list of predicted neoantigens. Using computational algorithms, we determined the HT29 cells HLA-binding potential of each of these neoantigens.

Preliminary results show 49% of mutational signature corresponding to Alkylating agent, after treatment, compared to 36.2% in non-treated cells. Moreover, we identified 26 potentially immunogenic peptides from 18 225 mutations in HT29-Oxa. We are testing the T cell repertory, by culturing healthy donors' PBMC with neopeptides. After several peptides stimulations, we will test the reactivity of T cells by IFN $\gamma$  intra-cellular staining.

This study could add an argument in favor of combination of immunotherapy, such as anti-PD-1 or anti-CTLA-4, with alkylating agent. Moreover, we will study the presence of immunogenic peptides in several models and in patient.

**Keywords:** alkylating agent, oxaliplatin, neoantigens, tumor-associated antigens.

## Modulation d'un biomarqueur de chimiorésistance au docétaxel, la clusterine, par le GTN (glyceryl trinitrate), un donneur de monoxyde d'azote (NO), dans des cellules cancéreuses prostatiques

---

**Sarra Bouaouiche**

EA7269, EPHE, Dijon, France

Depuis 2004, la chimiothérapie par docétaxel est le traitement standard du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCPRC). Cependant, l'efficacité de ce traitement est limitée dans le temps puisque les cellules tumorales peuvent développer une résistance au docétaxel, par différentes voies, induisant une progression tumorale qui peut conduire à la mort du patient. Ces changements dans les cellules tumorales sont révélés par des modifications dans certaines molécules appelées marqueurs de résistance.

Ce travail tend à étudier l'effet sensibilisateur d'un donneur de monoxyde d'azote (NO), le Glyceryl Trinitrate (GTN), à la mort cellulaire dans les lignées chimio-résistantes ainsi que de préciser son activité régulatrice sur deux marqueurs de résistance qui sont la molécule chaperonne Clusterin (CLU) et la cytokine GDF-15 qui appartient à la famille du TGF- $\beta$ .

Nous avons utilisé deux lignées parentales de cancer de la prostate, DU145 et PC3-AG ainsi que leurs dérivés chimio-résistantes au docétaxel DU145-DR et PC3-D12. Nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire afin de vérifier leur sensibilité au GTN ainsi que des essais incluant des siARN dans le but de voir si l'action cytotoxique du GTN dépendait de la CLU. Nous avons également mis en évidence l'activité régulatrice du GTN sur la clusterine et le GDF-15 par Western blot, à la fois sur des extraits cellulaires et les surnageants.

Ce travail a permis de démontrer l'effet sensibilisateur du GTN à la mort cellulaire dans des lignées mCRPC et en particulier sur les cellules chimio-résistantes et prouve de façon robuste et originale l'action répressive d'un donneur de NO sur l'expression de la clusterine soluble (sCLU) sur différents modèles de cancer de la prostate. Cette étude a également montré la régulation spécifique par le GTN sur la clusterine nucléaire (nCLU) dans les cellules DU145-DR et sur la forme pro-GDF-15 dans les cellules PC3-D12.

**Mots clés :** cancer de la prostate, chimiorésistance, GTN, Clusterine, GDF-15.

# Novel syngeneic PD-L1 positive sarcoma like tumor for preclinical evaluation of antitumor immunotherapies in HLA-A\*0201/DRB1\*0101 transgenic mice

---

Laurie Rangan<sup>1</sup>, Magalie Dosset<sup>1</sup>, Jeanne Galaine<sup>1</sup>, Romain Boidot<sup>2</sup>, Elodie Lauret Marie Joseph<sup>1</sup>, Yann Godet<sup>1</sup>, Séverine Valmary-Degano<sup>3</sup> & Olivier Adotévi<sup>1</sup>

1. INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions hôte-greffon-tumeur – Ingénierie Cellulaire et Génique, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

2. Platform for Transfer to Cancer Biology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

3. Department of Pathology, Besançon University Hospital, Besançon, France

## OBJECTIVE

Mouse models genetically modified to express human HLA class I and II molecules have shown a great interest to study the *in vivo* immunogenicity of tumor reactive T cell epitopes (Pajot et al. 2004, Dosset et al. 2012). However few appropriate cancer cell lines are available to evaluate the ability of tumor-derived epitopes to promote tumor rejection. This work describes the first syngenic non-chemical induced tumor cell line transplantable in HLA-A\*0201/DRB1\*0101 transgenic mice (A2/DR1 mice), called SARC-L1.

