

Expression des biomarqueurs de réponse immunitaire dans les carcinomes épidermoïdes des VADS récidivant en territoire irradié

Carole Pflumio

▶ **To cite this version:**

Carole Pflumio. Expression des biomarqueurs de réponse immunitaire dans les carcinomes épidermoïdes des VADS récidivant en territoire irradié. Médecine humaine et pathologie. 2019. hal-03297730

HAL Id: hal-03297730
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297730

Submitted on 18 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

2019

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Carole PFLUMIO

Le 13 septembre 2019

EXPRESSION DES BIOMARQUEURS DE RÉPONSE IMMUNITAIRE DANS LES CARCINOMES ÉPIDERMOÏDES DES VADS RÉCIDIVANT EN TERRITOIRE IRRADIÉ

Membres du jury :

Monsieur Le Professeur Thierry CONROY	Président
Monsieur Le Professeur Gabriel MALOUF	Juge
Monsieur Le Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT	Juge
Monsieur Le Docteur Lionnel GEOFFROIS	Juge et Directeur
Monsieur Le Docteur Gilles DOLIVET	Juge

Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT

Doyen de la Faculté de Médecine
Professeur Marc BRAUN

Vice-doyens
Pr Karine ANGIOI-DUPREZ, Vice-Doyen
Pr Marc DEBOUVERIE, Vice-Doyen

Assesseurs :
Premier cycle : Dr Julien SCALA-BERTOLA
Deuxième cycle : Pr Marie-Reine LOSSER
Troisième cycle : Pr Marc DEBOUVERIE

Président de Conseil Pédagogique : Pr Bruno CHENUEL

Formation à la recherche : Dr Nelly AGRINIER

SIDES : Pr Laure JOLY
Relations Grande Région : Pr Thomas FUCHS-BUDER
CUESIM : Pr Stéphane ZUILY

Chargés de mission

Bureau de docimologie : Dr Guillaume VOGIN
Commission de prospective facultaire : Pr Karine ANGIOI-DUPREZ
Orthophonie : Pr Cécile PARIETTI-WINKLER
PACES : Dr Mathias POUSSEL
Plan Campus : Pr Bruno LEHEUP
International : Pr Jacques HUBERT

==========

DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER - Professeur Henry COUDANE

==========

PROFESSEURS HONORAIRES

Etienne ALIOT - Jean-Marie ANDRE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL – Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE Jean-Louis BOUTROY – Serge BRIANÇON - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT Jean-François CHASSAGNE - François CHERRIER Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Emile de LAVERGNE
Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Jean-Bernard DUREUX - Gilbert FAURE - Gérard FIEVE Bernard FOLIGUET Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Professeur Jean-Luc GEORGE - Alain GERARD Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Gilles GROSDIDIER - Oliéro GUERCI
Philippe HARTEMANN Gérard HUBERT - Claude HURIET - Michèle KESSLER - François KOHLER
Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Alain LE FAOU Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Philippe MANGIN – Jean-Claude MARCHAL – Yves MARTINET Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Pierre MONIN Pierre NABET – Patrick NETTER - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT Francis PENIN - Claude PERRIN - Luc PICARD - François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT - Jacques ROLAND - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ -Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Gérard VAILLANT - Paul VERT
Hervé VESPIGNANI - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WEBER

==========

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Etienne ALIOT - Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Pierre BEY - Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Jean-Pierre CRANCE Professeur Gilbert FAURE - Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Alain GERARD – Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ - Professeur Gilles GROSDIDIER
Professeur Philippe HARTEMANN - Professeur Michèle KESSLER - Professeur François KOHLER - Professeur Alain LE FAOU Professeur Jacques LECLERE - Professeur Yves MARTINET – Professeur Patrick NETTER - Professeur Jean-Pierre NICOLAS
Professeur Luc PICARD - Professeur François PLENAT - Professeur Jean-François STOLTZ

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42ème Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1ère sous-section : ***(Anatomie)***
Professeur Marc BRAUN – Professeure Manuela PEREZ
2ème sous-section : ***(Histologie, embryologie et cytogénétique)***
Professeur Christo CHRISTOV
3ème sous-section : ***(Anatomie et cytologie pathologiques)***
Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Guillaume GAUCHOTTE

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : ***(Biophysique et médecine nucléaire)***
Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER
2ème sous-section : ***(Radiologie et imagerie médicale)***
Professeur René ANXIONNAT - Professeur Alain BLUM - Professeur Serge BRACARD - Professeur Michel CLAUDON Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT - Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur Pedro GONDIM TEIXEIRA

44ème Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1ère sous-section : ***(Biochimie et biologie moléculaire)***
Professeur Jean-Louis GUEANT - Professeur Bernard NAMOUR - Professeur Jean-Luc OLIVIER
2ème sous-section : ***(Physiologie)***
Professeur Christian BEYAERT - Professeur Bruno CHENUEL - Professeur François MARCHAL
4ème sous-section : ***(Nutrition)***
Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT - Professeur Olivier ZIEGLER

45ème Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1ère sous-section : ***(Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)***
Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER
2ème sous-section : ***(Parasitologie et Mycologie)***
Professeure Marie MACHOUART
3ème sous-section : ***(Maladies infectieuses ; maladies tropicales)***
Professeur Thierry MAY - Professeure Céline PULCINI - Professeur Christian RABAUD

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1ère sous-section : ***(Épidémiologie, économie de la santé et prévention)***
Professeur Francis GUILLEMIN - Professeur Denis ZMIROU-NAVIER
3ème sous-section : ***(Médecine légale et droit de la santé)***
Professeur Henry COUDANE
4ème sous-section : ***(Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)***
Professeure Eliane ALBUISSON - Professeur Nicolas JAY

47ème Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1ère sous-section : ***(Hématologie ; transfusion)***
Professeur Pierre FEUGIER
2ème sous-section : ***(Cancérologie ; radiothérapie)***
Professeur Thierry CONROY - Professeur François GUILLEMIN - Professeur Didier PEIFFERT - Professeur Frédéric MARCHAL
3ème sous-section : ***(Immunologie)***
Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT - Professeure Marie-Thérèse RUBIO
4ème sous-section : ***(Génétique)***
Professeur Philippe JONVEAUX - Professeur Bruno LEHEUP

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1ère sous-section : ***(Anesthésiologie-réanimation)***
Professeur Gérard AUDIBERT - Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Thomas FUCHS-BUDER
Professeure Marie-Reine LOSSER - Professeur Claude MEISTELMAN

2ème sous-section : ***(Réanimation)***
Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Sébastien GIBOT - Professeur Bruno LÉVY

3ème sous-section : ***(Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)***
Professeur Pierre GILLET - Professeur Jean-Yves JOUZEAU

4ème sous-section : ***(Thérapeutique ; addictologie)***
Professeur François PAILLE - Professeur Patrick ROSSIGNOL – Professeur Faiez ZANNAD

49ème Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1ère sous-section : ***(Neurologie)***
Professeur Marc DEBOUVERIE - Professeur Louis MAILLARD - Professeur Luc TAILLANDIER - Professeure Louise TYVAERT

2ème sous-section : ***(Neurochirurgie)***
Professeur Jean AUQUE - Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS - Professeur Olivier KLEIN

3ème sous-section : ***(Psychiatrie d'adultes ; addictologie)***
Professeur Jean-Pierre KAHN - Professeur Raymund SCHWAN

4ème sous-section : ***(Pédopsychiatrie ; addictologie)***
Professeur Bernard KABUTH

5ème sous-section : ***(Médecine physique et de réadaptation)***
Professeur Jean PAYSANT

50ème Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1ère sous-section : ***(Rhumatologie)***
Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE - Professeur Damien LOEUILLE

2ème sous-section : ***(Chirurgie orthopédique et traumatologique)***
Professeur Laurent GALOIS - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX

3ème sous-section : ***(Dermato-vénéréologie)***
Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

4ème sous-section : ***(Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)***
Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51ème Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1ère sous-section : ***(Pneumologie ; addictologie)***
Professeur Jean-François CHABOT - Professeur Ari CHAOUAT

2ème sous-section : ***(Cardiologie)***
Professeur Edoardo CAMENZIND - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET - Professeur Yves JUILLIERE
Professeur Nicolas SADOUL

3ème sous-section : ***(Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)***
Professeur Thierry FOLLIGUET - Professeur Juan-Pablo MAUREIRA

4ème sous-section : ***(Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)***
Professeur Sergueï MALIKOV - Professeur Denis WAHL – Professeur Stéphane ZUILY

52ème Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1ère sous-section : ***(Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)***
Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI - Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3ème sous-section : ***(Néphrologie)***
Professeur Luc FRIMAT - Professeure Dominique HESTIN

4ème sous-section : ***(Urologie)***
Professeur Pascal ESCHWEGE - Professeur Jacques HUBERT

53ème Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE

1ère sous-section : ***(Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie)***
Professeur Athanase BENETOS - Professeur Jean-Dominique DE KORWIN - Professeure Gisèle KANNY
Professeure Christine PERRET-GUILLAUME – Professeur Roland JAUSSAUD – Professeure Laure JOLY

2ème sous-section : ***(Chirurgie générale)***
Professeur Ahmet AYAV - Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD

3ème sous-section : ***(Médecine générale)***
Professeur Jean-Marc BOIVIN – Professeur Paolo DI PATRIZIO

54ème Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION
1ère sous-section : ***(Pédiatrie)***
Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET - Professeur Jean-Michel HASCOET
Professeur Emmanuel RAFFO - Professeur Cyril SCHWEITZER
2ème sous-section : ***(Chirurgie infantile)***
Professeur Pierre JOURNEAU - Professeur Jean-Louis LEMELLE
3ème sous-section : ***(Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)***
Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Olivier MOREL
4ème sous-section : ***(Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)***
Professeur Bruno GUERCI - Professeur Marc KLEIN - Professeur Georges WERYHA

55ème Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU
1ère sous-section : ***(Oto-rhino-laryngologie)***
Professeur Roger JANKOWSKI - Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER
2ème sous-section : ***(Ophtalmologie)***
Professeure Karine ANGIOI - Professeur Jean-Paul BERROD
3ème sous-section : ***(Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)***
Professeure Muriel BRIX

==========

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61ème Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL
Professeur Walter BLONDEL

64ème Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER - Professeur Pascal REBOUL

65ème Section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Professeure Céline HUSELSTEIN

==========

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE
Professeur associé Sophie SIEGRIST

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42ème Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE
1ère sous-section : ***(Anatomie)***
Docteur Bruno GRIGNON
2ème sous-section : ***(Histologie, embryologie et cytogénétique)***
Docteure Chantal KOHLER

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE
1ère sous-section : ***(Biophysique et médecine nucléaire)***
Docteur Antoine VERGER (stagiaire)
2ème sous-section : ***(Radiologie et imagerie médicale)***
Docteur Damien MANDRY

44ème Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION
1ère sous-section : ***(Biochimie et biologie moléculaire)***
Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA - Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle AIMONE-GASTIN
Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteur Marc MERTEN - Docteur Abderrahim OUSSALAH
2ème sous-section : ***(Physiologie)***
Docteure Silvia DEMOULIN-ALEXIKOVA - Docteur Mathias POUSSEL – Docteur Jacques JONAS (stagiaire)
3ème sous-section : ***(Biologie Cellulaire)***
Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45ème Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE
1ère sous-section : ***(Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)***
Docteure Corentine ALAUZET - Docteure Hélène JEULIN - Docteure Véronique VENARD
2ème sous-section : (Parasitologie et mycologie)
Docteure Anne DEBOURGOGNE

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ
1ère sous-section : ***(Epidémiologie, économie de la santé et prévention)***
Docteure Nelly AGRINIER - Docteur Cédric BAUMANN - Docteure Frédérique CLAUDOT - Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE
2ème sous-section ***(Médecine et Santé au Travail)***
Docteure Isabelle THAON
3ème sous-section ***(Médecine légale et droit de la santé)***
Docteur Laurent MARTRILLE

47ème Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE
1ère sous-section : ***(Hématologie ; transfusion)***
Docteure Aurore PERROT – Docteur Julien BROSEUS
2ème sous-section : ***(Cancérologie ; radiothérapie)***
Docteure Lina BOLOTINE – Docteur Guillaume VOGIN
4ème sous-section : ***(Génétique)***
Docteure Céline BONNET

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE
2ème sous-section : ***(Réanimation ; Médecine d'urgence)***
Docteur Antoine KIMMOUN
3ème sous-section : ***(Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)***
Docteur Nicolas GAMBIER - Docteure Françoise LAPICQUE - Docteur Julien SCALA-BERTOLA
4ème sous-section : ***(Thérapeutique ; Médecine d'urgence ; addictologie)***
Docteur Nicolas GIRERD

50ème Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE
1ère sous-section : ***(Rhumatologie)***
Docteure Anne-Christine RAT
3ème sous-section : ***(Dermato-vénéréologie)***
Docteure Anne-Claire BURSZTEJN
4ème sous-section : ***(Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)***
Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51ème Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE
3ème sous-section : ***(Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)***
Docteur Fabrice VANHUYSE

52ème Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE
1ère sous-section : ***(Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)***
Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX – Docteur Anthony LOPEZ (stagiaire)

53ème Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE
2ème sous-section : (Chirurgie générale)
Docteur Cyril PERRENOT (stagiaire)
3ème sous-section : ***(Médecine générale)***
Docteure Elisabeth STEYER

54ème Section : DEVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION
5ème sous-section : ***(Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)***
Docteure Isabelle KOSCINSKI

55ème Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU
1ère sous-section : ***(Oto-Rhino-Laryngologie)***
Docteur Patrice GALLET

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5ème Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES
Monsieur Vincent LHUILLIER
7ème Section : SCIENCES DU LANGAGE : LINGUISTIQUE ET PHONETIQUE GENERALES
Madame Christine DA SILVA-GENEST
19ème Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE
Madame Joëlle KIVITS

64ème Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Madame Marie-Claire LANHERS - Monsieur Nick RAMALANJAONA

65ème Section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Madame Nathalie AUCHET - Madame Natalia DE ISLA-MARTINEZ - Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS Monsieur Christophe NEMOS

66ème Section : PHYSIOLOGIE
Monsieur Nguyen TRAN

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteur Pascal BOUCHE – Docteur Olivier BOUCHY - Docteur Cédric BERBE - Docteur Jean-Michel MARTY

==========

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würtzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

À notre Maître et Président de Thèse,
Monsieur Le Professeur Thierry CONROY,
Professeur des Universités Praticien Hospitalier d'Oncologie Médicale,

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury et de juger notre travail.

Je vous prie de recevoir au travers de ce travail, Monsieur et cher Maître, l'expression de toute notre reconnaissance ainsi que de notre profond respect. Il tente humblement d'illustrer ce que vous avez toujours essayé de nous transmettre : la réflexion sur un sujet donné, le questionnement sur l'état actuel de la science, la critique des résultats que l'on peut obtenir, les conclusions prudentes à formuler, les possibilités futures qui peuvent se dessiner, les progrès encore à réaliser (et ils sont nombreux !).

Votre parcours, vos combats, votre investissement en Oncologie Médicale, nous montrent qu'il faut toujours poursuivre dans sa tâche, persévérer.

Enfin, votre humanité, votre rigueur et surtout votre humilité font de vous un exemple à suivre pour nous tous.

À notre Maître et Juge,
Monsieur Le Professeur Gabriel MALOUF,
Professeur des Universités Praticien Hospitalier d'Oncologie Médicale,

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Votre expertise est pour nous importante car votre parcours professionnel, votre expérience et votre vaste champ d'action en Oncologie Médicale et en Sciences Translationnelles ne peuvent qu'enrichir un travail souhaitant modestement toucher à la biologie moléculaire, celle-ci prenant une place fondamentale dans notre métier.

Nous vous remercions vivement de l'intérêt que vous portez à cette thèse et sommes ravis de pouvoir vous compter parmi nous.

Veuillez recevoir l'assurance de notre haute considération et de notre plus profond respect.

À notre Maître et Juge,
Monsieur Le Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT,
Professeur des Universités Praticien Hospitalier d'Immunologie,

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury de Thèse et vous en suis très reconnaissante.

L'apport de votre expérience en immunologie est pour nous essentielle dans ce travail car celui-ci aborde notamment toute la problématique du système immunitaire dans la réaction immunitaire antitumorale et de la modification du microenvironnement tumoral en phase post thérapeutique.

Votre parcours et vos compétences professionnelles suscitent toute notre estime.

Recevez le témoignage de toute notre reconnaissance et de tout notre respect.

À mon Maître, Juge et Directeur de Thèse,
Monsieur Le Docteur Lionnel GEOFFROIS,
Docteur en Oncologie Médicale,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et de me guider dans ce travail extrêmement enrichissant.

Au début de l'« aventure » et après plusieurs brainstormings balayant les sujets cliniques et moins cliniques, nous nous sommes finalement arrêtés sur un sujet plutôt biologique (bonne idée !). Car ce profil de travail a été pour moi un apprentissage bien au-delà de ce que j'aurais pu espérer.

Le chemin a été long mais Ô combien passionnant ! Ce travail a été éminemment constructif car il a nécessité l'élaboration complète d'une étude : le choix des anticorps, la réflexion sur les contraintes de temps, de moyens humains, de faisabilité technique, la prise en compte des aléas techniques, la sélection des sujets et des lames, la collaboration avec nos collègues pathologistes, etc… Un monde incroyable et exigent et pas totalement étranger pour moi puisque ce sujet avait été évoqué lors de mon année recherche à l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine.

J'ai ainsi énormément appris à vos côtés et vous remercie vivement de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail qui en valait la peine ! Un grand merci pour votre disponibilité, vos réponses quand j'en avais besoin, vos encouragements, votre expertise clinique et biologique pointue et surtout votre intérêt scientifique notamment pour la valorisation de cette étude. Elle aura été le fruit d'un travail d'équipe qui m'aura énormément apporté.

Travailler avec vous aura été un réel plaisir, nous connaissons tous votre implication auprès des internes, votre bienveillance, votre dévouement aux patients, votre rigueur.

Que ce travail multidisciplinaire soit l'expression de mon immense reconnaissance et de mon respect le plus profond.

À notre Maître et Juge,
Monsieur Le Docteur Gilles DOLIVET,
Docteur en Chirurgie de la Face et du Cou,
Responsable du Département de Chirurgie,

Vous nous faites l'honneur d'accepter de participer à ce Jury de Thèse et de juger notre travail.

Merci infiniment pour votre bienveillance, vos conseils, vos encouragements et votre réactivité aux questions et corrections qui m'ont beaucoup touchée. Vous m'aviez fait part autrefois de l'intérêt que vous portiez à la problématique chirurgicale des tumeurs ORL récidivant en territoire irradié. Je suis heureuse de pouvoir aujourd'hui vous en présenter les résultats, j'espère qu'ils vous satisferont !

Votre remarquable parcours et votre rigueur scientifique suscitent toute notre estime.

Recevez nos sincères remerciements pour votre intérêt pour cette thèse et notre grande admiration.

À Monsieur Le Professeur Jean-Louis MERLIN,
Directeur de la Recherche,
Responsable du Service de Biologie Moléculaire des Tumeurs,
Département de Biopathologie CHRU-ICL
CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine

Je vous présente mes vifs remerciements pour nous avoir soutenus et aidés à défendre notre projet de thèse d'exercice en médecine auprès des différentes instances de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, aboutissant à sa validation, notamment scientifique et financière.

J'en profite également pour renouveler mes remerciements pour avoir accepté de m'accueillir dans votre service pour la réalisation de mon stage en laboratoire dans le cadre de l'année recherche de mon Master 2. J'y ai découvert un monde totalement inconnu pour moi et passionnant, que j'ai pu apprendre à mieux comprendre dans une équipe très chaleureuse, stimulante et compétente ! Un grand merci aussi au Docteur Alexandre Harlé ainsi qu'aux techniciennes Marie Husson et Marie Rouyer pour leur précieux encadrement. J'en garde un excellent souvenir !

Enfin, merci pour vos conseils avisés (en plongée également !), votre grande bienveillance et votre humanité inconditionnelle qui mènent à des échanges très riches et productifs.

À Monsieur Le Docteur Xavier SASTRE-GARAU,
Chef de service du Laboratoire d'Anatomo-Pathologiste au Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil,

Comment débuter un paragraphe de remerciements à la hauteur du travail que vous avez accompli ? J'ai plusieurs idées, mais aucune ne me satisfait complètement !

Alors très simplement, merci infiniment de m'avoir apporté votre précieuse et incontournable expertise anatomopathologique lors de votre activité à l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Ce travail de thèse a nécessité une belle collaboration entre nos deux spécialités et je suis ravie d'avoir appris à vos côtés.

Merci d'avoir passé des heures à évaluer, lame après lame, l'expression de PD-L1, l'infiltration lymphocytaire, le statut p16. Vous avez pris beaucoup de votre temps par intérêt pour ce sujet et par curiosité scientifique, vous avez été disponible, critique, pertinent, toujours prêt à répondre à mes questions et même lors de moments plus difficiles, vous avez toujours poursuivi.

Veuillez recevoir l'assurance de ma haute estime et de mon plus profond respect.

À toute l'équipe du service d'Anatomo-Pathologie de l'Institut de Cancérologie de Lorraine,

Au Docteur Agnès Leroux, merci d'avoir accepté que cette étude ait pu se réaliser dans votre service et de m'avoir aidée à choisir l'anticorps anti-PDL1,

Au Docteur Jacques Thomas, un énorme MERCI pour m'avoir aidée à sélectionner les zones tumorales sur les photos d'IHC pour le comptage lymphocytaire, pour les fous rires dans le bureau du labo avec les autres, pour tes prouesses informatiques (pagination comprise !) et la blague des croquettes pour chien,

À Magali Lefebvre, merci de m'avoir guidée dans le cadre légal de ce travail, le recueil des consentements des patients, l'anonymisation des données, les interminables listings de dossiers…

À Pascale Thil et Anne Leclerc, nos deux techniciennes, pour tout leur travail technique et leur gentillesse, merci d'avoir accepté d'ajouter ce travail en plus du vôtre quotidien,

À Marina, qui m'a très gentiment cherché les blocs et lames dans le sous-bois !

À toute l'équipe du Département d'Oncologie Médicale de l'Institut de Cancérologie de Lorraine,

Aux médecins :

Au Docteur Céline Gavoille, Responsable du Département d'Oncologie Médicale, merci pour ton énergie (ultra)positive, ton humour et ton sens clinique hors pair !

Au Docteur Mathilde Deblock, pour ton amitié, ta présence, nos « chat-noir attitudes » (« pourquoi ce n'est qu'avec toi que ça arrive ?! ») et notre passion pour le chocolat ♥

Au Docteur Maria Rios, pour votre rigueur, votre rire et votre humour très communicatif !

Au Docteur Marie-Christine Kaminsky, pour votre originalité, vos tirages de manche et votre expérience,

Au Docteur Lionel Uwer, pour votre gentillesse, votre confiance et nos dialogues,

Au Docteur Yolanda Fernandez, pour ton soleil d'Espagne, ta bonne humeur et tes conseils,

Au Docteur Pierre Lehair, pour l'oncogénétique, votre sourire et vos infos « sport »,

Au Docteur Christelle Clément-Duchêne, pour votre confiance, pour nos conversations sur le monde, pour le partage de votre expérience,

Aux Docteurs Cyril Abdeddaim et Vincent Massard, mes anciens chefs de clinique ! Merci pour vos soutiens, les ptites blagues de chimio, Prostator et votre partage d'expérience !

Aux Docteurs Aurélien Lambert, Anne Kieffer et Camille Simon, nos chefs de clinique actuels, merci pour vos conseils, votre accompagnement, les verres et les cours d'onco. On vous a vu évoluer de co-interne à plus grand, dans la vie professionnelle et personnelle, à nous de prendre exemple maintenant !

Au Docteur Marie François, merci pour ton amitié et tes multiples petits gâteaux apportés de vacances « Maman » !

Aux équipes paramédicales :

Infirmières, aide-soignantes, ASH, kinésithérapeute, diététicienne, psychologue, cadres, bed manager.

À toute l'équipe du Service Interdisciplinaire de Soins de Support aux Patients en Oncologie (SISSPO) de l'Institut de Cancérologie de Lorraine,

Aux médecins :

Aux Docteurs Aline Henry, Nathalie Crétineau, Hubert Rousselot, Cécile Delattre, Étienne Duflot, Catherine Lamouille, Pierre Cornillon, merci de votre prise en charge conjointe à la nôtre, votre proximité des patients, votre écoute, votre apport riche en connaissance et en bienveillance. Le passage dans un service de soins palliatifs n'est pas évident, il marque, mais il forme l'esprit. Il est indispensable à tout oncologue en devenir, j'ai pour cela beaucoup appris à vos côtés : la valeur de l'existence surtout, et le soulagement des symptômes qui sont essentiels dans nos métiers. Merci de l'aide précieuse et de la force que vous apportez.

Aux équipes paramédicales :

Infirmièr(e)s, IDE de coordination, aide-soignantes, ASH, kinésithérapeute, diététicienne, psychologue, cadres, bed manager.

À tous les médecins avec lesquels j'ai eu la chance de travailler et qui ont contribué à ma formation,

Aux médecins du service d'Hématologie du CHU de Brabois du Professeur Feugier,

Au Docteur Caroline Serrier, ma première chef en tant qu'interne ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, grâce à toi le début de l'internat aura été moins dur, merci pour ton amitié, ta grande générosité, nos coups de stress dans les secteurs, notre entraide pour les prélèvements médullaires, les restos de stage ! Ce premier semestre aura été pour moi un des meilleurs souvenirs de mon internat car c'est dans la pression et l'urgence que l'on apprend à se connaître et à connaître les autres. Certaines situations marquent à vie, je n'oublierai jamais que la vie est si éphémère.

Aux Docteurs Tardy, Hulin, Ranta, Bologna, Bonmati, Perrot, Guerci, Michel, Roth-Guepin et D'Aveni, merci de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas d'interne, j'ai beaucoup appris à vos côtés et vous en remercie profondément.

Aux médecins du service de Pneumologie du CHU de Brabois du Professeur Chabot,

Au Professeur Chaouat, aux Docteurs Chamard, Tiotiu, Billon, Vaillant, Gomez, Guillaumot, Mercy, Kheir, Carstea, Michy et Perrin, merci de m'avoir offert un apprentissage intéressant et rigoureux, merci de m'avoir appris à mieux connaître la pathologie thoracique qui m'a grandement ouvert l'esprit.

Aux médecins du service de Radiothérapie de l'Hôpital Émile Durkheim à Épinal du Professeur Peiffert,

Au Docteur Jean-Christophe Faivre, merci de m'avoir consacré du temps pour l'apprentissage en radiothérapie et surtout de m'avoir intégrée dans des travaux et appris à travailler un article, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour l'apéro chez Recouvreur (cherché sous la pluie !),

Au Docteur Philippe Royer, merci pour le partage de tes vastes connaissances en radiothérapie, ta volonté de faire progresser l'autre, nos discussions sur les voyages dans la Zoé (50 minutes de conseils 1x/semaine, c'est productif !),

Au Docteur Véronique Beckendorf, merci pour votre encadrement et votre confiance,

Au Docteur Mihaï Levitchi, merci pour votre sympathie, votre partage d'expérience, nos conversations sur l'Europe et le monde au self d'Épinal !

Aux médecins du service d'Oncologie Médicale de la Polyclinique de Gentilly,

Au Docteur Dominique Spaeth, merci pour mon intégration dans votre équipe, pour le temps passé à me former et à me challenger, à nos discussions philosophiques au déjeuner, aux parties de badminton !

Au Docteur Célia Roemer-Bécuwe, pour ton amitié, ta douceur et tes compétences, bon vent pour la suite dans la merveilleuse région de Bretagne,

Au Docteur Fabien Brocard, merci pour ton encadrement, tes conseils et ton dynamisme,

Aux médecins du Centre de Lutte Contre le Cancer Léon Bérard de Lyon,

Aux Professeurs Jean-Yves Blay et Isabelle Ray-Coquard, un grand merci de m'avoir accueillie dans une équipe aussi chaleureuse et dynamique et intégrée dans un travail passionnant. Réaliser un interCHU était pour moi un incontournable dans notre spécialité, on y apprend beaucoup, on y rencontre énormément, on y évolue, on s'ouvre toujours plus.

Aux Docteurs Bachelot, Tredan, Dufresne, Heudel, Brahmi, Rochefort et Toussaint, merci pour votre précieux encadrement, votre approche scientifique et votre profonde gentillesse. Ce semestre a été extrêmement riche et je vous en remercie très sincèrement.

Aux médecins du Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss de Strasbourg,

Au Professeur Xavier Pivot, un grand merci de m'avoir accueillie dans votre Centre, j'y ai beaucoup appris et particulièrement en pathologie mammaire,

Au Professeur Thierry Petit, un grand merci également de m'avoir intégrée dans votre équipe, de vous être acharné à me transmettre vos connaissances chaque semaine en consultation, de votre accueil chaleureux,

À toute l'équipe d'Oncologie Médicale, de Chirurgie et d'Imagerie Médicale : aux Docteurs Demarchi, Borel, Leblanc, Burgy, Carinato, Ben Abdelghani, Belletier, Schuster, Azemar, Kalish, Fischbach, Schott, Frasie, Chiappa, Sirlin, Bimboes, Wagner, Hild et Baeza, j'ai énormément apprécié travailler à vos côtés, avec l'apprentissage supplémentaire en imagerie et la participation au bloc opératoire, ma vision d'oncologue médicale est toujours plus complète !

À tous les Enseignants et Étudiants du Master 2 de l'IGR « Biologie Santé », Université Paris Sud, au Docteur François Dautry son responsable, merci pour l'incroyable expérience de découverte du monde de la Science ! Se remettre sur les bancs de fac n'est pas chose facile, mais qu'est-ce qu'on y gagne ! Toute une année à vous côtoyer, toute une année à s'échanger nos mails, nos idées, nos parcours, nos pensées. Apprendre à connaître les outils de demain est une étape incontournable en oncologie pour mieux appréhender le tourbillon des nouveautés. Cette année était incroyablement riche !

À Julia Salleron, notre statisticienne, notre héroïne, notre brillante scientifique. Merci pour tes précieux conseils, tes heures passées sur ce travail de thèse, ton dynamisme infaillible, ton humour et ta personnalité si attachante,

À tous mes co-internes ces six dernières années !!! ♥ ♥

À l'Institut de Cancérologie de Lorraine :

À mes co-internes d'Oncologie médicale !!

À Julie, merci pour ton amitié, nos soirées sushis, ce semestre d'hdj passé ensemble (j'ai le souvenir du très bon kouglof de Céline comme gâteau d'anniversaire !), nos partages de doutes et de confiance, nos cours de cuisine avec Émilie,

À Mathilde C2C, pour ton soutien, ta confiance, tes plats tahitiens à tomber (à quand le prochain !), ton amitié, nos discussions sur la vie,

À Natacha, à ton dévouement aux autres, tes combats pour nous tous, à ton dynamisme légendaire,

À mes autres compagnons de promo actuels : JBA notre N°1 de squash en titre et brillant enseignant, **Laurène** la déjà-diplômée, **Chloé** la jeune maman,

Aux plus « anciens », Charlotte pour ton humour et ton optimisme perpétuel, **Delphine** pour ton soleil du Sud, **Marie** pour tes conseils de thèse, **Imane** pour ta gentillesse,

Aux plus « jeunes » mais qui grandissent (très) vite, Simon pour ta « cool attitude », **Guillaume** pour tes techniques d'approche à l'italienne, **Théo** pour ta grande empathie, **Camille** pour ton positivisme constant, **Albane** notre championne sportive, **Brunhilde** la voyageuse invétérée, **Lauriane** pour ta gentillesse, **Edwige** pour ton sourire,

À mes co-internes de Radiothérapie,

Aux « anciens » : Myriam, Maria, Julien, Nathalie, Thomas,

À Anaïs, depuis le premier semestre d'hématologie… à tous les Tonus, au secteur-qui-rit et au secteur-qui-pleure d'hémato, à notre troupe de « Vieux »,

À Mathilde C, Aude, Paul, Nicolas D, Nicolas M, Sarah, Marie, merci de votre présence !

Au service d'hématologie du CHU de Brabois :

À Marion, mon premier contact à Nancy (merci de m'avoir indiqué la porte de l'amphi pour les choix de stage, tu tombais bien), une co interne hors pair et devenue une amie précieuse, merci pour ta générosité légendaire, ta brio, nos discussions tardives devant des mangas ou GOT, à notre départ à l'aventure japonaise ! Itadakimasuuuuu 

À Samantha, Kévin et Rémy, pour votre amitié précieuse encore une fois démarrée en hémato, il faut croire que ce stage est pourvoyeur ! Merci pour les verres, les pauses café, les anniversaires, les Noëls passés ensemble, le squat du balcon de l'internat à réfléchir sur nos vies, à nos super vacances dans les Alpes et en Italie (j'essaie de poursuivre le ski depuis !), vous êtes de magnifiques personnes.

À Lev, mon co-interne russe, merci pour ta personnalité atypique que j'adore !

À Chichi, pour tes bottes de western, pour ton raisonnement binaire face à un Homo Sapiens de sexe féminin, pour ta doudoune achetée à ton arrivée de Marseille,
À tous les autres : Lauriane, Anne-Bé, Luciane, Fatima, Julien

Au service de pneumologie du CHU de Brabois :

À Timothée, co interne de pneumologie au départ puis naissance d'une belle amitié ensuite, c'est dans la douleur qu'on forge ses amis ^^ Force et Honneur comme on disait !! Merci d'avoir été là dans les moments où il fallait, merci d'être toujours là. Je trinque à nos fous rires (souvent nerveux) de 22H à potasser les dossiers du CHU, à ta volonté de toujours apprendre plus, à ton respect des autres, à ta clairvoyance sur le monde, à ton sens critique.
À Dimitri, pour nos discussions au soleil de midi en radiothérapie, pour tes conseils,

Au Centre de Lutte Contre le Cancer Léon Bérard de Lyon :

À mes p'tits Lyonnais ! Valoche, Titi, Max, Maéva et tous les autres ! Merci pour ce semestre inoubliable, les soirées post CLB, les restos chinois du bord de route, l'accrobranche avec ma petite Valentine, les apéros dans les péniches du bord du Rhône, merci de m'avoir aussi bien accueillie, vous êtes géniaux ♥
À mes deux p'tits Lyonnais-externes Romain et Mathilde, vous grandissez trop vite ! Je suis ravie d'avoir pu vous connaître, la vie est parfois faite de belles rencontres, je vous dis à très bientôt,

Au Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss de Strasbourg :

À Gueck Heang ma co-interne cambodgienne, pour ton énergie et ta gentillesse,
À Chloé-Line pour nos brioches et bretzels contre le radiateur en transmission de garde,
À Joffrey mon ORL préféré,
Isabelle pour ton humanité,
Et tous les autres !

À ma famille, mes Fondations, ma Force,

Cette thèse, elle est pour vous.

À mes grands-parents, pour les valeurs qu'ils nous ont léguées.

Si la vie nous a transmis un peu de votre courage et de votre rigueur, alors Merci.

À Mamie Millie, mon Étoile

À ton immense courage quand adolescente tu pars seule à bicyclette demander aux Allemands du camp voisin la libération de ton papa retenu en camp de travail. À ton amour pour les lettres et les langues, à ton ouverture d'esprit, à ton indépendance, à ta vision de l'Europe et de l'avenir. Merci de tout ce que tu m'as apporté et inculqué, nos racines, nos valeurs. Tu seras à jamais avec moi.

À Papi, mon Unique

À ton incroyable ténacité quand la guerre interdit de parler français ou alsacien et te force à ramper dans la boue et dans la nuit. À ton extrême bienveillance, à ton humanité, à ton esprit critique, à ton partage des connaissances, à ta valeur pour le travail acharné, à tes petits surnoms alsaciens pour chacun de nous. Tu m'avais dit avant de partir qu'un de tes regrets serait de ne pas pouvoir assister à ma thèse, mais vois-tu Papi, tu y seras, à la thèse de ta « Missele ».

À Mamie Mickie, ma Fierté

À ta rage de vivre quand tu survis aux bombardements de Strasbourg et te fais raccompagner sur le porte-bagages vélo d'une inconnue couverte de poussière de bâtiment. À ton inconditionnelle gentillesse et générosité pour tous, à ton éternel souci des autres, à ta mémoire incroyable, à tes conseils avisés et tes valeurs transmises, à tes recettes de cuisine ! Merci pour tout Mamie, si nous sommes là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous.

À Papi Pierre, mon Quatrième

À ta rigueur quand tu travailles seul ton bac dans un grenier. On m'a tant parlé de toi que j'ai l'impression de t'avoir toujours connu. Alors, à ta profonde gentillesse, à ton amour pour les Sciences, à ton grand cœur. J'aurais adoré te connaître.

À mes parents, mes Fondations, merci de m'avoir accompagnée non seulement pendant mon cursus médical mais surtout depuis le début de ma vie. Si je ici aujourd'hui, c'est grâce à vous, je vous dois tout.

À ma sœur Marine, la Femme de ma vie, ma Bolette chewie ! La plus belle, la plus intelligente, la plus créatiiiive ! Un gros schmoutz pour Bolette qui m'a suivie toutes ces années et sans laquelle je ne pourrais vivre ♥

À Cédric, mon Chou, mon futur mari, merci d'être à mes côtés chaque jour. Depuis le jour où nous nous sommes rencontrés, je savais que nos vies seraient communes. Merci d'être la personne magnifique que tu es, généreuse, prévenante, à l'écoute. J'ai beaucoup de chance de t'avoir ♥

À toute ma famille d'Alsace, de Paris et de Londres, oncles, tantes, parrain, marraine, cousins, cousines, merci de m'avoir toujours soutenue,

À ma belle-famille, à Laetitia, merci de m'avoir accueillie dans votre famille et pour tout ce que vous avez fait et faites toujours pour moi,

À mes amis, mes ressources,

À ceux connus sur les bancs de fac de Strasbourg,

À Alex, pour ton esprit critique, ton courage, ton évolution, pour l'amitié qui nous lie (et la Kriek bien sûr), **Lucile** pour ton intelligence et nos discussions sur l'avenir, **Diane** pour nos rires à la fac et ton esprit pratique, **Anne** pour ta gentillesse profonde et ton humanité, **Marion** pour ton humour et ton chat en os,
À Anne-Claude, pour toutes ces années à se côtoyer d'un étage à l'autre quand on était petites et sans vraiment se connaître, il aura fallu longtemps avant qu'on ne se retrouve ! Merci pour ton amitié et ton soutien indéfectible,
À Suzanne, ma covoitureuse et mon homologue alsacien, merci pour ton petit accent qui me rappelle nos villages, merci pour ton amitié, ta fidélité et ton authenticité,
À Delphine C, te souviens-tu quand nous avons visité Nancy pour la première fois ? Depuis, il s'en est passé du temps… j'ai un vague souvenir de palmier gonflable dans ma douche en première année ! Merci pour ton amitié et ta gentillesse,
À tous les autres, Sandra ma partenaire d'histo, **Yvan, Élodie, Anne W.**

Aux amis d'enfance,

À Charlotte, te voilà bientôt jeune maman alors qu'il n'y a que quelques années, nous planchions sur les DM de maths et d'anglais au lycée… le temps passe si vite et je suis ravie que nous soyons toujours côte à côte pour te voir évoluer dans la vie,
À Lucie, ma plus vieille amie ! Depuis nos 7 ans… Merci pour ton amitié, nos virées en Italie, nos sorties « filles », ce sentiment d'être soi-même,
À Camille GB, la voisine de toujours ! Merci pour ton soutien et tes blagounettes,
À Marion, Bruno, Mylène, merci d'être là,

À tous les autres !

À Elsa, ma compatriote de ski, **Mikaël** le kartingman, **Philippe** pour nos fous rires au labo, **Émilie** pour nos cours de badminton et tes séances de cuisine, **Simon V, Fabien, Maddy et Bouchra** mes sous-loc, **Charlie, Léa** ma super coloc' de Lyon, **Cécile** la voisine de palier de Lyon, **Médarine, Lucie W** ma super (et dernière) co-interne, j'aurai tenu jusqu'au bout pour éviter le massage de pieds, **Thomilie** pour votre générosité et votre créativité sans limites !, **Jessica et Andréa** pour notre complicité de labo.

« Nous rions, nous trinquons. En nous défilent les blessés,
Les meurtris : nous leur devons mémoire et vie. Car vivre,
C'est savoir que tout instant de vie est rayon d'or
Sur une mer de ténèbres, c'est savoir dire merci. »

François Cheng, *Enfin le Royaume*

SERMENT

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.
Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

TABLE DES MATIÈRES

PRÉSENTATION DU SUJET ……... 32

I. LES CANCERS TÊTE ET COU ……..... 33

1. Définition ……... 33

2. Épidémiologie ……... 33

3. Anatomopathologie ……. 33

3.1. Type histologique ……... 33

3.2. Immunohistochimie (IHC) ……. 34

3.2.1. Infiltration lymphocytaire tumorale (TILs) ……... 34

3.2.2. Programmed death-1 (PD-1) et Programmed death ligand-1 (PD-L1) ……. 34

3.2.3. P16 et *Human Papilloma Virus* (HPV) ……. 35

3.3. Génétique et moléculaire …… 35

4. Principes de la prise en charge thérapeutique actuelle …… 36

4.1. Classifications TNM ……... 36

4.1.1. Classifications TNM 2009 7^{e} édition et TNM 2018 8^{e} édition …….. 36

4.1.2. Classifications TNM 2018 8^{e} édition …….. 37

4.2. Prise en charge des CETEC localisés et localement avancés ……. 37

4.3. Prise en charge des CETEC en rechute ou métastatiques ……... 38

5. Cas particulier des tumeurs en territoire irradié …… 39

5.1. Pronostic et traitement …… 39

5.2. Anatomopathologie et biologie moléculaire ……... 39

5.3. Phénomène d'hyperprogression tumorale …….. 40

6. Nouvelles perspectives thérapeutiques ……..…… 40

II. DÉVELOPPEMENT DES INHIBITEURS DE CHECKPOINTS IMMUNITAIRES EN CANCÉROLOGIE …..... 41

1. Le système immunitaire …….. 41

1.1. La réponse immunitaire …….. 41

1.1.1. Immunité innée …….. 41

1.1.2. Immunité adaptative …….. 41

1.1.2.1. La réponse immunitaire adaptative …… 41

1.1.2.2. L'activation lymphocytaire T cytotoxique et ses freins …….. 42

1.2. Les points de contrôles immunitaires ou « checkpoints immunitaires » …… 43

1.2.1. Le point de contrôle immunitaire CTLA-4 …… 43

1.2.2. Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 …… 43
2. L'immunoediting tumoral : la théorie des 3 E ……. 44
2.1. Phase d'Élimination …… 44
2.2. Phase d'Équilibre …… 45
2.3. Phase d'Échappement tumoral …… 45
3. Le développement de l'immunothérapie ……... 46
3.1. Le changement de paradigme …… 46
3.1.1. Cibler la tumeur …… 46
3.1.2. Cibler le système immunitaire : le concept de l'immuno-oncologie ……. 46
3.1.3. L'intégration du microenvironnement tumoral …… 47
3.1.3.1. Description du microenvironnement tumoral …… 47
3.1.3.2. Description des phénotypes tumoraux …… 48
3.2. L'exemple du checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 …….. 49
3.2.1. Échappement tumoral par inhibition des lymphocytes T CD8+ ……... 49
3.2.2. Réactivation des LT CD 8+ par les anticorps anti-PD-1/PD-L1 ……... 49
3.2.3. Les inhibiteurs de ce checkpoint immunitaire (ICI) …….. 50
3.2.3.1. Spectre de sensibilité des tumeurs aux ICI …… 50
3.2.3.2. Panel thérapeutique …… 51
3.2.3.3. Gestion d'un nouveau profil de toxicité …….. 51
3.2.3.4. Sélection des patients et biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie.. 52

III. DÉVELOPPEMENT DES INHIBITEURS DE CHECKPOINTS IMMUNITAIRES DANS LES CETEC RÉCIDIVANTS/MÉTASTATIQUES EN 2e LIGNE THÉRAPEUTIQUE …… 54
1. Deux principales études après échec d'un sel de platine …… 54
1.1. Étude Checkmate-141 et Nivolumab …….. 54
1.2. Étude Keynote-040 et Pembrolizumab ……... 55
2. Bien d'autres études …… 55

IV. OBJECTIFS DE CE TRAVAIL ET ASPECTS INNOVANTS …..... 56
1. L'étude du profil biologique des tumeurs en territoire irradié …….. 56
2. L'évaluation des mécanismes d'hyperprogression tumorale sous ICI ……... 57
3. L'observation d'un rationnel pour le développement de stratégies d'introduction de l'immunothérapie en périopératoire ou de traitements associatifs …… 57

ARTICLE …… 58

CONCLUSION ET PERSPECTIVES …….. 92

I. CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE SUR LES TERRITOIRES IRRADIÉS ……. 93

II. NOUVELLES PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES ……. 93

1. Dans différentes situations carcinologiques …….. 93

2. Pour tester différentes associations thérapeutiques ……. 94

III. RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RÉPONSE À L'IMMUNOTHÉRAPIE …… 95

IV. CHALLENGES TECHNIQUES ……... 95

1. Les limitations techniques ……... 95

2. La nécessité de standardiser ……... 95

3. L'interprétation des données …….. 96

BIBLIOGRAPHIE …….. 97

ANNEXES ……. 103

RÉSUMÉ

PRÉSENTATION DU SUJET

I. LES CANCERS TÊTE ET COU

1. Définition

Les cancers de la tête et du cou touchent des régions anatomiques bien définies. Ces tumeurs peuvent être classées en quatre groupes différents :

a. *Oropharynx, cavité buccale, larynx et hypopharynx* : Carcinomes Épidermoïdes de la Tête et du Cou (CETEC)
b. *Cavités nasales, paranasales et nasopharynx*
c. *Glandes salivaires principales et accessoires*
d. *Adénopathie(s) sans primitif connu*

Ce travail s'intéresse au premier groupe car ce sont les tumeurs les plus fréquentes. Les tumeurs nasosinusales et des glandes salivaires présentent quant à elles une épidémiologie et une prise en charge thérapeutique différentes, elles ne seront donc pas traitées dans ce travail, de même que les adénopathies sans primitif tumoral retrouvé.

2. Épidémiologie

Les CETEC représentent la 6^{e} cause la plus fréquente de cancer, soit environ 6% des cancers toutes causes confondues. Ils sont responsables de 1 à 2% des décès par cancer [1, 2]. Les données de l'Agence Nationale de Santé Publique française décrivent des cancers largement évitables car les principaux facteurs de risque sont le tabac, la consommation d'alcool et l'infection au *Human Papilloma Virus* (HPV). Chez les hommes, l'incidence des CETEC a diminué de façon très importante depuis 1980 contrairement aux femmes, chez qui l'incidence augmente en raison d'une hausse du tabagisme [3].

3. Anatomopathologie

3.1. Type histologique

La grande majorité des cancers de la région tête et cou sont des carcinomes épidermoïdes ou CETEC.
Les facteurs pronostiques recherchés, sur pièce opératoire, par le pathologiste sont :

- Le type histologique
- Le grade
- La profondeur de l'envahissement
- L'infiltration tumorale des marges de résection (carcinome infiltrant, carcinome in situ ou dysplasie sévère) et la distance entre les berges d'exérèse et le carcinome infiltrant < 5 mm

- L’envahissement ganglionnaire : nombre d’adénopathies et rupture capsulaire
- Les emboles lymphatiques, l’infiltration vasculaire et périnerveuse
- L’infection par HPV (pour les tumeurs oropharyngées)

3.2. Immunohistochimie (IHC)

3.2.1. Infiltration lymphocytaire tumorale (TILs)

Les deux éléments d’importance fondamentale dans la réponse immunitaire antitumorale sont l’infiltration lymphocytaire de type T CD8+ cytotoxique (CD8+ *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* ou TILs) et l’inhibition des régulateurs négatifs des checkpoints immunitaires, le plus connu étant l’expression de *Programm cell death-ligand-1* (PD-L1) [4]. Les lymphocytes T (LT) sont porteurs du récepteur T et peuvent être repérés par leur marquage CD3. La particularité des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) est d’avoir souvent peu d’infiltration lymphocytaire, une mauvaise activité des cellules tueuses naturelles (NK), une présentation antigénique médiocre et une infiltration plus importante de LT régulateurs (Treg).

3.2.2. Programmed death-1 (PD-1) et Programmed death ligand-1 (PD-L1)

- Expression physiologique de PD-1/PD-L1

La molécule PD-1 est exprimée par les LT activés après une exposition chronique à l’antigène dans les tissus périphériques. Cette protéine modulatrice du système immun est également exprimée à la surface de plusieurs autres cellules inflammatoires, comme les lymphocytes B, les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques [5]. Elle est également exprimée par de nombreuses cellules non immunitaires dont les cellules musculaires, les hépatocytes et les cellules endothéliales [6, 7].
En cas d’inflammation, son expression peut être déclenchée par plusieurs cytokines, en particulier l’Interféron Gamma (IFNγ) [8, 9]. Il s’agit d’une molécule de costimulation inhibitrice, stigmate d’une activation des LT. Physiologiquement, certains LT seront ainsi inhibés pour éviter une activation délétère, notamment de type auto-immun.
PD-1 interagit avec ses ligands PD-L1 et *Programmed death ligand-2* (PD-L2) [10–12]. La voie PD-1 est importante dans l’épuisement lymphocytaire T car la persistance de l’expression de PD-1 entraîne leur exhaustion, menant ainsi à la perte de leur activité cytotoxique [13]. À l’instar des tissus tumoraux avec une importante infiltration lymphocytaire, ceux exprimant PD-L1 constituent le terrain le plus favorable à une réponse immunitaire antitumorale [4].