## METHOD

SARC-L1 cell line was generated from naturally spontaneous tumor appeared in a 23-months-old A2/DR1 mouse. Morphological, immunological and genomic characteristics of SARC-L1 were studied by immunohistochemistry, RNA sequencing and flow cytometry. The sensitivity of SARC-L1 to cytotoxic drug and anti-PD-L1 antibody was evaluated.

## RESULTS

Histological and gene signature analysis supported the sarcoma origin of SARC-L1. This cell line lacks both mouse and human MHC class I and II molecules cell surface expression, in accordance to the reduced HLA expression in most human sarcoma. Induction of SARC-L1 cells apoptosis *in vitro* and *in vivo* by using cytotoxic drugs commonly used such as gemcitabine, doxorubicin and cisplatin. Study of SARC-L1 tumor microenvironment showed the presence of various immune cell infiltrations, including T cells, NK cells and MDSC. In addition, high frequency of inhibitory receptors such as PD-1 and TIM-3 was found on T cells. Furthermore, constitutive expression of PD-L1 was found on SARC-L1 cell line, which can be increased *in vitro* by IFN- $\gamma$  exposure. In line with these results, the use of anti-PD-L1 blocking antibody treatment efficiently delayed SARC-L1 tumor growth *in vivo*.

## CONCLUSION

In this study, we demonstrated that SARC-L1, a non-chemical-induced sarcoma derived from A2/DR1 mouse could be a useful model for the preclinical evaluation of antitumor therapies such as chemotherapy or anti-PD-1/PD-L1 based immunotherapy. This tumor cell line also represents a relevant tool to investigate the anti-cancer vaccine in A2/DR1 mouse model.

**Keywords:** HLA-A\*0201/DRB1\*0101 transgenic mouse, sarcoma, PD-L1, T cells, cancer immunotherapy.

## Plateforme préclinique de radiothérapie 3D guidée par l'image

---

Céline Mirjolet<sup>1</sup>, Aurélie Petitfils<sup>2</sup>, Véronique Morgand<sup>1</sup>, Léone Aubignac<sup>2</sup> & Gilles Créhange<sup>1</sup>

1. Radiothérapie / Radiobiologie, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

2. Radiophysique médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

La radiothérapie (RT) est un des acteurs majeurs du traitement du cancer. Elle a de nombreuses indications, seule ou en association avec la chimiothérapie. L'avancée des techniques de radiothérapie permet de délivrer de fortes doses par fraction (hypofractionnement) en limitant au maximum les toxicités radio-induites. Ces techniques de radiothérapie cliniques ont évolué très rapidement dans les 15-20 dernières années avec le développement de la radiothérapie 3D conformationnelle, de l'IMRT (radiothérapie avec modulation d'intensité), de la stéréotaxie et de l'arcthérapie. Ces techniques permettent d'optimiser et d'escalader la dose délivrée au niveau de la cible tumorale afin d'obtenir un meilleur contrôle local et de limiter la dose au niveau des tissus sains environnants afin de limiter les effets secondaires. Afin d'être les plus précises possibles les techniques de RT innovantes sont accompagnées d'un repositionnement du patient (IG-IMRT) avant les séances grâce à des systèmes d'imagerie embarqués aux accélérateurs (imagerie 2D ou 3D *via* un CBCT générant des images de type scanner).

Au niveau préclinique les dispositifs utilisés pour faire de la radiothérapie de petits animaux n'ont pas suivi le développement rapide des technologies mises au service des patients. Ces dispositifs délivrent le plus souvent de la radiothérapie 2D et ne permettent pas de cibler de façon précise les rayonnements ionisants au niveau des tumeurs. Ces dispositifs limitent donc l'utilisation de hautes doses de radiothérapie qui entraîneraient des toxicités radio-induites trop importantes. Cependant les traitements innovants de radiothérapie cliniques utilisent des hautes doses par fractions qui ont des conséquences radiobiologiques et immunologiques différentes que les fractionnements standards (2Gy par fractions).

Il est donc indispensable à l'heure actuelle que les projets de recherche, incluant des traitements par radiothérapie, soient développés avec des techniques de radiothérapie similaires à celles utilisées en clinique.