- Analyse immunohistochimique des CETEC

L'expression de PD-L1 des CETEC récidivants ou métastatiques est variable selon le seuil utilisé. Par exemple, dans l'étude Checkmate-141, nous observions une expression de PD-L1 sur cellules tumorales pouvant aller jusqu'à 50% dans le bras standard avec un seuil ≥1% [14].

3.2.3. P16 et *Human Papilloma Virus* (HPV)

- Biomarqueur indirect du statut HPV

Les tumeurs oropharyngées liées à HPV voient leur incidence augmenter [15], celles-ci sont de meilleur pronostic en cas de statut HPV positif [16], possiblement en raison d'une infiltration lymphocytaire T et B plus importante [17, 18]. La présence d'HPV peut être détectée indirectement par l'expression de la protéine p16 à la surface cellulaire. En effet, la protéine p16 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et son expression est strictement contrôlée dans les cellules saines. Elle constitue un frein à la prolifération cellulaire en inhibant les Cyclines Dépendantes Kinases 4 et 6 nécessaires à la transition en phase G1-S. Lors d'une infection persistante à HPV à haut risque (sérotypes 16 et 18), la protéine E7 produite par le virus HPV exerce une activité transformante en inhibant la protéine suppresseur de tumeur issue du gène du Rétinoblastome [19]. La protéine p16 est donc un biomarqueur témoignant indirectement de la présence du virus HPV.

- Évaluation immunohistochimique

La détermination du statut HPV utilise la protéine p16 comme marqueur de substitution dont l'analyse en IHC est bien codifiée. Elle nécessite une coloration p16 positive forte et diffuse dans les noyaux et le cytoplasme dans plus de 70% des cellules tumorales. En cas de doute, une autre méthode doit être utilisée comme la détection de l'Acide DésoxyriboNucléique du Papillomavirus par Polymerase Chain Reaction [20] plus sensible et surtout plus spécifique.

3.3. Génétique et moléculaire

Les étiologies des mutations retrouvées sont diverses et contrastent ainsi avec certaines pathologies comme les leucémies où les driver oncogéniques semblent peu nombreux [21]. Le paysage mutationnel a été décrit par Alexandrov et al en 2013 dans la Revue Nature. La prévalence des mutations somatiques est élevée, situant les CETEC en 9^{e} position derrière le mélanome et les cancers pulmonaires qui présentent la plus forte prévalence en raison d'une exposition mutagénique chronique (les rayons ultraviolets pour le premier et le tabac pour les seconds) (Figure 1). Les signatures des processus mutationnels des CETEC concernent l'âge (Signature N°1B), les anomalies de la famille des protéines APOBEC (Signature N°2), le tabac (Signature N°4) et les rayons ultraviolets (Signature N°7) (Annexe 1) [22]. De plus, les CETEC présentent souvent des altérations cytogénétiques comme

des mutations, amplifications, délétions ou altérations chromosomiques [23], ainsi qu'une immunosuppression locale secondaire à l'infiltration de cellules immunosuppressives telles que les macrophages associés aux tumeurs ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) [24, 25].

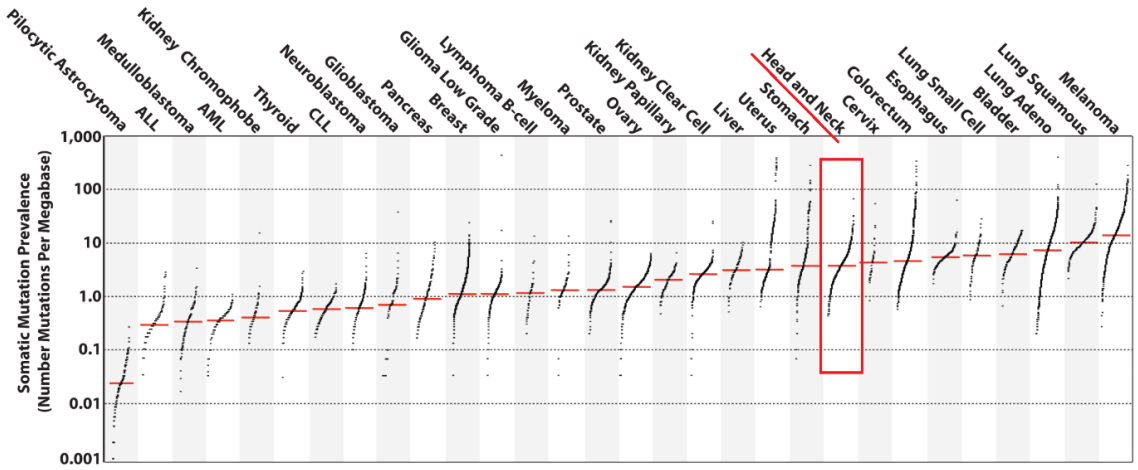


Figure 1 : Prévalence des mutations somatiques dans différents types tumoraux. L'axe vertical représente le nombre de mutations par mégabase. L'axe horizontal représente les différents types de cancer rangés en ordre croissant du nombre médian de mutations somatiques (traits rouges) [22].

4. Principes de la prise en charge thérapeutique actuelle

4.1. Classifications TNM

4.1.1. Classifications TNM 2009 7e édition et TNM 2018 8ème édition

Les CETEC sont des maladies à évolution locale et régionale dans la grande majorité des cas. Le stade métastatique est rare au diagnostic initial. Après réalisation d'un examen clinique orienté en otorhinolaryngologie (ORL) (nasofibroscopie et panendoscopie des VADS, d'une imagerie par résonance magnétique ORL et d'un bilan d'extension par scanner ORL et thoracique et tomographie par émission de positrons, la tumeur est classée par stade (I à IV) (Figure 2) [26]. La classification TNM 2009 7e édition était jusqu'à présent la classification de référence avant son actualisation menant à la nouvelle classification TNM 2018 8e édition.

Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stage IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stage IVB	Tb	Any N	M0
	Any T	N3	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1

Figure 2 : Catégories TNM 2009 et 2018 pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou HPV négatifs. D'après Grégoire et al, Ann Oncol 2010 [26].

4.1.2. Classifications TNM 2018 8e édition

L'Union Internationale Contre le Cancer a rendu disponible une huitième version de la classification TNM des cancers. Cette nouvelle classification intègre deux principaux éléments pour les CETEC : l'extension extra-ganglionnaire pour les tumeurs ou adénopathies HPV négatives et le statut HPV. Trois nouvelles classifications ont été ajoutées : le cancer de l'oropharynx HPV positif, les carcinomes cutanés de la tête et du cou et les adénopathies cervicales métastatiques sans primitif tumoral retrouvé (Figure 3). De plus, de nouveaux facteurs prédictifs ont été intégrés : la profondeur de l'infiltration tumorale dans les cancers de la cavité buccale ainsi que l'extension extra-capsulaire des métastases ganglionnaires régionales [27]. Cette nouvelle classification a ainsi été utilisée dans ce travail.
On distingue ainsi d'une part les tumeurs localisées (stades précoces ou stades localement avancés) et d'autre part les situations de rechute tumorale ou de maladie métastatique.

Classification de la tumeur primitive (T)* pour les cancers de l'oropharynx p16(–) et p16(+)

* Les classifications clinique (cT) et pathologique (pT) sont identiques.
** La classification T des cancers de l'oropharynx p16 – n'a pas été modifiée.
*** Les classifications T1, T2 et T3 sont identiques pour les deux entités.
**** L'extension à la surface linguale de l'épiglotte de tumeurs primaires de la base de langue ou de la vallécule ne constitue pas une invasion du larynx.
En rouge: modifications par rapport à la 7e version de la classification TNM.

Oropharynx p16(–) **		Oropharynx p16(+)	
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension	T1	idem***
T2	Tumeur dont la plus grande dimension est > 2 cm et ≤ 4 cm	T2	idem***
T3	Tumeur dont la plus grande dimension est > 4 cm ou extension à la surface linguale de l'épiglotte	T3	idem***
T4a	Tumeur envahit une des structures suivantes: larynx****, musculature profonde/extrinsèque de la langue (génioglosse, hyoglosse, palatoglosse, et styloglosse), muscle ptérygoïdien médian, palais osseux, ou mandibule	T4	Tumeur envahit une des structures suivantes: larynx****, musculature profonde/extrinsèque de la langue (génioglosse, hyoglosse, palatoglosse, et styloglosse), muscle ptérygoïdien médian, palais osseux, mandibule, muscle ptérygoïdien latéral, apophyses ptérygoïdes, paroi latérale du nasopharynx, base du crâne; ou engaine l'artère carotide
T4b	Tumeur envahit une des structures suivantes: muscle ptérygoïdien latéral, apophyses ptérygoïdes, paroi latérale du nasopharynx, base du crâne; ou engaine l'artère carotide		

Classification des adénopathies régionales clinique (cN) et pathologique (pN) pour les cancers de l'oropharynx p16(+)*

En rouge: modifications par rapport à la 7e version de la classification TNM.

cN		pN	
cNX	Atteinte ganglionnaire non évaluable	pNX	Atteinte ganglionnaire non évaluable
cN0	Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux	pN0	Pas d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
cN1	Métastases homolatérale unique ou multiples toutes ≤ 6 cm	pN1	1 à 4 métastases ganglionnaires
cN2	Métastases controlatérales ou bilatérales toutes ≤ 6 cm	pN2	≥ 5 métastases ganglionnaires
cN3	Métastase(s) > 6 cm		

Figure 3 : Nouvelle classification TNM 2018 8e édition pour les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx HPV positifs. Les modifications par rapport à la classification TNM 2009 7e édition sont en rouge. D'après Lambiel et al, Rev Med Suisse 2017 [27].

4.2. Prise en charge des CETEC localisés et localement avancés

- *Prise en charge pluridisciplinaire* : La stratégie thérapeutique doit toujours s'effectuer dans le cadre d'une prise en charge pluridisciplinaire associée aux soins de support en faisant intervenir notamment les équipes d'algologie, de nutrition, d'odontologie et d'addictologie chez des patients présentant souvent de nombreuses comorbidités cardiovasculaires, un état de dénutrition et des conduites addictives alcoolotabagiques [28].

- *CETEC localisés* : en France, le gold standard est la chirurgie associée à la radiothérapie adjuvante si la tumeur est opérable. Une chimiothérapie est réalisée concomitamment à la radiothérapie adjuvante en cas de facteurs histopronostiques défavorables (rupture capsulaire, marges positives) [29, 30]. Le seul schéma validé est le Cisplatine (100mg/m2 J1-J22-J43 de la radiothérapie) [31]. En cas de tumeur du larynx ou de l'hypopharynx, nécessitant une chirurgie non conservatrice une préservation laryngée par chimiothérapie d'induction suivie d'une radiothérapie externe si la réponse est supérieure à 50% peut être proposée [26, 32].

- *CETEC localement avancés* : pour les tumeurs non accessibles à une chirurgie carcinologique, le traitement standard repose sur une radiochimiothérapie concomitante exclusive privilégiant une chimiothérapie à base de Cisplatine ou l'utilisation d'un anti-*Epidermal Growth Factor* ou EGFR (Cétuximab) [33].

4.3. Prise en charge des CETEC en rechute ou métastatiques

- *CETEC récidivants* : ils sont une cause de morbidité très importante impactant fortement la survie à long terme. Dans les deux tiers des cas, ces rechutes surviennent dans les deux premières années après la fin du traitement initial. La chirurgie de sauvetage est le traitement de référence. Si la chirurgie de sauvetage ne peut être réalisée, une réirradiation avec ou sans chimiothérapie (protocole VOKES) peuvent être proposées, celui-ci pouvant également être proposé en adjuvant [34]. En cas d'impossibilité, une radiothérapie ou une chimiothérapie palliative est alors indiquée [26].

- *CETEC métastatiques* : le traitement de référence est la chimiothérapie palliative. Le traitement standard en 1ère ligne est l'association de sels de platine, du 5-fluorouracile (5FU) et du Cétuximab en sélectionnant les patients en bon état général. Le schéma utilisé est celui de l'essai clinique de phase III EXTREME (Cisplatine 100mg/m2 J1, 5FU 100mg/m2/j J1-J4, Cétuximab 250mg/m2 J1,J8,J15 avec dose de charge à 400mg/m2). Cette étude a démontré une amélioration significative de la médiane de survie globale (passant de 7.4 mois à 10.1 mois) ainsi que de la médiane de survie sans progression (passant de 3.3 mois à 5.6 mois) avec un taux de réponse objective (TRO) de 36% [35]. En deuxième ligne thérapeutique et plus, la polychimiothérapie n'a pas montré de bénéfice en survie, le standard est donc une monochimiothérapie (méthotrexate, taxanes, cisplatine, …). Les TRO restent faibles, allant de 4% pour le Paclitaxel à 24% pour la Capécitabine [36]. La monochimiothérapie de 2^{e} ligne n'améliore pas la survie globale et obtient des résultats très modestes avec une PFS aux alentours de 5 mois[37].

5. Cas particulier des tumeurs en territoire irradié

5.1. Pronostic et traitement

Les CETEC survenant en territoire précédemment irradié et non accessibles à un traitement local, qu'il s'agisse d'une récidive ou d'une seconde localisation, ont un pronostic sombre avec une survie globale médiane < 1 an en première ligne thérapeutique [14, 35, 38–40]. Peu d'options thérapeutiques sont à notre disposition, essentiellement en raison d'un antécédent d'irradiation de la région atteinte, d'une chirurgie de réalisation difficile, de conduites addictives, d'un contexte social pouvant être compliqué et d'un état général souvent altéré [41].

Aujourd'hui, le traitement standard pour les patients opérables et en bon état général est la chirurgie de sauvetage, mais elle conduit à un fort taux de rechutes locorégionales pouvant aller jusqu'à 34% des patients dans la série de Tan et al. [38, 39, 42].

Les tumeurs survenant en territoire déjà irradié posent la question de la possibilité de réirradiation en postopératoire ou d'emblée. Cette démarche est possible mais n'est pas un standard pour ces tumeurs à évolution rapide et fréquemment chimio et radiorésistantes. Deux grandes séries ont étudié en 2001 et 2006 les modalités de réirradiation postopératoire avec chimiothérapie concomitante. Aujourd'hui, le protocole le plus utilisé est le protocole Vokes (5FU 800 mg/m2 J1-5, Hydréa 2 comprimés 2H avant la séance, 1 comprimé 10H après, 6 cycles, traitement une semaine sur 2) avec une très bonne tolérance immédiate mais au prix de complications tardives plus fréquentes, notamment des fibroses de grade 2-3 [43, 44].

Enfin, le bouleversement récent secondaire au développement de l'immunothérapie, en particulier les inhibiteurs de checkpoints immunitaires (ICI), ont redonné de l'espoir pour les CETEC en récidive ou métastatiques, démontrant un gain en survie globale de 30% pour le Nivolumab (essai Checkmate 141) [14, 45] et de 20% pour le Pembrolizumab (Keynote-040) [40, 45]. L'entrée de l'immunothérapie dans les stratégies thérapeutiques donne lieu à une modification profonde des séquences de traitement comme les associations avec la radiothérapie ou la chimiothérapie.

5.2. Anatomopathologie et biologie moléculaire

Il a été démontré que le blocage des freins des checkpoints immunitaires PD-L1 par les ICI et les lymphocytes CD8+ infiltrant les tumeurs (TILs CD8+) sont d'une grande importance dans la réponse immunitaire antitumorale [4]. Les traitements anticancéreux peuvent avoir une incidence sur la nature du microenvironnement tumoral. En effet, l'efficacité des thérapies ciblées, de la radiothérapie et de la chimiothérapie n'impliquent très certainement pas que leur action cytotoxique ou cytostatique directe, mais met aussi en jeu leur effet immunogénique antitumoral [46–48]. Le paysage immunologique de tumeurs survenant dans une région prétraitée reste cependant peu connu.

La raison principale du manque de données disponibles est qu'aucun essai clinique randomisé évaluant les ICI n'est actuellement stratifié sur les traitements antérieurs réalisés. Certains

investigateurs ont cependant d'ores et déjà décrit la complexité des altérations radio- induites, des facteurs de croissance et des cytokines profibrotiques et proangiogéniques [49, 50].
L'expression des TILs CD3+ et CD8+ et de PD-L1 reste ainsi à déterminer et pourrait, si elle était moins importante, favoriser la stratégie d'introduction plus précoce des ICI dans les futures séquences thérapeutiques, comme cela a été évalué dans les études Keynote-048 [51, 52], PembroRad (Clinical Trial NCT02707588), Keynote-412 (Clinical Trial NCT03040999) et REACH (Clinical Trial NCT02999087).

5.3. Phénomène d'hyperprogression tumorale

Le phénomène a été décrit pour la première fois début 2017 et implique une progression tumorale très rapide après instauration d'un traitement par anti-PD-1/PD-L1. Une équipe de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) décrit un phénomène d'hyperprogression tumorale lorsque les patients étaient traités par ICI anti-PD-1/PD-L1 pour des CETEC en rechute et/ou métastatiques avec une fréquence de 9% [53]. L'Institut Curie (Paris, France) retrouvait quant à lui une fréquence de 29% dans une série rétrospective française de 34 patients traités par anti PD-1/PD-L1 en particulier dans les situations de récidive locorégionale comparées aux métastases à distance [54]. La prévalence pourrait donc être variable parmi les tumeurs solides traitées par ICI comme Champiat et al le décrivent [55].
Plusieurs auteurs ont décrit l'absence d'association du phénomène d'hyperprogression tumorale à l'échelle de l'*Eastern Cooperative Oncology Group*, au sexe, au tabagisme, à l'histologie, au type de traitement, au nombre ou types de traitements antérieurs, à l'albuminémie, aux statuts EGFR, Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) et *c-ros oncogene 1* (ROS), au ratio neutrophiles sur lymphocytes, à la charge mutationnelle, à l'expression tumoral de PD-L1, à la présence de marqueurs inflammatoires de départ, à l'utilisation préalable de corticostéroïdes. En revanche, il serait associé à un âge > 65 ans, à un nombre de métastases > 2, aux métastases hépatiques et à un taux de Lacticodéshydrogénase (LDH) supérieur à la normale [53, 54, 56–58].
L'évaluation des biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie dans les récidives en zone irradiée pourrait ainsi apporter des éléments de réponse pour comprendre pourquoi ce phénomène prédomine en cas de récidive locorégionale.

6. Nouvelles perspectives thérapeutiques

L'immunothérapie est une approche thérapeutique en pleine expansion. Elle se compose de différentes stratégies mettant en jeu le système immunitaire comme les vaccinations, les cytokines ou encore les anticorps monoclonaux dont les ICI. Bien que l'immunologie soit à l'étude depuis de nombreuses années dans la stratégie thérapeutique antitumorale, elle s'est aujourd'hui enfin imposée et ce, dans plusieurs types de pathologies malignes avec l'émergence des ICI. Les anti-*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4), anti-PD-L1 et anti-PD-1 sont actuellement les ICI utilisés en pratique

clinique courante, notamment dans les carcinomes bronchiques, rénaux, urothéliaux et les mélanomes. Nous décrirons leur développement dans les CETEC dans les prochains paragraphes.

Ces nouvelles connaissances ont d'ailleurs été mises à l'honneur par l'attribution du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine 2018 aux deux immunologistes américain James Allison (Université du Texas, USA) et japonais Tasuku Honjo (Université de Kyoto, Japon) pour leur découverte des protéines CTLA-4 et PD-1 respectivement, impliquées dans les freins de la réponse immunitaire. Ils ont ainsi mis en lumière la possibilité d'un traitement antitumoral par inhibition de la régulation immunitaire négative.

II. DÉVELOPPEMENT DES INHIBITEURS DE CHECK-POINTS IMMUNITAIRES EN CANCÉROLOGIE

1. Le système immunitaire

1.1. La réponse immunitaire

1.1.1. Immunité innée

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme face aux éléments étrangers, pouvant correspondre aux cancers ou aux infections. Il s'agit d'une reconnaissance non spécifique des antigènes des différentes cellules qui composent l'immunité innée : les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques [59, 60].

1.1.2. Immunité adaptative

1.1.2.1. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative implique quant à elle une reconnaissance spécifique des antigènes. La cellule dendritique, véritable interface entre immunité innée et adaptative, a pour rôle fondamental de présenter les antigènes spécifiques des tumeurs aux cellules effectrices du système adaptatif : les lymphocytes B et T [59]. Les cellules dendritiques agissent en tant que cellules co-stimulatrices des LT car elles les activent lorsqu'elles présentent des antigènes. Les LT sont ainsi activés et effectuent la réponse immunitaire antitumorale (Figure 4) (Annexe 2) [59, 60].

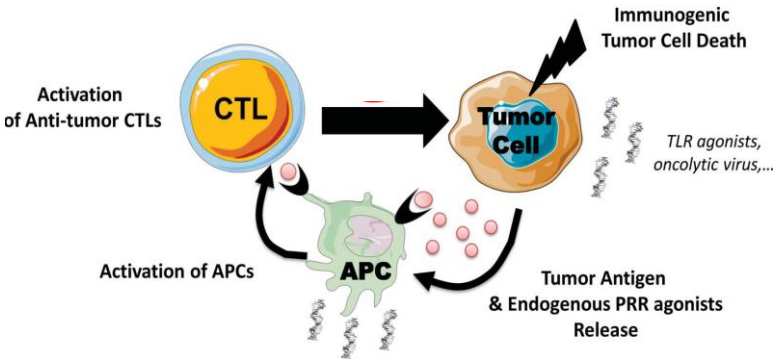


Figure 4 : Cycle d'activation des lymphocytes T. La cellules présentatrice d'antigène (CPA) est activée par la captation d'antigènes tumoraux puis ira présenter ces antigènes aux LT CD8+ cytotoxiques (LT CD8+). La réponse immunitaire adaptative est alors déclenchée et la cellule tumorale sera tuée spécifiquement par les LT CD8+. APC, cellule présentatrice d'antigènes; CTL, lymphocyte T cytotoxique; TLR, Récepteur Toll-Like. D'après Marabelle et al, Onco immunol 2014 [61].

1.1.2.2. L'activation lymphocytaire T cytotoxique et ses freins

L'activation des LT CD8+ est complexe et nécessite deux étapes fondamentales. La première étape est la reconnaissance spécifique de l'antigène tumoral par le récepteur lymphocytaire T (T Cell Receptor ou TCR) via un complexe *Human Leukocyte Antigen (HLA)-peptide*. La seconde étape est un signal émanant des molécules de costimulation lymphocytaire inhibitrices ou activatrices. Pour réguler l'activation lymphocytaire, les molécules inhibitrices seront induites sur les LT ce qui entraînera un frein à leur activité.

En conséquence, au cours d'une stimulation antigénique chronique comme une pathologie tumorale ou une infection virale chronique, les LT exprimeront de forts taux de molécules de costimulation inhibitrices, ce qui conduira à une perte de fonction par état d'épuisement (phénomène d'exhaustion lymphocytaire) ou d'anergie lymphocytaire [13].

Les molécules de costimulation lymphocytaire sont des protéines situées à la surface du LT et font partie de grandes familles de récepteurs comme les récepteurs B7 ou *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Il s'agit de récepteurs activateurs (CD28, OX40, GITR, …) ou inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, TIM-3, …). Chaque molécule constitue une potentielle cible thérapeutique (Figure 5). En effet, une des stratégies d'optimisation de l'activité cytotoxique lymphocytaire T repose sur l'utilisation d'anticorps bloquant les molécules de costimulation inhibitrice [60].

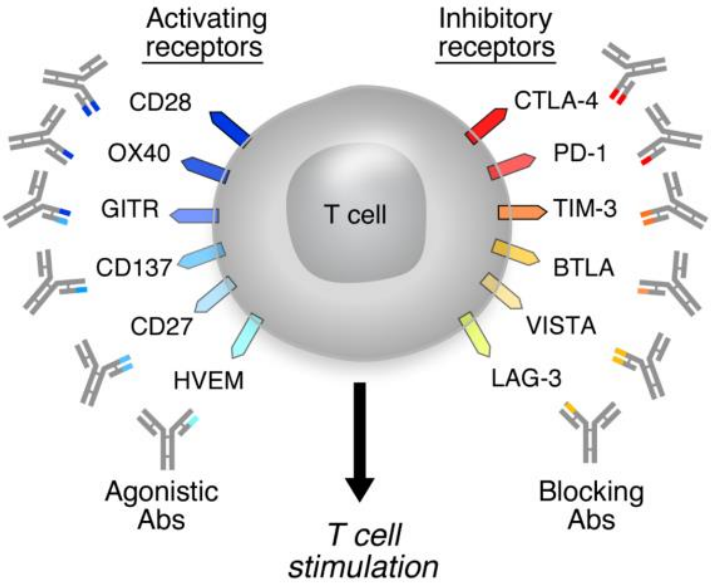


Figure 5 : Les récepteurs activateurs (à gauche) et inhibiteurs (à droite) des LT CD8+. Ils constituent de potentielles cibles thérapeutiques pour les anticorps immunorégulateurs. Abs, anticorps [60].

1.2. Les points de contrôles immunitaires ou « checkpoints immunitaires »

Les points de contrôles immunitaires peuvent réguler l'activité des LT et interviennent à différents stades de la réponse immunitaire pour réguler la durée et l'intensité de l'action des LT.

1.2.1. Le point de contrôle immunitaire CTLA-4

La protéine CTLA-4 régulerait principalement la phase d'amorçage de l'activation des LT dans les ganglions lymphatiques. Il s'agit d'une molécule de costimulation induisant un signal inhibiteur. Son action induit un frein de l'activité des LT afin de limiter l'auto-immunité (Figure 5) [62].

1.2.2. Le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1

La protéine PD-1 régulerait principalement la phase effectrice de l'activation des LT. Il s'agit également d'une molécule de costimulation induisant un signal inhibiteur. L'activation de ce récepteur peut stopper l'activité des LT spécifiques d'antigènes dans le microenvironnement tumoral et entraîner un échappement tumoral vis-à-vis de l'immunosurveillance (Figure 6) [13].

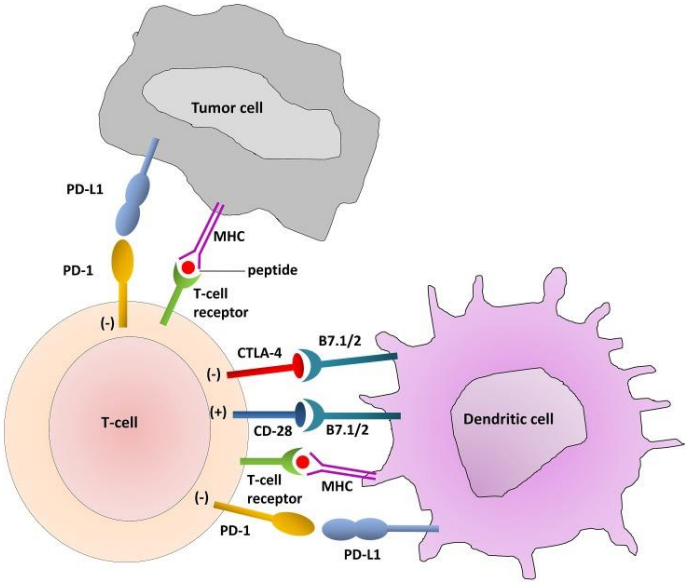


Figure 6 : Interactions du LT avec les cellules dendritique (cellules présentatrices d'antigènes) et les cellules tumorales. Visualisation des checkpoints immunitaires CTLA-4 et PD-1/PD-L1. D'après Zaravinos et al, Oncotarget 2014 [63].

2. L'immunoediting tumoral : la théorie des 3 E

La croissance tumorale est modulée par le système immunitaire : c'est le principe de l'immunoediting tumoral. Il s'agit d'un processus continu et repose sur la théorie des 3 E qui se compose de trois phases pouvant être indépendantes ou séquentielles : l'Élimination, l'Équilibre et l'Échappement (Figure 7) [64–66].

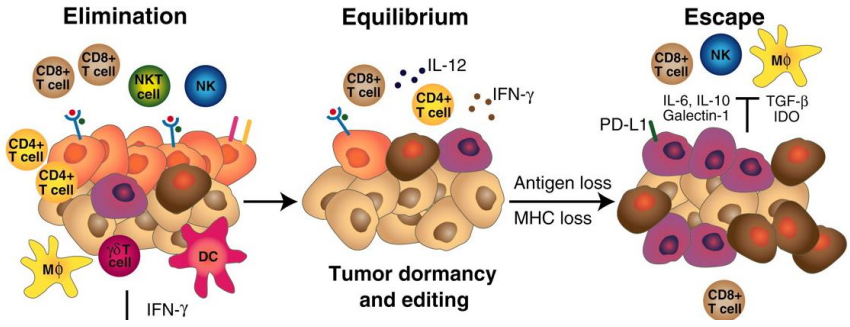


Figure 7 : L'immunoediting et la théorie des 3 E. Phase I : Élimination, Phase II : Équilibre et Phase III : Échappement. D'après Schreiber et al, Science 2011 [65].

2.1. Phase d'Élimination

La phase d'Élimination, ou phase d'« immunosurveillance », est la phase où le système immunitaire inné et adaptatif reconnaissent les cellules tumorales et les éliminent [64, 66]. Le rôle du système immunitaire dans la surveillance immune et la destruction de cellules anormales, notamment les cellules tumorales, est une voie émergente et cruciale dans la compréhension des mécanismes de développement tumoraux et des futurs moyens thérapeutiques [5].

2.2. Phase d'Équilibre

Certaines cellules tumorales peuvent survivre à la phase d'Élimination. Elles entrent alors en phase d'Équilibre avec le système immunitaire qui les contient. Ces cellules restent dormantes mais leur profil mutationnel continue de se modifier, ce qui leur permet d'acquérir de nouvelles propriétés et d'échapper ainsi à la vigilance du système immunitaire [64, 66].

2.3. Phase d'Échappement tumoral

L'accumulation de mutations confère à certains clones tumoraux des avantages leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire : il s'agit du phénomène d'Échappement tumoral. La cellule peut ainsi proliférer et deviendra cliniquement décelable [64]. Cette capacité qu'ont les cellules tumorales a été ajoutée aux autres caractéristiques de la cellule tumorale, appelées les « *Hallmarks* du cancer » comme l'ont décrit Weinberg et Hanahan en 2000 puis en 2011 (Figure 8) [67, 68].
Les cellules tumorales peuvent échapper à la détection et à la destruction par le système immunitaire grâce à différents mécanismes d'échappement comme la perte d'expression des antigènes, le recrutement de cellules immunosuppressives, la sécrétion de cytokines immunosuppressives, l'utilisation des points de contrôles immunitaires [69].

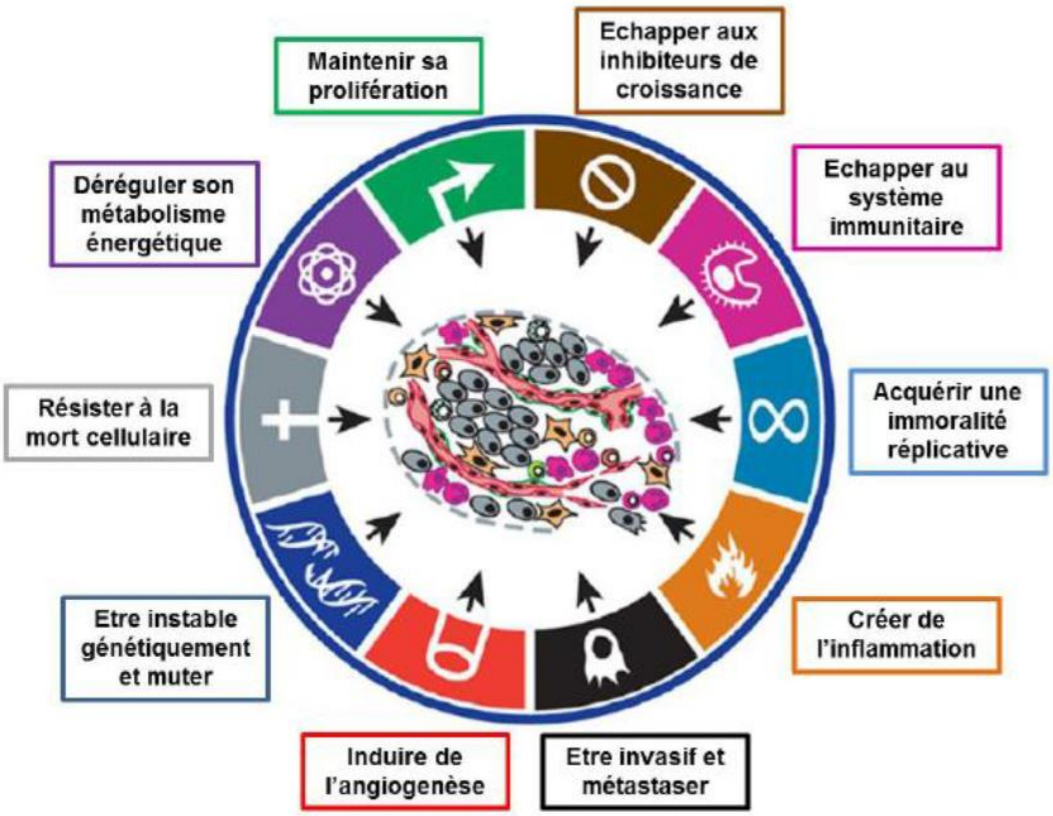


Figure 8 : Les caractéristiques des cellules tumorales en 2011. D'après Hanahan et Weinberg, Cell 2011 et la présentation de Magali Terme (Master 2, Biologie Santé, Université Paris Sud, 2016) [68].

3. Le développement de l'immunothérapie

3.1. Le changement de paradigme

3.1.1. Cibler la tumeur

Le principe des traitements anti-cancéreux repose classiquement sur le ciblage direct des cellules tumorales. En effet, les chimiothérapies cytotoxiques interfèrent avec la division cellulaire tumorale et empêchent ainsi leur réplication. Les thérapies ciblées, comme le Trastuzumab (Herceptin®) et le Cétuximab (Erbitux®), agissent quant à elles sur la croissance tumorale en se focalisant sur des cibles moléculaires spécifiques impliquées dans le développement et la prolifération tumorale. L'hormonothérapie, comme le Tamoxifène (Tamoxifène®), cible la voie d'intérêt grâce à laquelle la cellule tumorale se développe.

3.1.2. Cibler le système immunitaire : le concept de l'immuno-oncologie

Le nouveau paradigme en oncologie consiste en l'utilisation du système immunitaire lui-même comme arme antitumorale. Contrairement aux chimiothérapies cytotoxiques et aux thérapies ciblées, l'immunothérapie n'agit pas directement sur les cellules tumorales mais cible le système immunitaire pour le rendre apte à éliminer les cellules cancéreuses. Les principales premières approches en immunothérapie ont concerné la stimulation spécifique du système immunitaire avec les vaccins antitumoraux et non spécifique avec les cytokines [61].
Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires récemment développés font partie de l'arsenal thérapeutique en immunothérapie et ont pour but de stimuler la réponse antitumorale des LT cytotoxiques, ou LT CD8+, en modulant les points de contrôles immunitaires : c'est le concept de l'immuno-oncologie (Figure 9) [70, 71].

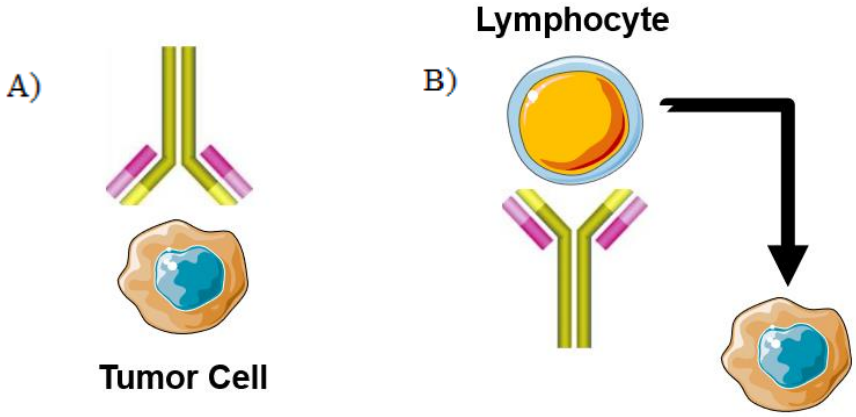


Figure 9 : Le concept de l'immuno-oncologie. A) Paradigme classique : cibler la cellule tumorale. B) Nouveau paradigme : cibler le système immunitaire. D'après Marabelle et al, Onco immunol 2014 [61].

3.1.3. L'intégration du microenvironnement tumoral

3.1.3.1. Description du microenvironnement tumoral

L'intégration du microenvironnement tumoral comme cible dans la stratégie thérapeutique antitumorale est récente. Elle est la conséquence de la nouvelle vision de l'organisation elle-même d'une tumeur, ne se résumant plus à un amas de cellules tumorales mais bien comme un ensemble de composants interagissant ensemble et avec leur environnement proche. Ce microenvironnement tumoral est responsable d'une immunosuppression locale, empêchant le système immunitaire d'y exercer son action cytotoxique notamment par anergie des LT CD8+ et prolifération des LT régulateurs (T reg) qui inhibent la fonction effectrice des LT [72].

Le microenvironnement tumoral joue un rôle central dans le développement d'une tumeur et peut favoriser notamment la prolifération cellulaire, la vascularisation, la survie cellulaire ou encore la dissémination métastatique. Il fait partie intégrante de la tumeur et compte parmi ses composants fondamentaux les cellules tumorales elles-mêmes, les vaisseaux ainsi que des cellules immunosuppressives comme les MDSCs, les T reg ou les macrophages de type 2 (M2) [5, 73]. Il s'agit donc d'une balance entre des éléments « positifs », comme les cellules immunitaires, molécules de signalisation, facteurs immunitaires et des éléments « négatifs », comme les MDSCs ou les LT reg (Figure 10) [73].

Le microenvironnement tumoral est donc un modèle interactif. Chaque élément peut donc être une cible thérapeutique, notamment en inhibant l'angiogénèse, l'inflammation et l'immunosuppression locale [73].

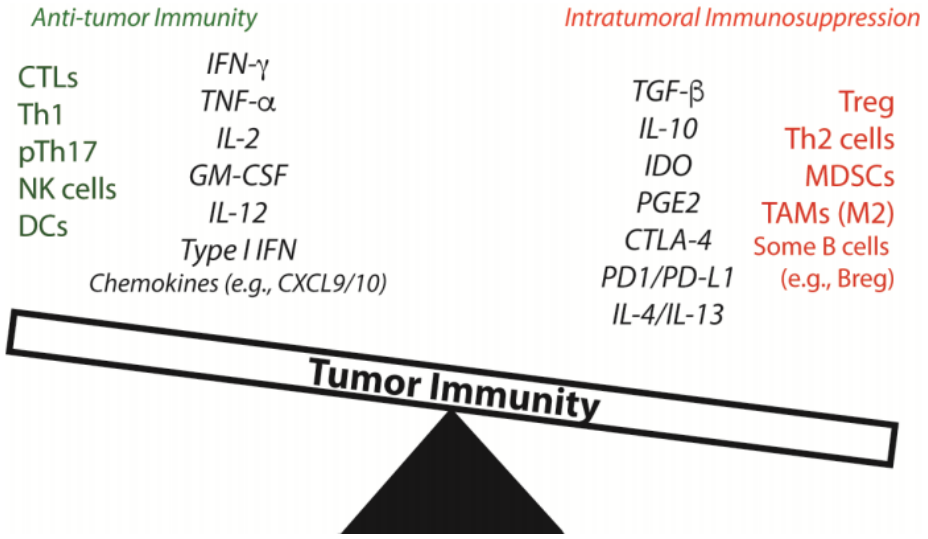


Figure 10 : Le microenvironnement tumoral. Une balance entre immunité antitumorale et immunosuppression intratumorale. D'après Pitt et al, Ann Oncol 2016 [73].

3.1.3.2. Description des phénotypes tumoraux

L'arrivée de l'immunothérapie dans l'arsenal thérapeutique antitumoral est bouleversante. Cependant, la majorité des patients ne répondent pas aux ICI. Des analyses rétrospectives de patients traités par les ICI démontrent qu'il existe des profils de microenvironnement tumoral associés à la réponse aux ICI [74].

Plusieurs équipes se sont intéressées à la description des phénotypes tumoraux depuis l'intégration du microenvironnement tumoral comme cible thérapeutique. Certaines décrivent un microenvironnement tumoral *« immunogénique »* ou *« faiblement immunogénique »* [25], d'autres parlent de tumeurs *« froides »* ou *« chaudes »* ou encore de tumeurs *« inflammése »* et *« non inflammées »* [75]. Chen et al décrivent des sous-groupes de microenvironnement tumoral avec réponse immunitaire « active » ou « épuisée » [76] .

Hegde et al décrivent les tumeurs *« inflammées »* comme des tumeurs présentant une présence de TILs, une expression de PD-L1 par les TILs, une densité importante de LT CD8+ producteurs d'IFNγ, une possible instabilité génomique ainsi que la préexistence d'une réponse immunitaire antitumorale. À l'inverse, les tumeurs « non inflammées » sont décrites comme immunologiquement ignorantes. Il s'agit de tumeurs très proliférantes, avec une charge mutationnelle très faible, qui sont peu infiltrées par les LT et qui expriment peu PD-L1 (Annexe 3) [75].

Yuan et al ont quant à eux décrit deux autres types de catégories : les tumeurs *« immunologiquement non répondeuses »* et les tumeurs *« immunologiquement répondeuses »*. Ces tumeurs sont classées en fonction de la présence de cellules immunes dans le microenvironnement tumoral. Avec l'utilisation du séquençage haut débit, ces tumeurs peuvent également se différencier par leur charge mutationnelle, les fonctions des cellules immunes ainsi que leur phénotype, le profil génique et protéique. Le profil de ces deux catégories de tumeurs est décrit dans la Figure 11 [77].

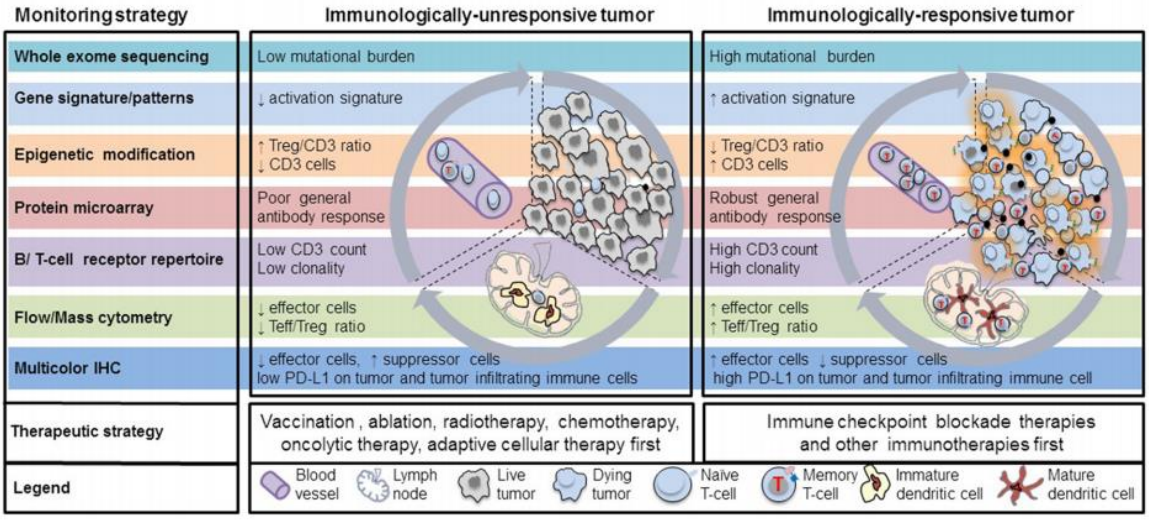


Figure 11 : Les tumeurs « immunologiquement non répondeuses » et les « tumeurs immunologiquement répondeuses ». D'après Yuan et al, Journal for Immuno Therapy of Cancer 2016 [77].

Teng et al ont décrit une nouvelle classification se basant sur l'identification de 4 types de phénotypes tumoraux (I à IV) que nous avons utilisés dans ce travail (Annexe 4) [78]:

- TYPE I : il correspond à la résistance adaptative immune (tumeurs PD-L1+ sur cellules tumorales et haute infiltration en TILs CD8+).
- TYPE II : il correspond à l'ignorance immunologique (tumeurs PD-L1- sur cellules tumorales et faible infiltration en TILs CD8+).
- TYPE III : il correspond à l'induction intrinsèque (tumeurs PD-L1+ sur cellules tumorales et faible infiltration en TILs CD8+).
- TYPE IV : il correspond à la tolérance immune (tumeurs PD-L1- sur cellules tumorales et haute infiltration en TILs CD8+).

Des analyses rétrospectives de patients traités par des ICI ont montré qu'il existait différentes classes de microenvironnement tumoral et dont certaines étaient associées à une meilleure réponse aux ICI [74]. Le profil tumoral le plus enclin à répondre aux ICI correspondrait à une haute charge mutationnelle, une densité importante de cellules CD3+, une forte clonalité, un fort taux de cellules effectrices, un nombre important de cellules tumorales exprimant PD-L1 et une forte infiltration de la tumeur par les lymphocytes [77].

3.2. L'exemple du checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1

3.2.1. Échappement tumoral par inhibition des lymphocytes T CD8+

Les cellules tumorales peuvent échapper à l'activité des LT via plusieurs mécanismes. Celui mettant en jeu le checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 est l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1 par de nombreuses cellules tumorales. Elles contournent la réponse immunitaire car la liaison de PD-L1 aux récepteurs PD-1 se trouvant à la surface des LT spécifiques de tumeur au sein du microenvironnement tumoral entraîne l'inactivation de ces derniers par un mécanisme d'épuisement lymphocytaire T. Leur activité antitumorale est donc fortement diminuée car ils perdent ainsi leur activité cytotoxique [5, 79].

3.2.2. Réactivation des LT CD8+ par les anticorps anti-PD-1/PD-L1

Les ICI ont une action antitumorale indirecte puisque leur rôle est d'inhiber les freins d'activation des LT cytotoxiques qui iront secondairement tuer les cellules tumorales. Les ICI anti-PD-1/PD-L1 sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 et se fixent soit sur le récepteur PD-1, soit sur le récepteur PD-L1 pour empêcher leur liaison (Figure 12) [79, 80]. En conséquence, le blocage de ces molécules restaure la fonction effectrice des LT CD8+ ainsi que leur capacité de prolifération et de sécrétion de l'interleukine 2. La réaction immunitaire antitumorale des LT est ainsi réactivée et les cellules tumorales en deviennent alors la cible [71, 79, 81].

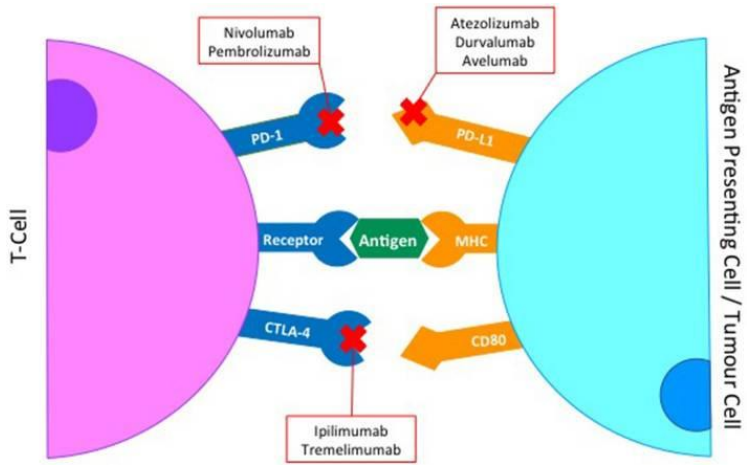


Figure 12 : Inhibition du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1 par les inhibiteurs de checkpoint immunitaire anti-PD-1/PD-L1. Les cibles des anticorps peuvent être les récepteurs PD-1 ou PD-L1, empêchant leur liaison et donc l'inactivation du LT [82].

3.2.3. Les inhibiteurs de ce checkpoint immunitaire (ICI)

3.2.3.1. Spectre de sensibilité des tumeurs aux ICI

Les principaux avantages de l'activité antitumorale du système immunitaire adaptatif sont sa mémoire immunitaire et sa polyclonalité. De ce fait, nous espérons obtenir un meilleur contrôle de l'hétérogénéité tumorale ainsi que des rémissions plus durables, d'autant plus que les cellules immunitaires ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, contrairement à la majorité des autres traitements [83, 84].