La plateforme préclinique de radiothérapie du CGFL permet de délivrer de la radiothérapie 3D guidée par l'image (CBCT) par le dispositif SARRP (X-STRAHL) qui émet des photons de 225kV, énergie adaptée à la taille des petits animaux traités (rats ou souris).

Les étapes de préparation au traitement sont similaires à celles réalisées avec nos patients : système de contention adapté à la localisation de la tumeur, scanner, délimitation du volume cible et des organes à risque avoisinants à protéger, choix des faisceaux (nombre, angle de tir, taille...), calcul de la dose et enfin séance de traitement. Les animaux sont sous anesthésie gazeuse durant toute la durée du traitement et de sa préparation.

Les irradiations de plaques de cellules peuvent également être réalisées par le SARRP (test *in vitro*).

Cette nouvelle plateforme offre donc la possibilité à l'ensemble des équipes intéressées dans le Grand Est ou d'ailleurs, de pouvoir développer des projets associant la radiothérapie et de nouvelles chimiothérapies, des nanoparticules ou encore des immunothérapies.

L'équipe de la plateforme est à votre disposition pour vous aider dans vos projets !

**Mots clés :** radiothérapie 3D, petit animal, plateforme.

# Tumor antigen SALL4 hosts T cell epitopes that are recognized by pre-existing naïve and memory T cells in both healthy donors and cancer patients

---

**Laurie Spehner**

UMR1098, EFS BFC, Besançon, France

## BACKGROUND

Cumulative evidences support that SALL4 could be a tumor antigen according to Cheevers criterions. Nevertheless, SALL4's immunogenicity had never been demonstrated yet.

## Purpose

To investigate the immunogenicity of SALL4 peptides in healthy volunteers and cancer patients.

## EXPERIMENTAL DESIGN

A multistep approach including prediction algorithms was used to design *in silico* 15 SALL4-derived peptides theoretically able to bind on common HLA-DR and HLA-A/B molecules. Peptides were divided into 5 pools: 2 pools of HLA-DR and 3 pools of HLA-A/B designed peptides. The presence of naïve and memory T-cell responses against SALL4 was monitored in 14 healthy donors and the presence of memory T-cell responses was monitored in 67 cancer patients using IFN- $\gamma$  ELISPOT assay. A T-cell clone specific for A18K SALL4-derived peptide was isolated from one healthy donor before being phenotypically and functionally characterized. SALL4 expression in various cell lines was investigated using western blotting and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Cell lysate were generated using a cell line expressing high level of SALL4 protein (HeLa). Our A18K specific T-cell clone provides us a tool to characterize natural processing of A18K peptide using moDC suitable in term of HLA-DR with the clone. Results: SALL4-specific naïve T-cell repertoire was present in healthy donors (8/14). Frequency of positive responses from HLA-DR pools was higher than the one of HLA-A/B pools. A memory repertoire was present in healthy donors (9/14) and cancer patients (31/67). Means intensities of positive responses among healthy donors for HLA-DR restricted peptides was  $156 \pm 35$  (n=13) IFN-g spots. There was no positive responses with HLA-A/B restricted peptides. Means intensities of positive responses among cancer patients for HLA-DR and HLA-A/B restricted peptides were respectively  $110 \pm 17$  (n = 34) and  $108 \pm 56$  (n = 5) IFN-g spots. When we tested separately peptides from pools 1 and 2, R18A and A18K peptides was the source of 5/9 and 9/13 positive responses among healthy donors and 5/6 and 4/5 positive responses among cancer patients respectively. Thus, both of them appeared as major immunogenic peptides. A18K peptide was restricted by the HLA-DR of our CD4 T-cell clone. Multi-cytokines analysis confirmed the clone's production of Th1 cytokine. Moreover it mainly expressed CXCR3 chemokine receptors whereas no CCR6, CCR4 or CXCR5 receptors, in agreement with a Th1 polarization. Finally, using moDC and SALL4 containing cell lysate we explored SALL4 natural processing. A18K T-cell clone secreted IFN-g in presence of moDC loaded with SALL4 lysate protein ( $49.23 \pm 14.02\%$ ) whereas few with moDC alone ( $18.03 \pm 3.07\%$ ) (p= 0.0477).

## CONCLUSION

These results show for the first time immunogenicity of SALL4-derived peptides, especially A18K and R18A peptides thus providing new evidences to consider SALL4 as a tumor antigen.

**Keywords:** SALL4, Tumor antigen, immunotherapy, cancer, lymphocytes.