Le PD-Lome illustre une sensibilité commune aux anti-PD-1/PD-L1 en monothérapie à de nombreux cancers comme le décrivent Hirsch et al cette année. Cette sensibilité peut varier de quasiment 70% pour les lymphomes de Hodgkin à moins de 10% pour les cancers de la thyroïde. Celle des CETEC se situerait entre 10 et 15% (Figure 13) [85].

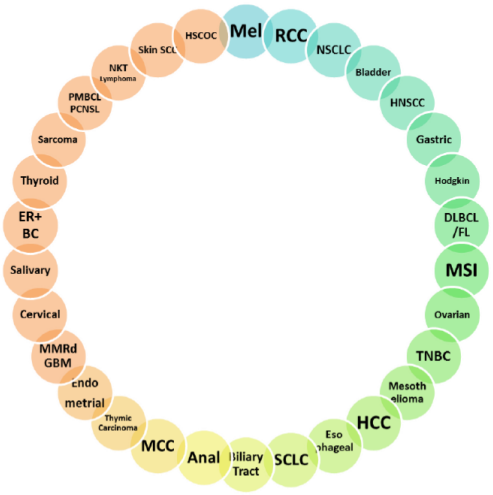


Figure 13 : PD-Lome. Sensibilité commune aux anti-PD-1/PD-L1 en monothérapie dans de nombreux cancers. D'après Hirsch et al, BJC 2019 [85].

3.2.3.2. Panel thérapeutique

Les ICI peuvent cibler plusieurs checkpoints immunitaires constituant un frein à l'activation lymphocytaire T. Les principaux axes sont CTLA-4 et PD-1/PD-L1 dont les anticorps monoclonaux inhibiteurs sont cités ci-dessous :

- **Anti-CTLA-4**: Ipilimumab (Yervoy®), Tremelimumab
- **Anti-PD-1**: Nivolumab (Opdivo®), Pembrolizumab (Keytruda®)
- **Anti PD-L1**: Durvalumab (Técentriq®), Atézolizumab (Bavencio®), Avelumab (Imfinzi®)

Concernant les anti-PD-1/PD-L1, le Nivolumab et le Pembrolizumab sont des molécules de type Immunoglobuline G4 (IgG4) totalement humanisées. L'Atézolizumab et le Durvalumab sont des IgG1 modifiées et l'Avélumab, IgG1 également, est la seule molécule à avoir une activité cytotoxique à médiation cellulaire anticorps dépendante (ADCC).
Les ICI se sont ainsi imposés dans plusieurs types de cancers [45]. Le leader fut le mélanome métastatique avec l'anti-CTLA-4 Ipilimumab en 2010, montrant un bénéfice en survie globale [86], puis avec la combinaison Ipilimumab et l'anti-PD-1 Nivolumab en 2015 [87]. Les organes suivants furent les carcinomes urothéliaux avancés avec le Pembrolizumab en 2^{e} ligne en 2017 [88], les cancers du poumon non à petites cellules avancés et les carcinomes à cellules claires du rein avancés avec le Nivolumab en 2015 [89, 90].

3.2.3.3. Gestion d'un nouveau profil de toxicité

Le mécanisme d'action des ICI est la levée de l'inhibition des LT cytotoxiques. Une des conséquences est donc d'activer des LT reconnaissant les antigènes du soi, appelés « LT auto-réactifs », responsables d'une auto-immunité par infiltration des tissus sains. Ces effets secondaires sont appelés les « effets indésirables liés à l'immunité » ou EILI [91–93]. La toxicité des ICI est importante à détecter le plus rapidement possible et la gestion des EILI repose sur 5 points fondamentaux : **PRÉVENIR, ANTICIPER, DÉTECTER, TRAITER, SURVEILLER** [70, 92–95].

Les EILI sont différents en fonction des ICI et sont non superposables à celui des autres traitements anticancéreux classiques [94, 96].
Ces effets indésirables entrent dans un spectre clinique de type auto-immunité :

- *Oculaires* : uvéite, conjonctivite, sclérite, épisclérite, blépharite, rétinite, kératine ulcéreuse
- *Endocriniens* : hypothyroïdie, hyperthyroïdie, hypophysite, insuffisance surrénalienne, diabète
- *Hépatiques* : hépatites cytolytiques, cholestatiques ou mixtes
- *Cutanéomuqueux* : rash, prurit, xérose, psoriasis, vitiligo, DRESS syndrome et Stevens-Johnson, réactions lichénoïdes, xérostomie, dysgueusie
- *Hématologiques* : anémie hémolytique, thrombocytopénie, neutropénie, hémophilie A

- *Neurologiques* : Guillain-Barré, myélite, myasthénie, méningite, encéphalite
- *Cardiovasculaires* : myocardite, vascularite, péricardite, arythmie
- *Pulmonaires* : pneumopathie, pleurésie, sarcoïdose granulomateuse
- *Rénaux* : néphrite
- *Gastrointestinaux* : diarrhée, colite, iléite, pancréatite, gastrite
- *Musculo squelettiques* : arthrite, dermatomyosite

Les indications des ICI étant de plus en plus nombreuses, il est important de savoir détecter au plus vite les EILI, qui surviennent dans 10 à 15% des cas avec les anti-PD-1 ou anti PDL-1 en monothérapie, et les traiter selon les recommandations en vigueur [94, 97].

3.2.3.4. Sélection des patients et biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie

- **Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?**

La *Food And Drug Administration* (FDA) définit un biomarqueur comme une caractéristique donnée, mesurée en qualité d'indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathogène ou d'une réponse à une exposition ou une intervention. Ces biomarqueurs peuvent être moléculaires, histologiques, radiographiques ou des caractéristiques physiologiques. Le glossaire « *Biomarkers, Endpoints and other Tools* » (BEST) définit sept catégories de biomarqueurs : pronostiques, prédictifs, diagnostiques, indicateurs de risque, de réponse, de tolérance et de monitoring [98]. Certains biomarqueurs sont identifiés dans le sang périphérique, en intratumoral ou dans le microenvironnement tumoral et semblent être différents en fonction de la molécule d'immunothérapie utilisée [99].

Avec l'arrivée des ICI, deux problématiques s'annoncent : la « toxicité financière » et la « toxicité clinique ». En effet, la majorité des patients ne répondent pas aux ICI, soit entre 70 et 80% des cas, engendrant un surcoût ainsi qu'une exposition à des effets secondaires pouvant parfois menacer le pronostic vital [74, 99].

Il devient donc important de valider des biomarqueurs pour identifier quels patients seront susceptibles de répondre à un traitement ou non [100]. Les moyens technologiques ayant beaucoup évolué depuis 10 ans, plusieurs types de biomarqueurs ont été développés dans les CETEC [45].

- **Les biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie dans les CETEC** [45, 73, 100]

a) L'expression de PD-L1

L'évaluation de PD-L1 est devenue incontournable. Le pourcentage d'expression de PD-L1 peut être évalué sur les cellules tumorales (PD-L1 TC) ainsi que sur les cellules immunes (PD-L1 IC). Il s'agit d'un biomarqueur pouvant indiquer une immunosuppression induite par la tumeur [5]. Le statut PD-L1 est un biomarqueur approuvé par la FDA et l'Agence Européenne des Médicaments pour le

traitement des carcinomes bronchopulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) avec la validation du Pembrolizumab en première ligne (étude KEYNOTE-024) (si PD-L1⩾50%) [101] et en deuxième ligne métastatique (étude KEYNOTE-010) (si PD-L1⩾1%) [102].

L'utilisation stricte du pourcentage de cellules tumorales surexprimant PD-L1 en prédiction d'une réponse aux ICI est imparfaite. En effet, il est possible d'avoir une infiltration massive lymphocytaire T du stroma et une tumeur sans surexpression de PD-L1 ou, à l'inverse, très peu d'infiltration lymphocytaire T avec surexpression de PD-L1, sans que l'on puisse dire si ces patients répondront aux ICI ou non. En revanche, l'évaluation de PD-L1 n'est pas nécessaire pour la prescription de Nivolumab ou de Pembrolizumab (en deuxième ligne) dans les CETEC, de même que le statut HPV.

b) L'infiltration lymphocytaire des tumeurs (TILs)

L'importance du système immunitaire dans la réponse antitumorale et son impact pronostique favorable sont connus depuis plusieurs années, comme l'ont démontré Pagès et al en 2005 dans les cancers colorectaux [103]. L'infiltration lymphocytaire T CD8+ semble un prérequis important pour une réponse optimale à la classe thérapeutique des anti-PD-1/PD-L1 [99].

c) La charge mutationnelle tumorale

La charge mutationnelle tumorale est associée à une infiltration lymphocytaire T CD8+ ainsi qu'à un taux de réponse élevé aux anti-CTLA-4 et anti-PD-1/PD-L1 [99]. Elle n'est pour le moment pas utilisée en pratique clinique et nécessite l'utilisation du séquençage haut débit d'un panel de gènes ou d'un exome entier. Des essais prospectifs ainsi qu'une standardisation des pratiques sont encore nécessaires [104].

d) Les signatures immunes

L'IFNγ est une cytokine dont l'activité biologique est associée à une réponse antitumorale cytotoxique ou cytostatique de type adaptatif. Elle possède des anti et pro tumorigènes en fonction du type cellulaire et moléculaire du microenvironnement tumoral [105]. La recherche de cette molécule n'est pour le moment pas réalisée en pratique clinique courante, sa réalisation étant onéreuse et nécessitant du matériel spécifique.

e) Autres biomarqueurs potentiels : l'immunogénétique et le microbiote

Bien qu'il n'y ait à l'heure actuelle aucun biomarqueur fiable pour déterminer si le patient répondra à l'ICI prescrit, il semble que la présence d'une infiltration lymphocytaire cytotoxique CD8+ dans la région tumorale, témoignant d'une réponse immunitaire antitumorale adaptative, d'un microenvironnement tumoral riche en IFNγ et de cellules tumorales surexprimant PD-L1 et porteuses d'un fort taux mutationnel, soient les conditions les plus favorables au succès de ces immunothérapies [99].

III. DÉVELOPPEMENT DES INHIBITEURS DE CHECKPOINTS IMMUNITAIRES DANS LES CETEC RÉCIDIVANTS/MÉTASTATIQUES EN 2e LIGNE THÉRAPEUTIQUE

1. Deux principales études après échec d'un sel de platine

1.1. Étude Checkmate-141 et Nivolumab

L'étude Checkmate-141 est le premier essai clinique à avoir démontré un bénéfice en survie globale d'un ICI chez des patients en récidive tumorale ou métastatique après échec d'un sel de platine en deuxième ligne thérapeutique. Il s'agissait d'une étude de phase III qui randomisait 361 patients avec la survie globale comme critère de jugement principal. Les patients recevaient soit le Nivolumab (3 mg/kg tous les 15 jours) soit une chimiothérapie hebdomadaire au choix de l'investigateur (Méthotrexate, Docétaxel ou Cétuximab) [14].

Dans l'actualisation des données parue en 2018 avec au minimum 2 ans de suivi, on observait une augmentation significative de la médiane de survie globale dans le bras Nivolumab à 7,7 mois versus 5,1 mois avec un Hazard Ratio (HR) à 0,71 (IC95% 0,55-0,90 ; p=0,0048) (Figure 14). Le Nivolumab était globalement bien toléré avec 15,3% de toxicités de grade ≥ 3 vs 36,6% avec la chimiothérapie. Une analyse ancillaire a montré que le bénéfice en survie globale du Nivolumab était observé quels que soient les statuts HPV et PD-L1 exprimé par les cellules tumorales [106]. La FDA a ainsi approuvé le Nivolumab dans cette situation en 2016. En France, le Nivolumab a obtenu son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2018. Celle-ci n'est pas conditionnée par l'expression de PD-L1.

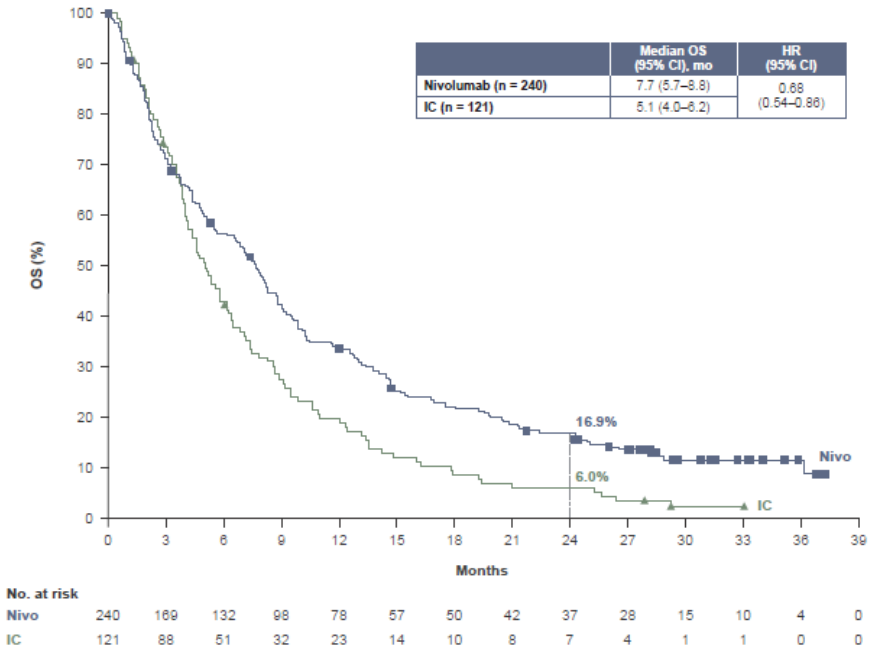


Figure 14 : Courbe de survie globale de l'étude Checkmate-14 actualisée en 2018 à 2 ans de suivi minimum (population en intention de traiter). CI, Intervalle de Confiance; HR Hazard Ratio; IC, Choix de l'Investigateur; Nivo, Nivolumab. D'après Ferris et al, Oral Oncol 2018 [106].

1.2. Étude Keynote-040 et Pembrolizumab

L'étude Keynote-040 de phase III randomisait 495 patients et a, quant à elle, évalué l'efficacité et la tolérance du Pembrolizumab (dose fixe à 200mg toutes les 3 semaines) dans la même situation carcinologique versus les mêmes chimiothérapies hebdomadaires au choix de l'investigateur (Méthotrexate, Docétaxel ou Cétuximab). Les résultats montrent une amélioration de la médiane de survie globale en faveur du Pembrolizumab, passant de 7,1 mois à 8,4 mois (HR=0,81 ; IC95% 0,66-0,99 ; p=0,0204) (Figure 15). Cette amélioration était non significative. La survie globale était significativement augmentée pour le sous-groupe exprimant plus de 50% de PD-L1 sur cellules tumorales, passant de 7,9 mois à 11,6 mois (HR=0,54 ; IC95% 0,35-0,82 ; p=0,0017) [40]. Le Pembrolizumab a donc obtenu une AMM européenne dans cette indication mais avec la restriction que la tumeur exprime PD-L1 à plus de 50%. Aucun remboursement n'a pour le moment été accordé en France.

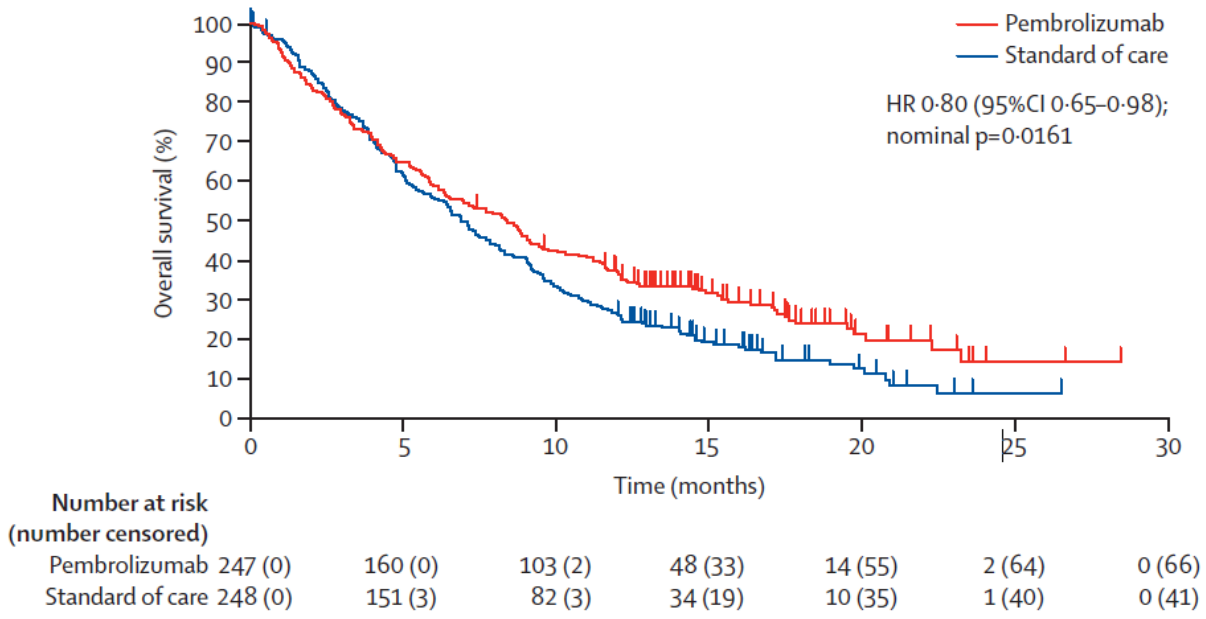


Figure 15 : Courbe de survie globale de l'étude Keynote-040 (population en intention de traiter). CI, Intervalle de Confiance; HR Hazard Ratio. D'après Cohen et al, Lancet 2019 [40].

2. Bien d'autres études

De nombreux essais cliniques sont en cours évaluant une immunothérapie seule ou associée à une autre immunothérapie, à la radiothérapie, à la chimiothérapie ou encore aux thérapies ciblées et cela dans différentes situations carcinologiques (adjuvant, métastatiques, etc…).

Nous pouvons citer à titre d'exemple :

- **Étude HAWK**

Étude de phase II de 112 patients avec CETEC récidivants/métastatiques (R/M) PD-L1+ (> 25%) sur cellules tumorales évaluant en 2e ligne stricte après échec d'un sel de platine le Durvalumab (anti-PD-L1) administré à la dose de 10 mg/kg toutes les 2 semaines. L'étude a montré TRO de 16,2% (CI95% 9,9-24,4) [107].

- **Étude CONDOR**

Étude de phase II randomisée de 240 patients avec CETEC R/M PD-L1- (< 25%) comparant en 2e ligne stricte après échec d'un sel de platine le Durvalumab seul versus tremelimumab seul (anti-CTLA-4) versus Durvalumab + Tremelimumab. Le TRO était de 7,8% pour la combinaison Durvalumab + Tremelimumab (CI95% 3,78-17,79) ce qui n'était pas supérieur au TRO du Durvalumab seul à 9,2% (3,46%-19,02%) [108].

- **Étude EAGLE**

Étude de phase III randomisée de 720 patients avec CETEC R/M PD-L1+ ou PD-L1- comparant en 2e ligne stricte après échec d'un sel de platine le Durvalumab seul versus Durvalumab + Tremelimumab versus une chimiothérapie au choix de l'investigateur (Cétuximab, Taxane, Méthotrexate ou Fluoropyrimidine). Ni le Durvalumab en monothérapie ni la combinaison n'ont atteint l'objectif principal d'amélioration de la survie globale dans une actualisation de décembre 2018 [109].

IV. OBJECTIFS DE CE TRAVAIL ET ASPECTS INNOVANTS

1. L'étude du profil biologique des tumeurs en territoire irradié

Le profil biologique des tissus ayant subi un traitement antérieur par radiothérapie ou radiochimiothérapie reste peu décrit, notamment en raison de l'absence de stratification dans les essais évaluant l'immunothérapie. La comparaison de ces tissus aux tumeurs de novo n'a encore pas été réalisée. L'intérêt que nous portons aux récidives en territoire irradié repose ainsi sur la recherche d'une modification du microenvironnement tumoral à la suite d'une radiothérapie ou d'une radiochimiothérapie.

Les études réalisées in vitro suggèrent que la radiothérapie induirait de multiples changements immunomodulateurs pouvant influencer la réponse antitumorale, notamment : diminution de l'expression de PD-L1, augmentation du relargage antigénique et augmentation des marqueurs immunogéniques de la surface cellulaire [110].

Il serait intéressant d'évaluer les biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie car il semble que les tissus tumoraux récidivant en territoire prétraité aient un comportement singulier. En effet, outre le fait

qu'ils aient été décrits comme un site prépondérant à l'hyperprogression tumorale [54], ces tumeurs ont tendance à moins répondre à l'immunothérapie en comparaison aux sites métastatiques à distance. Il existe une dissociation de réponse des récidives locorégionales chez certains patients traités par ICI par rapport aux métastases à distance qui semblent, elles, régresser. Les métastases semblent donc se comporter différemment, comme cela a été évoqué dans le cancer du sein métastatique [111].

Notre travail a ainsi pour hypothèse qu'il pourrait exister une différence d'expression des biomarqueurs de réponse immunitaire dans les tumeurs non prétraitées si l'on compare à celles survenant en zone irradiée.

2. L'évaluation des mécanismes d'hyperprogression tumorale sous ICI

Ce travail se focalise sur les récidives locorégionales des CETEC car ils ont été décrits comme étant un site prédominant d'hyperprogression tumorale en comparaison aux sites métastatiques à distance après initiation d'un traitement par ICI (anti-PD-1/PD-L1), comme cela a été évoqué précédemment. L'analyse de certains biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie pourrait ainsi apporter des hypothèses quant à leur physiopathologie.

3. L'observation d'un rationnel pour le développement de stratégies d'introduction de l'immunothérapie en périopératoire ou de traitements associatifs

Le terrain le plus favorable à la réponse à un ICI semble être une tumeur infiltrée de LT, exprimant PD-L1 et la présence d'expression d'IFNγ.
Une hypothèse serait que si ces éléments étaient exprimés en quantité plus importante dans les tissus de novo versus les tissus en territoire irradié, cela pourrait constituer un rationnel scientifique de l'introduction plus précoce voire d'emblée des ICI dans la stratégie thérapeutique des CETEC.

ARTICLE

Cover letter for the Oral Oncology Journal

Dear editor,

We would like to submit our manuscript entitled: *Expression of immune response biomarkers in "recurrent" head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) within irradiated area* for consideration for publication in the Oral Oncology Journal.

This large study, which includes 100 patients (50 in the group de novo and 50 in the group of tumors in irradiated area) represents one of the largest series focusing on previously irradiated area.
There is currently an increasing interest in understanding the immune landscape of tumors, particularly the tumoral microenvironment that has become a central issue in the era of immunotherapy and especially immune checkpoint inhibitors.

Therefore, we focused on the assessment of biomarkers of immune response for tumors occurring in pretreated area and compared them to newly diagnosed tumors.

It is in fact important:

1) To study the microenvironment profile in terms of immune response biomarkers in pretreated areas where data are definitely lacking, as clinical trials are very rarely stratified according to previous radiation or not
2) To see if there are biological arguments to support the introduction of immunotherapy sooner in future therapeutic strategies, notably in peri operative sequences
3) To understand why HNSCC locoregional recurrences have been recently described as a predominant site of hyperprogression after initiating an immune checkpoint inhibitor

This work underlines differences in terms of microenvironment profile depending on whether tumors were previously irradiated or not. It shows a much less important expression of immune response biomarkers in the cohort of irradiated area, favoring the hypothesis that the introduction of immunotherapy at an earlier stage of a head and neck cancer, associated or not with cytotoxic agents or radiation, should have a positive impact on patients' survival.

We hope that our study will be considered to the readers of the Oral Oncology Journal.
This article is not under consideration for publication in another journal and has not been published elsewhere.

Best regards,

The authors

Title:
Expression of immune response biomarkers in “recurrent” head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) within irradiated area

Short title:
Immune response biomarkers of head and neck carcinoma within irradiated area

Author names and affiliations:
Carole Pflumio[a], Jacques Thomas[b], Julia Salleron[c], Jean-Christophe Faivre[d], Christian Borel[e], Gilles Dolivet[f], Xavier Sastre-Garau[b], Lionnel Geoffrois[a]

[a] Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[b]Department of Pathology, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[c]Department of Biostatistics and Data Management, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France
[d]Department of Radiation Therapy, Lorraine Institute of Cancerology,Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[e]Department of Medical Oncology, Centre Paul Strauss, Strasbourg, France
[f]Department of Surgical Oncology/CNRS-UMR 7039 CRAN, Lorraine Institute of Cancerology,Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author:
Docteur Lionnel Geoffrois. Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Tel : +33383598400 (5011)
Email : l.geoffrois@nancy.unicancer.fr

Abstract

Objectives:

The immune landscape of pretreated area in HNSCC remains poorly documented. We aimed to assess the tumoral microenvironment in terms of biomarkers for tumor immune response observed in irradiated area as compared to that of de novo tumors.

Material and Methods:

This retrospective monocentric study analyzed 100 HNSCC tumor tissues from patients who underwent surgery between January 2010 and November 2017. We compared the immune microenvironment in 50 de novo tumors and 50 tumor recurrences occurring within irradiated area. We assessed by immunohistochemistry p16 status, CD3+ and CD8+ TILs and PD-L1 expression on tumor and immune cells, in stromal and intratumoral components.

Results:

The density of CD3+ TILs was significantly lower in intratumoral or stromal component ($p=0.003$ and $p=0.020$ respectively) in irradiated area. The expression of CD8+ TILs was not significantly different between the two cohorts. The percentage of tumor cells expressing PD-L1 TC (TPS $\geq$ 1%) was significantly lower in tumors developed within irradiated areas than in de novo tumors (56.0% vs 86.0%) ($p<0.001$). PD-L1+ immune cells were also fewer in irradiated areas. Predominant microenvironment type in irradiated area cohort was adaptative immune resistance.

Conclusion:

There were persistence of cytotoxic cells but lower expression of PD-L1 and CD3+ TILs in tumors in irradiated area than in de novo tumors. This study provides first hypothesis to explain that these lesions are less responsive to immunotherapy although they may still have antitumor capacity. The assessment of immune response biomarkers in patients treated by immunotherapy in randomized trials is required.

Keywords: head and neck cancer, squamous cell carcinoma, irradiated area, tumour microenvironment, radiotherapy, tumor-infiltrating lymphocytes, TIL, programmed death-ligand 1, PD-L1, HPV

Highlights:

- Immune landscape of HNSCC in irradiated area remains little known
- Expression of CD3+ TILs and expression of PD-L1 were significantly lower in irradiated area
- There was a persistent infiltration of CD8+ TILs in irradiated area
- Expression of PD-L1 on immune cells tended to be a PFS prognostic factor
- Assessment in randomized trials with immunotherapy is required

Introduction

Recurrent head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in previously irradiated area and not accessible to a local treatment have usually a bad prognosis with a median overall survival of less than one year in the first line setting [1–4]. Few therapeutic options are available mostly due to previous irradiation, difficulties to manage salvage surgery and often precarious overall conditions [5]. Today, salvage surgery remains the standard of care for selected operable and fit patients but leads to a high rate of both local and regional failures [1, 4]. Hence, the recent watershed of immunotherapy, particularly immune-check point inhibitors (ICI), renewed hope for recurrent and metastatic HNSCC, showing a reduction in risk of death of 30% for Nivolumab (Checkmate 141 trial) [3, 6] and 20% for Pembrolizumab (Keynote 040 trial) [6, 7]**.** The inhibition of negative regulators of immune checkpoints programmed cell death ligand-1 (PD-L1) by these antibodies and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) presence have been of greatest importance for antitumor immune response [8]. Yet, the immune landscape of pretreated areas remains little known, mainly because none of the randomized trial assessing ICI are stratified for pretreated area or not. Some investigators have already described the complexity of radio-induced alterations of growth factors and proinflammatory, profibrotic and proangiogenic cytokines [9, 10]. The expression of CD3+ and CD8+ TILs and PD-L1 remains to be determined and could support, if less prevalent, the strategy of introducing an ICI sooner in future therapeutic sequences, as it is assessed in current studies Keynote 048 [11], PembroRad (Clinical Trial NCT02707588), Keynote-412 (Clinical Trial NCT03040999) and REACH (Clinical Trial NCT02999087). Lastly, we focused on HNSCC locoregional recurrences as they have recently been described as a predominant site of hyperprogression compared to distant metastases after initiating an ICI, occurring in 29% of the cases [12] but may be lower and variable amongst solid tumors as Champiat and al explained [13]. We aimed to assess whether there is a difference in the

tumoral microenvironment in terms of biomarkers for tumor immune response between de novo tumors and those occurring in irradiated area.

Material and methods

Study design and patients

A total of 100 HNSCC tumor tissue specimens, from patients who had undergone surgery from January 2010 to November 2017 was analyzed and divided into two cohorts : 50 de novo tumors and 50 with a tumor locoregional recurrence occurring within irradiated area. Inclusion criteria were invasive squamous cell carcinoma, four locations (oral cavity, oropharynx, larynx, hypopharynx) and paraffin embedded surgical samples. Other histology, carcinoma in situ, stage T1N0M0, nasal or paranasal cavity, nasopharynx or frozen tissues were not included. All cases were recorded at the Institut de Cancérologie de Lorraine and tissue specimens were obtained from the tumor bank of the Institute (tumor bank certification FR17/81842500; norm NF S96-900). According to French regulation, patients were informed of the research performed with tumor tissue specimens and did not express opposition. We compared two parallel cohorts, de novo versus pre-treated area.

Histological assessment

Formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE) tumor tissue samples stained by hematoxylin, eosin and safran (HES) were reviewed by an experimented pathologist to check the quality and the representativity of the specimens that were selected for supplementary analysis using immunohistochemistry (IHC).

Immunohistochemical analysis

We used four monoclonal antibodies against PD-L1, based on previous assessments of PD-L1 expression [14] (clone SP263, rabbit monoclonal (Ventana®) Roche 13 Allée de la Piat, 38240 Meylan), CD3 (SP7, rabbit IgG, 6616 Owens Drive, Pleasanton, CA 94588 USA),

CD8 (clone C8/144B; Agilent Dako 3 av Canada, Parc Technopolis - Z.A. Courta, 91940 LES ULIS) and P16 (CINtec® anti-P16 antibody (1µg/ml) (Ventana Medical Systems inc, 1910E Innovation Park Drive, Tucson, Arizona, USA). P16 status was assessed as a surrogate marker of human papillomavirus (HPV) association. Threshold positivity was at least 70% of tumor cells stained with at least moderate to strong and nuclear and cytoplasmic staining [15]. The density of CD3+ and CD8+ TILs were measured quantitatively by counting each CD3+ or CD8+ cells in intratumoral and stromal compartment separately on photographs at magnification x20. Values were dichotomized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively. PD-L1 IHC expression, defined as membranous and cytoplasmic staining, was assessed on both tumor cells (TC) and immune cells (IC). For TC, threshold positivity was a tumor proportion score (TPS) ≥ 1% as described by [16, 17]. For IC, semi-quantitative assessment was done in both tumoral (categorized in 3 classes from 0 to 2) and stromal regions (categorized in 6 classes from 0 to 5). The expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral component and 2-5 for stromal component. We also characterized the immune phenotype of each group in four types as Teng and al described: type I (Adaptative immune resistance: PD-L1+/TILs high), type II (Immunological ignorance: PD-L1-/TILs low), type III (Intrinsic induction: PD-L1+/TILs low) and type IV (Immune tolerance: PD-L1-/TILs high) [18]. We considered positivity of TPS and CD8+ TILs at ≥ 1% and ≥ median number respectively.

Statistical analysis

Quantitative parameters were described as median, mean and standard deviation; qualitative parameters as frequency and percentage. The normality of the distribution was investigated by the Shapiro-Wilks test. The two groups were compared by Chi-square test or Fisher Exact test for qualitative parameters and by Mann-Whitney U test or Student t-test according to the

normality of the distribution. Each quantitative value of immune response biomarkers was dichotomized according to its median value. In order to adjust the comparisons of immune response biomarkers on confounding factors, the propensity score was computed with the two groups as dependent parameters, and with patient and tumor characteristics with a p-value less than 0.2 for the comparisons of the two groups. The inverse probability of treatment weighting (IPTW) was computed [19] and immune response biomarkers were compared by weighting analyses. Progression free survival was defined as the time between surgery and relapse, progression or death (which ever occurred first). In each group, the prognostic factors of progression free survival were investigated according to the following process. First bivariate analyses were performed with the Cox proportional hazard model. Parameters with a p-value less than 0.1 were introduced in multivariate Cox proportional hazard model with backward selection. Results were presented as hazard ratio and its 95% confidence interval. The statistical analyses were performed with SAS, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and significant level was set at 0.05.

Results

Patient and tumor characteristics are presented in Table 1. Mean age was 64.2±8.3 years in de novo cohort and 65.8±10.7 years in irradiated area cohort (p=0.457). The two groups were well-balanced according to the following criteria : gender (p=0.806), tumor location (p=0.743) and disease stage (p=0.873). Oropharyngeal tumors expressed significantly more p16 in de novo cohort (n=7, 43.8%) than in irradiated area (n=2, 10.5%). Tumors developed in irradiated areas were histologically less differentiated than de novo tumors (n=32 (64.0%) vs n=37 (74.0%) were well differentiated, p=0.051) and had more frequent pN2-N3 stage (n=38 (76.0%) vs n= 26 (52.0%), p=0.012). Resection margins were also significantly more positive (n=23 (46.0%) vs n=11 (22.0%), p=0.011) and lymphovascular (n=21 (58.3%) vs

n=13 (30.2%), p=0.012) or perineural invasion (n=28 (73.7%) vs n=23 (53.5%), p=0.060) were more frequently observed.

Characteristics of treatments are presented in Table 2. In irradiated cohort, twenty-two (44.0%) of the initial tumors were treated by surgery and postoperative radiotherapy, six (12.0%) by surgery and postoperative chemoradiation, ten (20.0%) by definitive chemoradiation, five (10.0%) by radiotherapy only and seven (14.0%) by induction chemotherapy and chemoradiation. Nineteen (44.2%) tumors in irradiated area cohort had a mean irradiation dose on tumor site recurrence ≥ 66 Gy (tumor and/or node). Treatments of the initial tumor for cohort in irradiated area are presented in Appendix 1.

Description of immune microenvironment (CD3+ and CD8+ TILs, TPS and PD-L1 IC) in intratumoral and stromal regions are shown in Table 3.

Expression of CD3+ TILs

The number of CD3+ TILs in intratumoral region was significantly lower in irradiated area cohort (20.5 [9.0 – 70.0] vs 58.0 [27.0 – 101.0], p = 0.003). Consequently, 66% of tumors (n=33) showed a low CD3+TILs count compared to 34% (n=17) in de novo group (p=0.001). Similar results were found for CD3 +TILs count in stromal region (p=0.016). 36% (n=18) of irradiated tumors had a low CD3+ TILs number in intratumoral and stromal region compared to 14% (n=7) in de novo group (p=0.001). Results were similar after IPTW method.

Expression of CD8+ TILs

The expression of CD8+ TILs did not differ between the two cohorts in intratumoral region nor in stromal region. Median number was 21.5 [3.0 – 64.0] in irradiated area cohort versus 30.0 [13.0 – 87.0] in de novo cohort in intratumoral compartment (p = 0.273) and 71.0 [24.0 – 131.0] versus 97.5 [48.0 – 158.0] in stromal compartment (p = 0.129).

Expression of PD-L1 TC+IC

The percentage of tumors expressing PD-L1 TC (TPS ≥ 1%) was significantly lower in

irradiated area than de novo tumors (56.0% vs 86.0%) (p<0.001) (Fig.1). Comparatively to de novo cohort, the percentage of PD-L1+ IC tumors in irradiated area cohort was significantly lower in intratumoral region (48.0% vs 72.0%, p = 0.014) and also lower in stromal region (62.0% vs 78.0%, p=0.081). One third of irradiated tumors had a negative TPS and a low PD-L1 IC (Fig.1) compared to 10% in de novo cohort (p = 0.004). Results were similar after IPTW method.

Immune phenotype

The proportion of phenotype I to IV in each cohort is presented in Figure 2. Adaptative immune resistance (Type I) represented 66% of patients in de novo cohort vs 52% in irradiated area cohort whereas types II and IV were more present in irradiated area cohort (p=0.032 in bivariate analyses and p<0.001 after IPTW method).

Median follow-up time was 18 months with an interquartile range from 10 to 27. The microenvironment (CD3+ and CD8+ TILs, TPS and PD-L1 IC) was not significantly associated with PFS for de novo cohort (Appendix 1) nor for irradiated cohort (Appendix 2).

Discussion

This study aimed to assess immune antitumoral response biomarkers in HNSCC occurring in irradiated area as few data are currently available. In irradiated area tumors, compared to de novo tumors, we observed a significant lower infiltration of CD3+ TILs, whether in intratumoral or stromal regions, a significant lower expression of PD-L1 on tumor cells and immune cells and no difference of CD8+ TILs infiltration, except for the high number of intratumoral CD8+ TILs, which was considered as a statistical artifact. As there are no randomized clinical trials stratified for pre-treated area, we had no comparative data and it might have been expected a lower expression of PD-L1 TC and PD-L1 IC or TILs whether in

intratumoral or stromal compartment as ICI seem to be less effective for locoregional relapses than for metastatic lesions for patients treated with ICI [3]. Our results confirm the hypothesis that antitumoral treatments modify the recurrent tumors microenvironment.

In irradiated area cohort, we observed a lower CD3+ TILs count, which may presume that pretreated tumors belong to immunologically unresponsive tumors group, as Yuan and al described [20]. However, there was a persistent infiltration of CD8+ TILs in irradiated area. The CD8+ TILs are cytotoxic T lymphocytes and therefore play a major role in antigen-specific antitumoral immune responses [21]. The level of CD8+ and CD3+ TILs has a prognostic value as described in several malignant tumors [22–25]. Even if slightly less than in de novo cohort, radiation therapy or chemoradiation do not significantly affect their presence. It therefore highlights the faculty of irradiated tissues of having an antitumoral action as the main driver leading to immune response is the preexistence of antitumor cytotoxic T cells, which were specifically hampered by immune checkpoints [8]. It may emphasize that radiotherapy has been described as having the capacity of recruiting CD8+ TILs that are specific to tumor antigens and increasing the expression of PD-L1 [26].

Moreover, it interestingly constitutes a strong rational to introduce ICI in tumour occurring in already pre-treated areas in order to activate cytotoxic antitumoral immune response, as it is being assessed in ADJORL trial (Clinical Trial NCT03406247), which reviews immunotherapy after salvage surgery for pre-treated tumors.

The CD3+ TILs are important as CD3 is a T cell co-receptor that helps for activation of both cytotoxic cells and T helper cells. The persistent rate of cytotoxic CD8+ TILs and the reduction of CD3+ TILs could reflect a decrease of other classes of LT such as LT helper or LT regulator. Our results cannot explain why locoregional recurrences can be the seat of hyperprogression when using ICI and other mechanisms are more likely to be involved. To date, we do not yet understand why the rate of hyperprogression, which can range from 9 to

29%, is greater in locoregional recurrences compared to distant metastases and should be more investigated through prospective trials [12, 13, 27]

Significantly fewer tumors in irradiated area cohort expressed PD-L1 on tumor cells than in de novo cohort but more than half (56%) was positive with our cut-off of 1%. This lower expression may provide first answers of why they are less responsive to immunotherapy and arguments to give rise to an earlier indication of ICI in therapeutic strategies for HNSCC, associated or not with cytotoxic agents or radiation. That was the purpose of Keynote-048 phase III randomized trial that showed a significant longer OS in the frontline setting with the anti-PD-1 Pembrolizumab monotherapy versus EXTREME regimen (12.3 vs 10.3 months for the PD-L1 CPS ≥ 1 patients and 14.9 vs 10.7 months for the PD-L1 CPS≥ 20 patients) [28]. The arm Pembrolizumab with chemotherapy also showed a significant longer OS in the frontline setting versus EXTREME regimen (13.6 vs 10.4 months for PD-L1 CPS ≥ 1 patients and 14.7 vs 11.0 months for PD-L1 CPS≥ 20 patients) [11].

As for PembroRad Phase II randomized trial (Clinical Trial NCT02707588), which is evaluating Pembrolizumab combined with RT versus Cetuximab combined with RT in locally advanced HNSCC (LA HNSCC), preliminary data seem to indicate a good tolerance [29]. Other trials are assessing combination strategies with ICI, such as REACH trial with anti-PD-L1 Avelumab combined with cetuximab and RT (Clinical Trial NCT02999087), KEYNOTE-412 trial with Pembrolizumab combined with chemoradiation (Clinical Trial NCT03040999) in LA HNSCC or JAVELIN trial, assessing Avelumab in combination with chemoradiation in LA HNSCC (Clinical Trial NCT02952586).

Interestingly, this study indicates that tumors in irradiated area could be the best candidates to add an anti-CTLA4 to anti-PD-1/PD-L1 agents as we found a significant lower expression of PD-L1 on tumor cells. Indeed, anti-CTLA4 agents seem to recruit CD8+ TILs and combination with anti-PD-1/anti-PD-L1 agents has a strong rational to induce antitumoral

immune response, especially when expression of PD-L1 is low. Trials assessing combination of anti-CTLA4 and anti-PD-1/PD-L1 are ongoing such as KESTREL phase III randomized trial (Clinical Trial NCT02551159) or CheckMate 651 phase III randomized trial (Clinical Trial NCT02741570). However, CheckMate 714 phase II being negative, combination of chemotherapy and immunotherapy could have a better interest than a combination of immunotherapy (Clinical Trial NCT02823574).

The threshold of TPS can differ from other studies on HNSCC ranging from 1 to 50% as cut-off , illustrating all the debate on heterogeneity of choices [3, 7, 25, 30]. Data from intratumoral and stromal regions were associated to illustrate the necessity to take into account the stromal component, leading to emergent combined scores where there is currently no mutual agreement on which ones are more likely to be used [6]. Combined Positive Score (CPS) is one of these emergent scores, predicting response to Pembrolizumab, which takes into account immune cells and total number of tumor cells [7, 28]. Elevated pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) can also predict poor prognosis with local and distant disease [31].

Immune phenotype

Predominant microenvironment type in irradiated area cohort was adaptative immune resistance (Type I). Yang and al noted that HNSCC had typically diverse profiles of TILs, dividing them into two main categories: inflamed or non-inflamed [21]. This study shows that tumors in irradiated area can be still inflamed and ties up with Teng and al, that anti-PD-1-PD-L1 may be most effective with Type I / inflamed microenvironment because of pre-existing intratumor T cells [18, 32]. The persistent infiltration of CD8+ TILs shown in this study is encouraging for this peculiar entity of tumors occurring in irradiated since CD8+ TILs have recently been presented as a promising favorable prognostic biomarker in HNSCC after adjuvant chemoradiation [25]. However, illustrating the known poor prognosis of these

tumors, CD8+ TILs may be dysfunctional T cells, as Psyrri and al mentioned when studying the mechanisms of resistance to Nivolumab [33].

Prognostic factors were consistent in de novo cohort such as advanced stage and site of disease, where hypopharynx location is commonly described as having a poorer prognosis [34, 35]. Expression of PD-L1 on immune cells tended to be a PFS prognostic factor. In irradiated area cohort, no relevant prognostic factor was underlined, which could be explained by such an initial poor prognosis. Indeed, we reach the same characteristics that are usually depicted as conferring bad prognosis of locoregional relapses: poor differentiation, high pN stage, positive resection margins and lymphovascular or perineural invasion (Table 1).

Yang and al have proposed a meta-analysis of studies that assessed the prognostic role of PD-L1 expression in HNSCC [21]. They concluded that PD-L1 could not be recommended as a prognosis factor in HNSCC, nor could he to stratify the risk in HPV-related HNSCC.

While PD-L1 has mainly been described as prognostic factor on tumour cells (PD-L1 TC), the importance of immune cells (PD-L1 IC) has made strides. Indeed, Kim and al depicted PD-L1 IC as a favourable prognostic factor in HNSCC with a positivity cut-off of 5% [36]. Moreover, the 2-year follow-up data from CheckMate 141 described a longer median survival for the patients with PD-L1 <1% on tumor cells. The hypothesis was that PD-L1-negative patients may benefit from ICI because of PD-L1 expression in stromal cells [37]. PD-L1 IC was also a prognostic factor in HNSCC [36] and some trial begin to use it commonly such as IMPASSION 130 trial in triple negative breast cancer [38].

As limitations, this study has bias of retrospective studies and patients were not treated with ICI as clinical trials using immunotherapy were ongoing.

Conclusion

In conclusion, our results show the persistence of cytotoxic cells but lower expression of PD-L1 and CD3+ TILs in tumors in irradiated area. This study provides first hypothesis to explain the fact that these lesions are less responsive to immunotherapy although they may still have antitumor capacity. The assessment of immune response biomarkers in patients treated by immunotherapy in randomized trials is required to decipher the molecular mechanisms involved in acquired resistance to treatments.

Conflict of interest statement: The authors have declared no conflicts of interest with respect to the study.

Financial support : Institut de Cancérologie de Lorraine

Acknowledgements: The manuscript has been revised for the English by an independent scientific language editing service (Angloscribe).

Appendix 1 and 2. Supplementary material

References

[1] Janot F, de Raucourt D, Benhamou E, et al. Randomized trial of postoperative reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery compared with salvage surgery alone in head and neck carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; 26: 5518–5523.

[2] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1116–1127.

[3] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; 375: 1856–1867.

[4] Tao Y, Faivre L, Laprie A, et al. Randomized trial comparing two methods of re-irradiation after salvage surgery in head and neck squamous cell carcinoma: Once daily split-course radiotherapy with concomitant chemotherapy or twice daily radiotherapy with cetuximab. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2018; 128: 467–471.

[5] Ho AS, Kraus DH, Ganly I, et al. Decision making in the management of recurrent head and neck cancer. *Head Neck* 2014; 36: 144–151.

[6] Oliva M, Spreafico A, Taberna M, et al. Immune biomarkers of response to immune-checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019; 30: 57–67.

[7] Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl* 2019; 393: 156–167.

[8] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018; 359: 1350–1355.

[9] Phulpin B, Dolivet G, Marie P-Y, et al. Re-assessment of chronic radio-induced tissue damage in a rat hindlimb model. *Exp Ther Med* 2010; 1: 553–560.

[10] Gallet P, Phulpin B, Merlin J-L, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and relation with histological severity scoring. *PloS One* 2011; 6: e29399.

[11] Rischin D, Harrington KJ, Greil R. Protocol-specified final analysis of the phase 3 KEYNOTE-048 trial of pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). Abstract 6000, ASCO 2019.

[12] Saâda-Bouzid E, Defaucheux C, Karabajakian A, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Epub ahead of print 13 April 2017. DOI: 10.1093/annonc/mdx178.

[13] Champiat S, Ferrara R, Massard C, et al. Hyperprogressive disease: recognizing a novel pattern to improve patient management. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 748–762.

[14] Smith J, Robida MD, Acosta K, et al. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagn Pathol* 2016; 11: 44.

[15] Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2018; 36: 3152–3161.

[16] Ono T, Azuma K, Kawahara A, et al. Association between PD-L1 expression combined with tumor-infiltrating lymphocytes and the prognosis of patients with

advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 92699–92714.

[17] Solomon B, Young RJ, Bressel M, et al. Prognostic Significance of PD-L1+ and CD8+ Immune Cells in HPV+ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. Epub ahead of print 29 January 2018. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0299.

[18] Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015; 75: 2139–2145.

[19] Rosenbaum PR. Optimal Matching for Observational Studies. *J Am Stat Assoc* 1989; 84: 1024–1032.

[20] Yuan J, Hegde PS, Clynes R, et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2016; 4: 3.

[21] Yang W-F, Wong MCM, Thomson PJ, et al. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018; 86: 81–90.

[22] Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011; 105: 93–103.

[23] Thomas NE, Busam KJ, From L, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2013; 31: 4252–4259.

[24] Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014; 32: 2959–2966.

[25] Balermpas P, Rödel F, Krause M, et al. The PD-1/PD-L1 axis and human papilloma virus in patients with head and neck cancer after adjuvant chemoradiotherapy: A multicentre study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* 2017; 141: 594–603.

[26] Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014; 74: 5458–5468.

[27] Champiat S, Dercle L, Ammari S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2017; 23: 1920–1928.

[28] Burtness B, Harrington KJ, Greil R. KEYNOTE-048: phase 3 study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC) Abstract LBA8_PR, ESMO 2018.

[29] Sun XS. A phase II randomized trial of pembrolizumab versus cetuximab, concomitant with radiotherapy (RT) in locally advanced (LA) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): First results of the GORTEC 2015-01 “PembroRad” trial.

[30] Zandberg DP, Algazi AP, Jimeno A, et al. Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from a single-arm, phase II study in patients with ≥25% tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2019; 107: 142–152.

[31] Yu Y, Wang H, Yan A, et al. Pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in determining the prognosis of head and neck cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2018; 18: 383.

[32] Lei Y, Xie Y, Tan YS, et al. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. *Oral Oncol* 2016; 61: 159–165.
[33] Psyrri A, Gavrielatou N, Spathis A. Predictive biomarkers for response to nivolumab in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), Abstract 6060, ASCO 2019.
[34] Mehanna H, West CML, Nutting C, et al. Head and neck cancer--Part 2: Treatment and prognostic factors. *BMJ* 2010; 341: c4690.
[35] Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, et al. Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-facc* 2017; 37: 458–466.
[36] Kim HR, Ha S-J, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6: 36956.
[37] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* 2018; 81: 45–51.
[38] Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2108–2121.

Tables and Figures

Figures

Figure 1: Representative microphotograph of immunohistochemical staining of CD3, CD8, PD-L1 and p16 in cohort irradiated area (magnification x20). (A) High CD3+ TILs, (B) Low CD3+ TILs, (C) High CD8+ TILs, (D) Low CD8+ TILs, (E) Positive PD-L1 on tumor cells (TC) and low PD-L1 on immune cells (IC), (F) Negative PD-L1 TC and high PD-L1 IC, (G) Negative PD-L1 TC and low PD-L1 IC and (H) Positive P16 status.

Figure 2: Distribution of immune phenotype in irradiated area tumors (a) and in de novo tumors (b) among four types. 1) TYPE I: Adaptative immune resistance (TPS+/CD8+ TILs high), 2) TYPE II: Immunological ignorance (TPS-/CD8+ TILs low), 3) TYPE III: Intrinsic induction (TPS+/CD8+ TILS low) and 4) TYPE IV: Immune tolerance (TPS-/CD8+ TILs high).

Tables

Table 1: Patient and tumor characteristics

Footnotes: Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation. AJCC, American Joint Committee on Cancer; WHO, World Health Organization

NA Non applicable

* Computed for 97 patients since 3 patients with lymphatic recurrence only in irradiated area

** Only for patients with oropharyngeal cancer

Table 2: Characteristics of treatments for irradiated area cohort

Footnotes: Results presented with frequency and percentage (n%)

CT, Chemotherapy; Q3w, Every three weeks; RT, RadioTherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; T/N Tumor/node

- Comprising tumor progression

** Comprising Erbitux

Table 3: Description of the expression of biomarkers in irradiated area compared to de novo tumors

Footnotes: Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation

IC, Immune cells; PD-L1, Programmed death-ligand 1; TC, Tumor Cells; TPS, Tumor Proportion Score

For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively. Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.

Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.

* Magnification x20

Table 4: Prognostic factors of PFS for de novo cohort in univariate and multivariate analyses

Footnotes: HR 95% CI Hazard ratio 95% confidence interval, AJCC, American Joint Committee on Cancer; IC, Immune cells; PD-L1, Programmed death-ligand 1; PFS, Progression-free survival; TILs, Tumor-Infiltrating Lymphocytes; TPS, Tumor Proportion Score; WHO, World Health Organization

Footnotes: For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively.

Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.

Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.

APPENDIX 1: Treatments of the initial tumor for irradiated area cohort

Footnotes: Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation. CT, Chemotherapy; Gy, Gray; IMRT, Intensity-Modulated Radiation Therapy; Q3w, Every three weeks; RT, Radiotherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; T/N Tumor/Node; TPF, Docetaxel, cisPlatin and Fluorouracil; 3D, Three-dimensional; 5 FU, 5 fluorouracil

* Comprising tumor progression

** Comprising Erbitux

APPENDIX 2: Prognostic factors of PFS for irradiated area cohort in univariate and multivariate analyses

Footnotes: HR 95% CI Hazard ratio 95% confidence interval, AJCC, American Joint Committee on Cancer; CT, Chemotherapy; Gy, Gray; IC, Immune cells; IMRT, Intensity-modulated radiation therapy; PD-L1, Programmed death-ligand 1; RT, Radiotherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; TC, Tumor cells; TILs, Tumor-Infiltrating Lymphocytes; TPS, Tumor proportion score ; Tum, Tumoral ; T/N Tumor/Node; Stro, Stromal; WHO, World Health Organization; 3D, Three-dimensional

For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively.

Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.

Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.

$^{\Delta}$ Computed on the 43 patients with radiotherapy (T and/or N)

*Calculated for the 29 patients that had locoregional recurrence

Table 1: Patient and tumor characteristics

Characteristics, n (%)	De novo (n=50)	Irradiated area (n=50)	p
Age (years)	62.1; 64.2±8.3	64.9; 65.8±10.7	0.457
Male gender	40 (80.0)	39 (78.0)	0.806
Smoking			
Never smoker	7 (14.2)	4 (8.3)	0.289
Current smoker	21 (42.9)	16 (33.2)	
Former smoker	21 (42.9)	28 (58.4)	
Smoking history (pack*year)	40.0; 41.1±15.3	40.0; 42.2±17.8	0.964
Alcohol			
Yes	27 (55.1)	31 (68.9)	0.170
No	22 (44.9)	14 (31.1)	
Former drinker	9 (33.3)	11 (36.7)	0.792
WHO performance status			
0	28 (56.0)	22 (44.0)	0.453
1	21 (42.0)	26 (52.0)	
2	1 (2.0)	2 (4.0)	
Tumor location *			
Oral cavity	20 (40.0)	15 (31.9)	0.743
Oropharynx	16 (32.0)	19 (40.4)	
Larynx	6 (12.0)	7 (14.9)	
Hypopharynx	8 (16.0)	6 (12.8)	
Status P16 pos (> 70%) **	7 (43.7)	2 (10.5)	**0.025**
Differentiation			
Well differentiated	37 (74.0)	32 (64.0)	**0.051**
Moderately/Poorly	5 (10.0)	14 (28.0)	
Undifferentiated	8 (16.0)	4 (8.0)	
pT stage			
Tx - T1 - T2	35 (70.0)	28 (56.0)	0.147
T3 - T4	15 (30.0)	22 (44.0)	
pN stage			
Nx - N0 - N1	26 (52.0)	38 (76.0)	**0.012**
N2 - N3	24 (48.0)	12 (24.0)	
AJCC 8 disease stage			
I - II	20 (40.0)	18 (36.0)	0.873
III	11 (22.0)	13 (26.0)	
IV	19 (38.0)	19 (38.0)	
Resection margins			
Positive (R1 or R2)	11 (22.0)	23 (46.0)	**0.011**
Negative (R0 or limit)	39 (78.0)	27 (54.0)	
Lymphovascular invasion	13 (30.2)	21 (58.3)	**0.012**
Perineural invasion	23 (53.5)	28 (73.7)	**0.060**
Number of lymphadenopathies	2.0; 4.2±9.8	2.0; 3.2±2.9	0.992
Number of nodes removed	38.0; 41.5±17.7	13.0; 16.3±16.5	**<0.001**
Extranodal spread	22 (66.7)	11 (73.3)	0.644

Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation
AJCC, American Joint Committee on Cancer; WHO, World Health Organization
* Computed for 97 patients since 3 patients with lymphatic recurrence only in irradiated area
** Only for patients with oropharyngeal cancer

Table 2: Characteristics of treatments for irradiated area cohort

Characteristics, n (%) for irradiated cohort (n=50)	
Type of tumor	
Locoregional recurrence beyond initial treatment*	29 (58.0)
> 6 months	20 (69.0)
≤ 6 months	9 (31.0)
New location	21 (42.0)
Median time of new location (years)	10.1 [3.4-13.1]
Treatment of the initial tumor	
Type of treatment	
Surgery T/N + RT	22 (44.0)
Surgery T/N + RTCT	6 (12.0)
Definitive RTCT**	10 (20.0)
RT only	5 (10.0)
Induction chemotherapy + RTCT	7 (14.0)
Surgery T/N of the initial tumor	28(56.0)
Type of RT $^{\Delta}$	
3D	22 (51.1)
IMRT	21(48.8)
Dose on tumor site recurrence (T and/or N) ≥ 66Gy$^{\Delta}$	21 (48.8)
Mean dose on tumor site recurrence (T and/or N) ≥ 66Gy$^{\Delta}$	19 (44.2)
Overall Treatment Time (days) > 6 weeks$^{\Delta}$	20 (46.5)
Treatment of the tumor in irradiated area	
Salvage surgery	50 (100)
Tumor surgery	47 (97.9)
Neck dissection	41 (82.0)
Homolateral	13 (31.7)
Bilateral	28 (68.3)
Re-irradiation only	1 (2.0)
Re-irradiation with CT (post-operative VOKES protocol)	4 (8.0)

Results presented with frequency and percentage (n%)
CT, Chemotherapy; Q3w, Every three weeks; RT, Radiotherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; T/N Tumor/Node
* Comprising tumor progression
** Comprising Erbitux $^{\Delta}$ Computed on the 43 patients with radiotherapy

Table 3: Description of the expression of immune response biomarkers in irradiated area compared to de novo tumors

Biomarkers	**De novo (n=50)**	**Irradiated area (n=50)**	p-value	Adjusted p-value[α]
CD3+TILs *				
Intratumoral				
Number	58.0 [27.0 – 101.0]	20.5 [9.0 – 70.0]	0.003	0.088
High	33(66%)	17(34%)	0.001	**<0.001**
Stromal				
Number	185.5 [107.7 – 361.0]	139.0 [63.0 – 215.0]	0.020	**0.046**
High	30(60%)	18(36%)	0.016	**0.008**
Intratumoral low and Stromal low	7(14%)	18(36%)	0.011	**0.001**
CD8+TILs *				
Intratumoral				
Number	30.0 [13.0 – 87.0]	21.5 [3.0 – 64.0]	0.273	0.261
High	25(50%)	21(42%)	0.422	**0.005**
Stromal				
Number	97.5[48.0 – 158.0]	71.0[24.0 – 131.0]	0.129	0.121
High	28(56%)	24(48%)	0.423	0.577
Intratumoral low and Stromal low	15(30%)	16(32%)	0.829	0.098
PD-L1*				
Tumor proportion score (TPS) ≥ 1%	43(86%)	28(56%)	<0.001	**<0.001**
Immune cells (IC)				
Intratumoral = High	36(72%)	24(48%)	0.014	**<0.001**
Stromal = High	39(78%)	31(62%)	0.081	0.058
TPS < 1% and Intratumoral = 0	5(10%)	17(34%)	0.004	**<0.001**

Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation
IC, Immune cells; PD-L1, Programmed death-ligand 1; TC, Tumor cells; TPS, Tumor proportion score
For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively.
Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.
Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.
* Magnification x20
[α] Analyses were adjusted by the Inverse probability of treatment weighting method using the Propensity Score

Table 4: Prognostic factors of PFS for de novo cohort in univariate and multivariate analyses

Characteristics	**Univariate**		**Multivariate**	
	HR 95% IC	p-value	HR 95% IC	p-value
Age (years)		0.139		
≤ 60	1			
> 60	2.29 [0.76 - 6.87]			
Gender		0.334		
Male	0.60 [0.21 - 1.69]			
Female	1			
Smoking		0.603		
Current smoker	1			
Former smoker	1.59 [0.60 - 4.19]			
Never smoker	0.99 [0.20 - 4.77]			
Alcohol		0.458		
Yes	1.42 [0.56 - 3.62]			
No	1			
Tumor location		**0.003**		
Other	1			
Hypopharynx	4.08 [1.59 - 10.45]			
Oropharynx location and p16		0.167		
Oropharynx p16 +	1			
Oropharynx p16 -	4.57 [0.53 - 39.26]			
Differentiation		0.331		
Moderately/Poorly /Undifferentiated	1			
Well differentiated	1.73 [0.57 – 5.22]			
pT stage		0.921		
Tx - T1 – T2	1			
T3 – T4	0.95 [0.37 - 2.48]			
pN stage		**0.014**		
Nx - N1 - N2	1			
N3 - N4	3.34 [1.28 - 8.72]			
AJCC 8		0.009		
I - II	1			
III	0.62 [0.12 - 3.21]			
IV	3.62 [1.29 - 10.18]			
Smoking history (pack*year)		0.422		
< 40	1			
> 40	1.44 [0.59 - 3.49]			
Former drinker		0.996		
Yes	1.00 [0.30 - 3.32]			
No	1			
Resection margins		**0.044**		**0.015**
Positive (R1 or R2)	1		**1**	
Negative (RO or limit)	0.38 [0.15 - 0.97]		**4.10 [1.31-12.79]**	
Lymphovascular invasion		**0.007**		
Oui	4.36 [1.49 - 12.76]			
Non	1			
Perineural invasion		**0.019**		**0.021**
Oui	4.61 [1.29 - 16.45]		**5.16 [1.28-20.80]**	
Non	1		**1**	
Number of lymphadenopathies		**0.001**		**0.037**
1	1		**1**	
> 1	5.29 [1.92 - 14.62]		**3.90 [1.09-14.02]**	
Number of nodes removed		0.068		
< 30	1			
≤ 30	2.36 [0.94 - 5.91]			
Extranodal spread		0.503		

Oui	1	
Non	1.40 [0.52 - 3.76]	
P16		0.116
Positive (≥ 70%)	1	
Negative (< 70%)	5.08 [0.67 - 38.49]	
TPS		0.092
< 1	**2.42 [0.86 – 6.80]**	
≥ 1	**1**	
PD-L1 IC Intratumoral		0.159
Low	1.91 [0.78 – 4.71]	
High	1	
Combined score		**0.075**
TPS < 1% AND PD-L1 IC Intratumoral = 0	**2.74 [0.90 – 8.31]**	
TPS ≥ 1% OR PD-L1 IC Intratumoral ≥ 1	**1**	
PD-L1 IC Stromal		0.052
Low	2.50 [0.99 – 6.31]	
High	1	
CD3 Intratumoral		0.935
Low	0.96 [0.38 – 2.41]	
High	1	
CD3 Stromal		0.208
Low	1.76 [0.73 – 4.25]	
High	1	
CD3 Intratumoral + Stromal		0.953
CD3 Intratumoral low AND CD3 stromal low	0.96 [0.28 – 3.29]	
CD3 Intratumoral high OR CD3 stromal high	1	
CD8 Intratumoral		0.864
Low	1.08 [0.45 - 2.61]	
High	1	
CD8 stromal		0.185
Low	1.83 [0.75 -4.46]	
High	1	
CD8 Intratumoral + Stromal		0.194
CD8 Intratumoral low AND CD8 Stromal low	1.81 [0.74 – 4.44]	
CD8 Intratumoral high OR CD8 Stromal high	1	

HR 95% CI Hazard ratio 95% confidence interval, AJCC, American Joint Committee on Cancer; IC, Immune cells; PD-L1, Programmed death-ligand 1; PFS, Progression-free survival; TPS, Tumor proportion score; WHO, World Health Organization

For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively.
Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.
Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.

APPENDIX 1: Treatments of the initial tumor for irradiated cohort

Characteristics, n (%)	
Surgery	28 (56.0)
Tumor surgery	27 (96.4)
Neck dissection	27 (96.4)
Homolateral	10 (38.5) ?? cela fait 26 ?
Bilateral	16 (61.5)
Surgery T/N + RT	22 (44.0)
Type of RT	
3D	13 (59.1)
IMRT	9 (40.9)
Dose on tumor site recurrence (T and/or N)(Gy)	55.0; 56.3±8.8
Number of fractions	27.0; 28.1±4.5
Overall Treatment Time (days)	37.5; 55.8±86.6
Mean dose on tumor site recurrence (T and/or N)* (Gy)	50.0; 53.8±13.0
Surgery T/N + RTCT	6 (12.0)
RT	
Type of RT	
3D	2 (33.3)
IMRT	4 (66.7)
Dose on tumor site recurrence (T and/or N)(Gy)	66.0; 63.6±7.0
Number of fractions	33.0; 32.2±4.6
Overall Treatment Time (days)	44.0; 45.2±9.9
Mean dose on tumor site recurrence (T and/or N)* (Gy)	64.6; 60.3±7.9
CT	
Cisplatine Q3w	6 (100)
Duration of CT (days)	32.5; 32.5±11.9
Number of cycles	
2	3 (50)
3	3 (50)
Definitive RTCT**	10 (20.0)
RT	
Type of RT	
3D	3 (30.0)
IMRT	7 (70.0)
Dose on tumor site recurrence (T and/or N)(Gy)	70.0; 67.5±6.3
Number of fractions	34.0; 33.1±3.1
Overall Treatment Time (days)	51.5; 49.0±16.1
Mean dose on tumor site recurrence (T and/or N)* (Gy)	70.0; 67.5±6.3
CT	
Type of CT	
Cisplatin Q3w	2 (20.0)
Carboplatin 5 FU	1 (10.0)
Erbitux	4 (40.0)
Other	3 (30.0)
Duration of CT (days)	43.5; 45.5±11.6
Number of cycles	5.0; 5.2±2.6
RT only	5 (10.0)
Type of RT	
3D	4 (80.0)

IMRT	1 (20.0)
Dose on tumor site recurrence (T and/or N)(Gy)	50.0; 57.2±10.0
Number of fractions	25.0; 28.6±5.0
Overall Treatment Time (days)	35.0; 37.0±4.5
Mean dose on tumor site recurrence (T and/or N)* (Gy)	50.0; 57.2±10.0
Induction chemotherapy + RTCT	7 (14.0)
TPF	7 (100)
Number of cycles of TPF	50.0; 57.2±10.0

Results presented with frequency and percentage (n%) or by median; mean ± standard deviation
CT, Chemotherapy; Gy, Gray; IMRT, Intensity-modulated radiation therapy; Q3w, Every three weeks; RT, Radiotherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; T/N Tumor/Node; TPF, Docetaxel, cisplatin and fluorouracil; 3D, Three-dimensional; 5 FU, 5 fluorouracil
* Comprising tumor progression
** Comprising Erbitux

APPENDIX 2: Prognostic factors of PFS for irradiated cohort in univariate and multivariate analyses

Characteristics	**Univariate**		**Multivariate**	
	HR 95% IC	p-value	HR 95% IC	p-value
Age > 60 years	0.87 [0.43 - 1.75]	0.699		
Male gender	1.24 [0.58 - 2.63]	0.581		
Smoking		0.405		
Current smoker	1			
Former smoker	0.80 [0.40 - 1.62]			
Never smoker	1.67 [0.54 - 5.20]			
Alcohol	0.74 [0.37 - 1.47]	0.387		
Tumor location hypopharynx	1.03 [0.37 – 2.91]	0.953		
Oropharynx p16 -	0.81 [0.18 - 3.71]	0.785		
Tumor well differentiated	0.95 [0.49 – 1.83]	0.885		
pT3 – pT4	1.32 [0.71 - 2.48]	0.379		
pN3 - pN4	0.84 [0.40 - 1.78]	0.653		
AJCC 8		0.730		
I - II	1			
III	1.38 [0.62 - 3.06]			
IV	1.13 [0.54 - 2.35]			
Smoking history (pack*year) ≥ 40	0.71 [0.37 - 1.33]	0.281		
Former drinker	0.59 [0.23 - 1.55]	0.289		
Positive resection margins (R1 ou R2)	1.12 [0.60 – 2.07]	0.729		
Lymphovascular invasion	1.33 [0.62 - 2.85]	0.471		
Perineural invasion	1.42 [0.60 - 3.33]	0.425		
Number of lymphadenopathies > 1	0.70 [0.31 - 1.55]	0.3759		
Number of nodes removed ≥ 30	0.22 [0.03 - 1.68]	0.145		
Extranodal spread	1.85 [0.38 - 9.03]1	0.447		
P16 Negative (< 70%)	0.41 [0.12 - 1.40]	0.156		
TPS ⩾1 %	0.92 [0.49 – 1.73]	0.799		
PD-L1 IC Intratumoral low	0.84 [0.45 – 1.56]	0.584		
PD-L1 IC Stromal low	0.87 [0.46 – 1.64]	0.668		
TPS < 1% et PD-L1 IC Intratumoral = 0	0.69 [0.35 – 1.37]	0.291		
CD3 Intratumoral low	1.31 [0.68 – 2.50]	0.420		
CD3 Stromal low	0.98 [0.51 – 1.90]	0.957		
CD3 Intratumoral low AND CD3 stromal low	1.22 [0.63 – 2.35]	0.559		
CD8 Intratumoral low	1.25 [0.67 – 2.33]	0.487		
CD8 Stromal low	0.90 [0.48 – 1.68]	0.730		
CD8 Intratumoral low AND CD8 stromal low	1.30 [0.67 – 2.53]	0.434		
Treatment of the initial tumor		0.849		
Surgery T/N + RT	0.62 [0.24 – 1.60]			
Surgery T/N + RTCT	1			
Definitive RTCT	0.55 [0.19 – 1.62]			
RT only	0.65 [0.18 – 1.62]			
Induction chemotherapy + RTCT	0.57 [0.16 – 1.62]			
Surgery T/N of the initial tumor	1.19 [0.63 – 2.22]	0.589		
Type of RT on the initial tumor$^{\Delta}$		0.058		0.002
IMRT vs. 3D	1.89 [0.97 – 3.66]		3.30 [1.53-7.14]	
Dose on tumor site recurrence (Gy)$^{\Delta}$	0.54 [0.28 – 1.07]	0.076	0.31 [0.14-0.67]	0.003
Mean dose on tumor site recurrence (Gy)$^{\Delta}$	0.51 [0.26 – 1.02]	0.057		
Overall Treatment Time (days) > 6 weeks$^{\Delta}$	1.42 [0.74 – 2.72]	0.295		
Locoregional recurrence ≤ 6months*	1.18 [0.48-2.94]	0.131		

HR 95% CI Hazard ratio 95% confidence interval, AJCC, American Joint Committee on Cancer; CT, Chemotherapy; Gy, Gray; IC, Immune cells; IMRT, Intensity-modulated radiation therapy; PD-L1, Programmed death-ligand 1; RT, Radiotherapy; RTCT, Chemoradiotherapy; TC, Tumor cells; TILs, Tumor-Infiltrating Lymphocytes; TPS, Tumor proportion score ; Tum, Tumoral ; T/N Tumor/Node; Stro, Stromal; WHO, World Health Organization; 3D, Three-dimensional

For CD3+ and CD8+ TILs count, values were binarized (low/high) according to median number on the whole population and considered high if > 40 and > 30 in intratumoral region respectively, > 160 and > 90 in stromal region respectively.

Expression of PD-L1 TC was considered positive if TPS ≥ 1%.

Expression of PD-L1 IC was considered high for score 1-2 in intratumoral region and 2-5 for stromal region.

$^{\Delta}$ Computed on the 43 patients with radiotherapy (T and/or N) *Calculated for the 29 patients that had locoregional recurrence

Figure 1: Representative microphotograph of immunohistochemical staining of CD3, CD8, PD-L1 on tumor cells (TC) and immune cells (IC) and p16 in cohort irradiated area (magnification x20). (A) High CD3+ TILs, (B) Low CD3+ TILs, (C) High CD8+ TILs, (D) Low CD8+ TILs, (E) Positive PD-L1 TC and low PD-L1 IC (F) Negative PD-L1 TC and high PD-L1 IC, (G) Negative PD-L1 TC and low PD-L1 IC and (H) Positive P16 status.

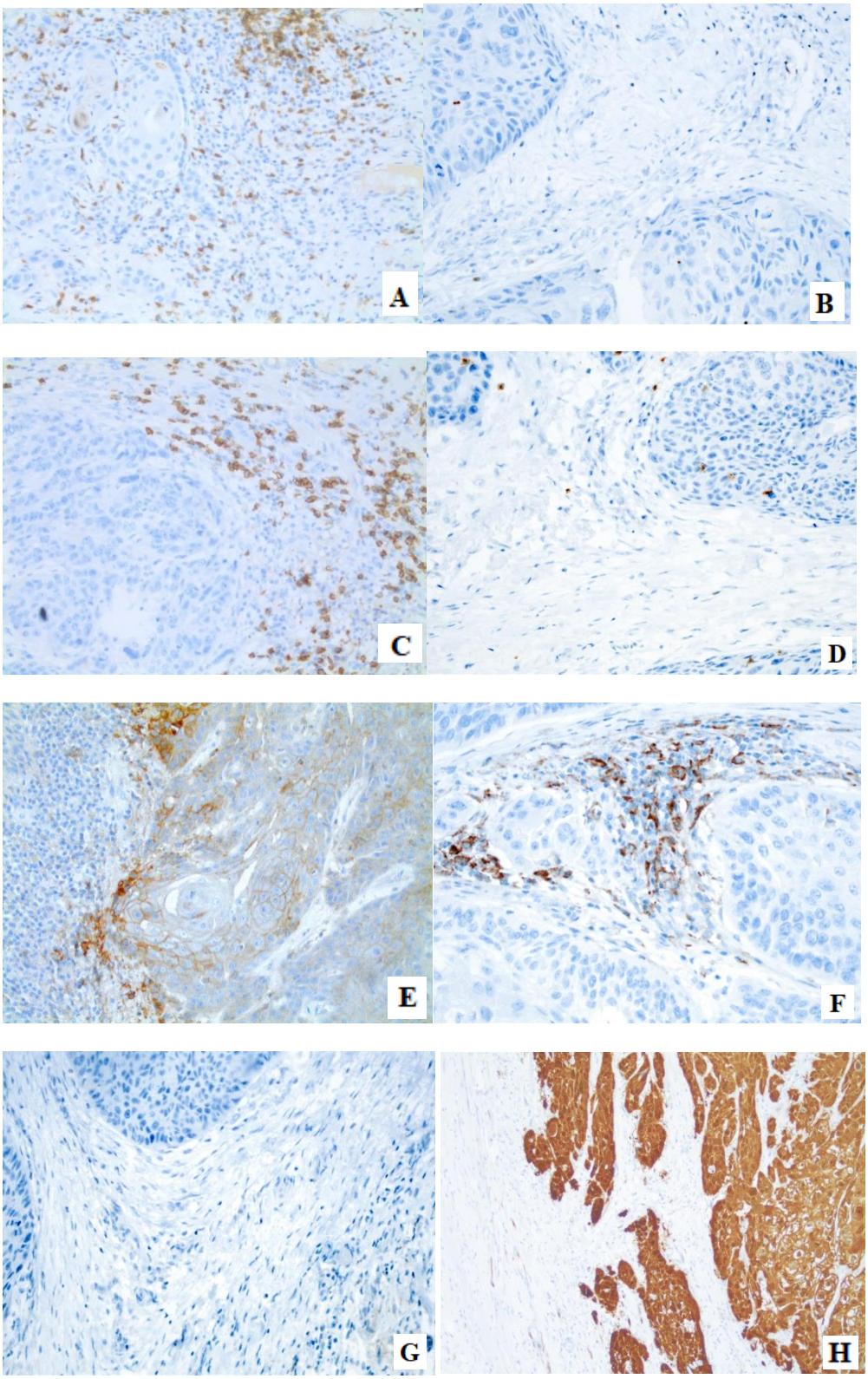
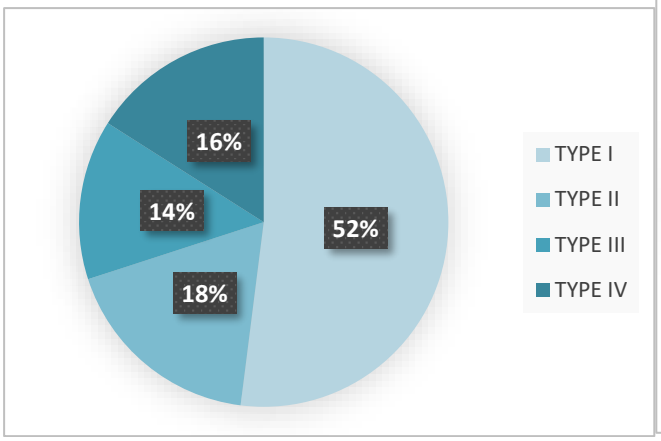
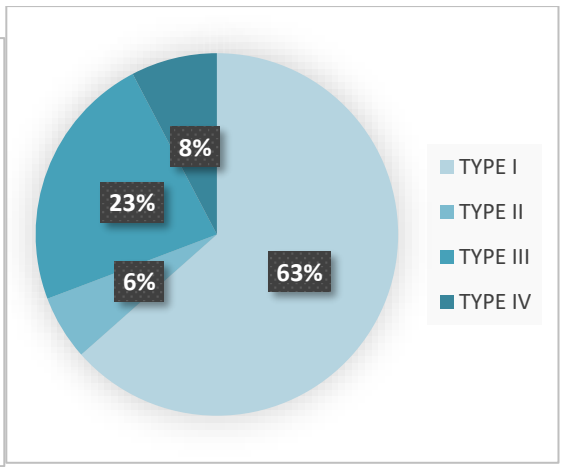


Figure 2: Distribution of immune phenotype in irradiated area tumors (a) and in de novo tumors (b) among four types. 1) TYPE I: Adaptative immune resistance (TPS+/CD8+ TILs high), 2) TYPE II: Immunological ignorance (TPS-/CD8+ TILs low), 3) TYPE III: Intrinsic induction (TPS+/CD8+ TILs low) and 4) TYPE IV: Immune tolerance (TPS-/CD8+ TILs high).

a. Irradiated area



b. De novo



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE SUR LES TERRITOIRES IRRADIÉS

Les tumeurs en territoire irradié représentent un vrai enjeu thérapeutique car elles sont de mauvais pronostic, surviennent chez des patients présentant souvent de nombreuses comorbidités, notamment cardiovasculaires et addictives, et peu d'options thérapeutiques existent en cas de chirurgie de sauvetage non réalisable.

Avec ce travail, nous avons observé que les tumeurs survenant en territoire irradié présentent moins d'infiltration lymphocytaire T CD3+ mais possèdent toujours un potentiel cytotoxique après traitement par radiothérapie ou chimiothérapie. Elles expriment également moins PD-L1, que ce soit sur les cellules tumorales ou immunitaires, ce qui pourrait expliquer le fait qu'elles répondent moins à l'immunothérapie. Ces éléments apportent des données supplémentaires sur la modification du microenvironnement tumoral secondaire aux traitements antitumoraux.

Il reste évidemment bien des recherches moléculaires à effectuer pour mieux comprendre ce type de tissu qui semble se comporter différemment des tumeurs de novo. L'évaluation des biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie chez des patients traités par immunothérapie dans des essais randomisés, qui sont actuellement en cours, serait indiquée afin de mieux préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance acquise aux traitements.

II. NOUVELLES PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

Les ICI anti-PD-1 sont les premières immunothérapies à démontrer une amélioration significative de la survie globale après échec d'un sel de platine chez les CETEC R/M. Depuis, de multiples essais thérapeutiques ont vu le jour :

1. Dans différentes situations carcinologiques

La tendance actuelle est d'évaluer les ICI dans des indications de plus en plus précoces comme cela est le cas dans le mélanome en adjuvant [112], en 1ère ligne métastatique dans les CBPNPC [113] ou encore en 1ère ligne dans les carcinomes rénaux avancés avec l'association Nivolumab + Ipilimumab [114]. En 1ère ligne des CETEC R/M, de nombreux essais de phase III sont en cours en comparaison au schéma EXTREME (Cisplatine, 5-FU, Cétuximab) suite au succès des anti-PD-1/PD-L1 après échec aux sels de platine.

L'essai **Keynote-048** a récemment été présenté à l'*European Society for Medical Oncology* 2018 (ESMO) [51] et à l'*American Society of Clinical Oncology* 2019 (ASCO) [52]. Cette étude randomisée de phase III a montré une amélioration significative de la survie globale du Pembrolizumab seul versus le schéma EXTREME [51]. De même, le bras évaluant l'association Pembrolizumab à la

chimiothérapie versus le schéma EXTREME montrait également une augmentation significative de la survie globale [52].
Nous pouvons également citer l'essai en cours **ADJORL** de phase II (Clinical Trial NCT03406247) dont le but est d'évaluer l'efficacité et la tolérance du Nivolumab, seul ou en association à l'Ipilimumab, en adjuvant après chirurgie de rattrapage versus une réirradiation chez des CETEC prétraités.

2. Pour tester différentes associations thérapeutiques

De nouvelles associations de traitement sont actuellement en cours d'évaluation dans les cancers de la tête et du cou, que ce soit en situation curative ou en situation de rechute / métastatique. Les associations possibles sont vastes : double immunothérapie, association à la radiothérapie, à la chimiothérapie ou aux thérapies ciblées.

Un nombre important d'essais cliniques évaluent les ICI en association à la radiothérapie. Qu'ils soient seuls, associés au Cisplatine ou au Cétuximab, après radiochimiothérapie exclusive ou en adjuvant, les premières données semblent indiquer une bonne tolérance de cette nouvelle approche thérapeutique. Il n'existe pour le moment aucune donnée d'efficacité. Ainsi, l'essai français de phase II du Groupe d'Oncologie Radiothérapie Tête et Cou (GORTEC) **PEMBRORAD** (Clinical Trial NCT02707588) évalue l'efficacité du Pembrolizumab associé à la radiothérapie versus Cétuximab associé à la radiothérapie dans les CETEC localement avancés [115].

D'autres essais cliniques évaluent les stratégies de combinaison avec les ICI. Par exemple, l'essai de phase II **REACH** teste l'Avélumab combiné à la radiothérapie et le Cétuximab (Clinical Trial NCT02999087), l'essai de phase III **KEYNOTE-412** teste le Pembrolizumab combiné à une radiochimiothérapie dans les CETEC localement avancés (Clinical Trial NCT03040999) et l'essai de phase III **JAVELIN** évalue l'Avélumab combiné à une radiochimiothérapie également dans les CETEC localement avancés (Clinical Trial NCT02952586). L'étude de phase III randomisée **KESTREL** compare le Durvalumab seul ou combiné au Tremelimumab au schéma EXTREME (Clinical Trial NCT02551159) chez 823 patients atteints d'un CETEC R/M en 1ère ligne. Enfin, l'essai de phase III **CHECKMATE 651** randomise 947 patients atteints d'un CETEC R/M en 1ère ligne pour du Nivolumab + Ipilimumab versus schéma EXTREME (Clinical Trial NCT02741570).

III. RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE RÉPONSE À L'IMMUNOTHÉRAPIE

Aujourd'hui, aucun marqueur de réponse à l'immunothérapie n'est suffisamment robuste, qui justifierait son utilisation en pratique clinique [99]. La recherche de biomarqueurs prédictifs est donc une course vers le graal.

Une des pistes évoquées serait le développement d'immunoscores qui tente actuellement d'améliorer la stadification. En 2006, l'équipe de Jérôme Galon a mis en avant le microenvironnement tumoral en démontrant qu'il avait un impact majeur sur le risque de rechute et la survie des patients atteints d'un cancer du côlon. Ainsi, et indépendamment d'autres paramètres clinicobiologiques, la localisation, la densité et la fonctionnalité des cellules immunitaires adaptatives dans le centre et au pourtour de la tumeur sont les éléments clés de cet immunoscore [116, 117]. Le consortium international relatif à ces travaux vient justement de démontrer en 2018 le bénéfice du test consensus Immunoscore dans l'identification des patients à haut risque de récidive d'un cancer du côlon avec la preuve de son intérêt pronostique, sa reproductibilité et sa robustesse. L'étude a été conduite chez 3539 patients atteints d'un cancer colorectal de stade I-III dans 13 pays. Ce test prédit le pronostic et le risque de rechute mieux que tout autres éléments cliniques, pathologiques ou radiologiques testés individuellement et pourrait conduire à la nouvelle classification proposée dite TNM-Immune ou TNM-I [118].

Le statut PD-L1 à lui seul est insuffisant en tant que facteur prédictif de réponse aux anti-PD-1/PD-L1 [100], car nous pouvons également voir de très bonnes réponses chez les patients PD-L1 négatifs [14]. Il faut donc trouver d'autres biomarqueurs, voire les combiner. L'expression de PD-L2, la signature IFNγ, l'analyse de LAG3 ou encore le phénotype MSI sont plusieurs pistes en cours d'exploration [119].

IV. CHALLENGES TECHNIQUES

1. Les limitations techniques

La disponibilité tissulaire et l'optimisation des prélèvements sont la première étape pour effectuer des analyses anatomopathologiques sur le matériel tumoral qui soient de bonne qualité.

2. La nécessité de standardiser

L'expression de PD-L1 à la surface des cellules immunitaires ou des cellules tumorales est un important facteur prédictif de réponse aux ICI. Il est actuellement le seul, mais il est incomplet. Il faut donc développer des tests diagnostiques qui soient suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter

les patients pouvant bénéficier au mieux de ces thérapies. Les techniques d'analyses anatomopathologiques sont de ce fait importantes à préciser car la façon d'évaluer l'expression de PD-L1 est très variable en fonction des études : selon le type de clone PD-L1, la cible (cellule tumorale ou immunitaire), les modalités analytiques (pourcentage, scoring, etc…), le seuil de positivité et bien sûr l'utilité clinique [120]. De nombreux tests diagnostiques sont disponibles mais il n'existe aucune standardisation [5].

De même, aucune standardisation n'existe pour l'évaluation des TILs. Chaque étude présente des méthodes variables d'évaluation, sous forme de comptage cellulaire ou de scores semi-quantitatifs, utilisant des moyennes ou des médianes, que ce soit dans les compartiments stromal ou tumoral [121, 122].
La standardisation de ces tests biologiques et de ces procédures ainsi qu'une sensibilité et spécificité suffisantes des anticorps sont donc fondamentales [99].

3. L'interprétation des données

Les scores combinés peuvent être une solution et commencent à apparaître en ORL. Un des scores émergents est le *Combined Positive Score* (CPS) actuellement développé avec les essais évaluant le Pembrolizumab. Ce score combiné est calculé en divisant le nombre de cellules PD-L1+ (tumorales, macrophages et lymphocytes) par le nombre total de cellules tumorales viables de l'échantillon x 100 [123]. Cependant, ce score ne prend pas en compte les lymphocytes du stroma.

Comme évoqué ci-dessus, une autre possibilité serait de mettre au point un immunoscore avec prise en compte de divers paramètres, dont la densité et la fonctionnalité des cellules immunes [124]. L'immunoscore a été démontré comme étant un biomarqueur pronostique indépendant dans les stades précoces des cancers colorectaux, du mélanome et des cancers pulmonaires non à petites cellules [125–127]. Pour le moment, le rôle prédictif de ce score n'a pas encore été exploré dans les CETEC.

La valeur pronostique, et notamment celle du statut PD-L1, est également à préciser. Pour ce dernier, des équipes soulignent l'importance d'évaluer son expression non seulement sur les cellules tumorales mais également sur les cellules immunes, comme Kim et al le mentionnent en montrant que, dans leur étude, l'expression de PD-L1 sur les cellules immunes est un facteur de bon pronostic dans les CETEC [128]. Müller et al montrent quant à eux qu'il semble exister une forte corrélation entre l'expression de PD-L1 sur cellules tumorales et la survie globale [129].
La méta-analyse de Yang et al en 2018 décrit une possible meilleure survie sans progression en cas d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. Cependant, son expression n'est pas recommandée pour prédire la survie des patients en pratique courante [130].

Ce travail a été accepté en poster à l'ESMO 2019.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
[2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7–34.
[3] Defossez G. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 / 2019 / Maladies chroniques et traumatismes. *http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2019/Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018*, http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2019/Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-2018 (2019, accessed 25 May 2019).
[4] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018; 359: 1350–1355.
[5] Smith J, Robida MD, Acosta K, et al. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones: SP263 and E1L3N. *Diagn Pathol* 2016; 11: 44.
[6] Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2706–2716.
[7] Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007; 8: 239–245.
[8] Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015; 51: 221–228.
[9] Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, et al. Identification of the Cell-Intrinsic and -Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFNγ That Induce PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 2016; 76: 1031–1043.
[10] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007; 19: 813–824.
[11] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704.
[12] Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2: 261–268.
[13] Badoual C, Combe P, Gey A, et al. [PD-1 and PDL-1 expression in cancer: significance and prognostic value]. *Med Sci MS* 2013; 29: 570–572.
[14] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; 375: 1856–1867.
[15] Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2013; 35: 747–755.
[16] Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 24–35.
[17] Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2014; 110: 489–500.
[18] Schneider K, Marbaix E, Bouzin C, et al. Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol Stockh Swed* 2018; 57: 1165–1172.
[19] Duncan LD, Winkler M, Carlson ER, et al. p16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 2013; 71: 1367–1375.
[20] Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2018; 36: 3152–3161.
[21] Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* 2011; 333: 1157–1160.
[22] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500: 415–421.
[23] Park BJ, Chiosea SI, Grandis JR. Molecular changes in the multistage pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* 2010; 9: 325–339.
[24] Duray A, Demoulin S, Hubert P, et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 701657.
[25] Monjazeb AM, Zamora AE, Grossenbacher SK, et al. Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies. *Front Oncol* 2013; 3: 197.
[26] Grégoire V, Lefebvre J-L, Licitra L, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v184-186.
[27] Lambiel S, Dulguerov P. [Changes in the new TNM classification in Head and Neck oncology]. *Rev Med Suisse* 2017; 13: 1684–1689.

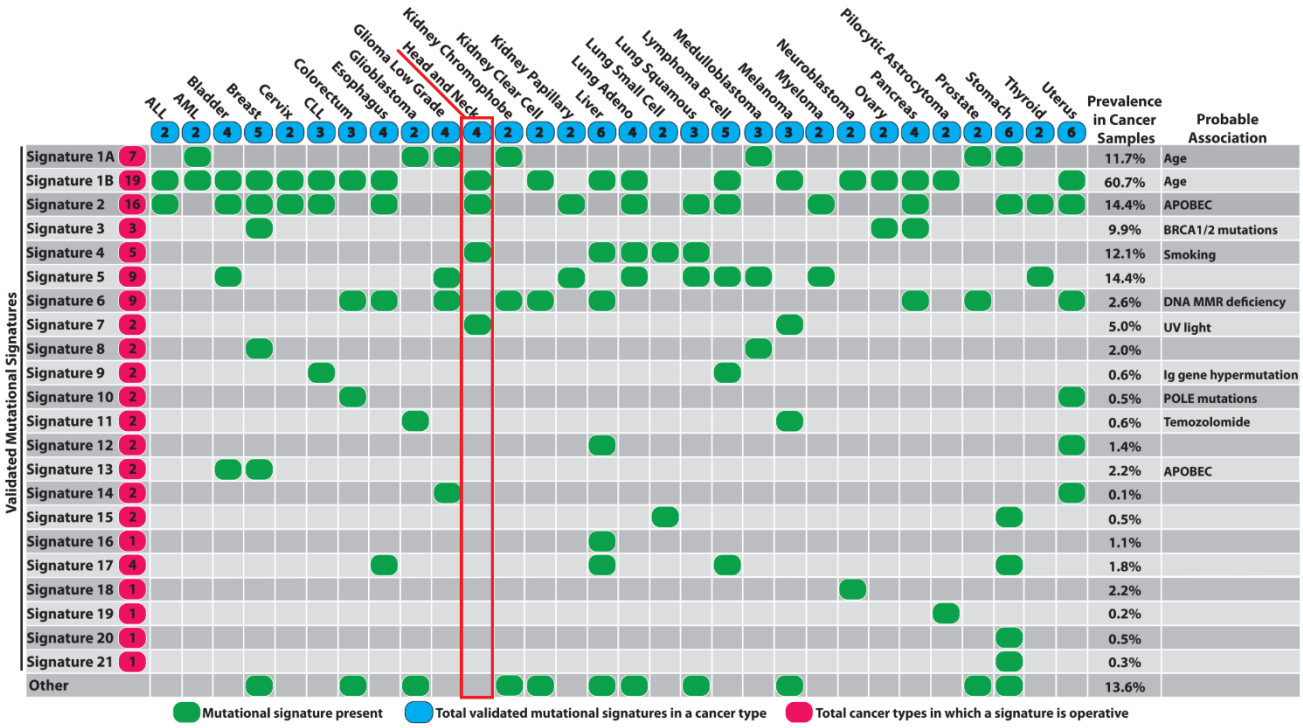
[28] Jung AR, Roh J-L, Kim JS, et al. Prognostic value of body composition on recurrence and survival of advanced-stage head and neck cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2019; 116: 98–106.
[29] Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1945–1952.
[30] Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005; 27: 843–850.
[31] Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1998; 16: 1310–1317.
[32] Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2013; 31: 845–852.
[33] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2006; 354: 567–578.
[34] De Crevoisier R, Bourhis J, Domenge C, et al. Full-dose reirradiation for unresectable head and neck carcinoma: experience at the Gustave-Roussy Institute in a series of 169 patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1998; 16: 3556–3562.
[35] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1116–1127.
[36] Colevas AD. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2006; 24: 2644–2652.
[37] Karabajakian A, Toussaint P, Neidhardt E-M, et al. Chemotherapy for recurrent/metastatic head and neck cancers. *Anticancer Drugs* 2017; 28: 357–361.
[38] Janot F, de Raucourt D, Benhamou E, et al. Randomized trial of postoperative reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery compared with salvage surgery alone in head and neck carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; 26: 5518–5523.
[39] Tao Y, Faivre L, Laprie A, et al. Randomized trial comparing two methods of re-irradiation after salvage surgery in head and neck squamous cell carcinoma: Once daily split-course radiotherapy with concomitant chemotherapy or twice daily radiotherapy with cetuximab. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2018; 128: 467–471.
[40] Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl* 2019; 393: 156–167.
[41] Ho AS, Kraus DH, Ganly I, et al. Decision making in the management of recurrent head and neck cancer. *Head Neck* 2014; 36: 144–151.
[42] Tan HK, Giger R, Auperin A, et al. Salvage surgery after concomitant chemoradiation in head and neck squamous cell carcinomas - stratification for postsalvage survival. *Head Neck* 2010; 32: 139–147.
[43] Salama JK, Vokes EE, Chmura SJ, et al. Long-term outcome of concurrent chemotherapy and reirradiation for recurrent and second primary head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 382–391.
[44] De Crevoisier R, Domenge C, Wibault P, et al. Full dose reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery in head and neck carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2071–2076.
[45] Oliva M, Spreafico A, Taberna M, et al. Immune biomarkers of response to immune-checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019; 30: 57–67.
[46] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 2015; 28: 690–714.
[47] Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; 33: 3293–3304.
[48] Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014; 74: 5458–5468.
[49] Phulpin B, Dolivet G, Marie P-Y, et al. Re-assessment of chronic radio-induced tissue damage in a rat hindlimb model. *Exp Ther Med* 2010; 1: 553–560.
[50] Gallet P, Phulpin B, Merlin J-L, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and relation with histological severity scoring. *PloS One* 2011; 6: e29399.
[51] Burtness B, Harrington KJ, Greil R. KEYNOTE-048: phase 3 study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC) Abstract LBA8_PR, ESMO 2018.
[52] Rischin D, Harrington KJ, Greil R. Protocol-specified final analysis of the phase 3 KEYNOTE-048 trial of pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). Abstract 6000, ASCO 2019.

[53] Champiat S, Dercle L, Ammari S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2017; 23: 1920–1928.
[54] Saâda-Bouzid E, Defaucheux C, Karabajakian A, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Epub ahead of print 13 April 2017. DOI: 10.1093/annonc/mdx178.
[55] Champiat S, Ferrara R, Massard C, et al. Hyperprogressive disease: recognizing a novel pattern to improve patient management. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 748–762.
[56] Kato S, Goodman A, Walavalkar V, et al. Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2017; 23: 4242–4250.
[57] Ferrara R, Mezquita L, Texier M, et al. Hyperprogressive Disease in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy. *JAMA Oncol* 2018; 4: 1543–1552.
[58] Kim CG, Kim KH, Pyo K-H, et al. Hyperprogressive disease during PD-1/PD-L1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Epub ahead of print 12 April 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz123.
[59] Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010; 28: 4531–4538.
[60] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480: 480–489.
[61] Marabelle A, Kohrt H, Levy R. New insights into the mechanism of action of immune checkpoint antibodies. *Oncoimmunology* 2014; 3: e954869.
[62] Olive D, le Thi S, Xerri L, et al. [The role of co-inhibitory signals driven by CTLA-4 in immune system]. *Med Sci MS* 2011; 27: 842–849.
[63] Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget* 2014; 5: 3956–3969.
[64] Vesely MD, Schreiber RD. Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1284: 1–5.
[65] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331: 1565–1570.
[66] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991–998.
[67] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
[68] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
[69] Economopoulou P, Agelaki S, Perisanidis C, et al. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2016; 27: 1675–1685.
[70] Eggermont AMM. Can immuno-oncology offer a truly pan-tumour approach to therapy? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2012; 23 Suppl 8: viii53-57.
[71] Pardoll D, Drake C. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J Exp Med* 2012; 209: 201–209.
[72] Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 880–887.
[73] Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2016; 27: 1482–1492.
[74] Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018; 24: 541–550.
[75] Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; 22: 1865–1874.
[76] Chen Y-P, Wang Y-Q, Lv J-W, et al. Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019; 30: 68–75.
[77] Yuan J, Hegde PS, Clynes R, et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2016; 4: 3.
[78] Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015; 75: 2139–2145.
[79] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 252–264.
[80] Pico de Coaña Y, Choudhury A, Kiessling R. Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. *Trends Mol Med* 2015; 21: 482–491.
[81] Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N Engl J Med* 2012; 366: 2517–2519.
[82] Forster MD, Devlin M-J. Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer. *Front Oncol*; 8. Epub ahead of print 29 August 2018. DOI: 10.3389/fonc.2018.00310.
[83] Eisenstein M. Immunotherapy offers a promising bet against brain cancer. *Nature* 2018; 561: S42–S44.

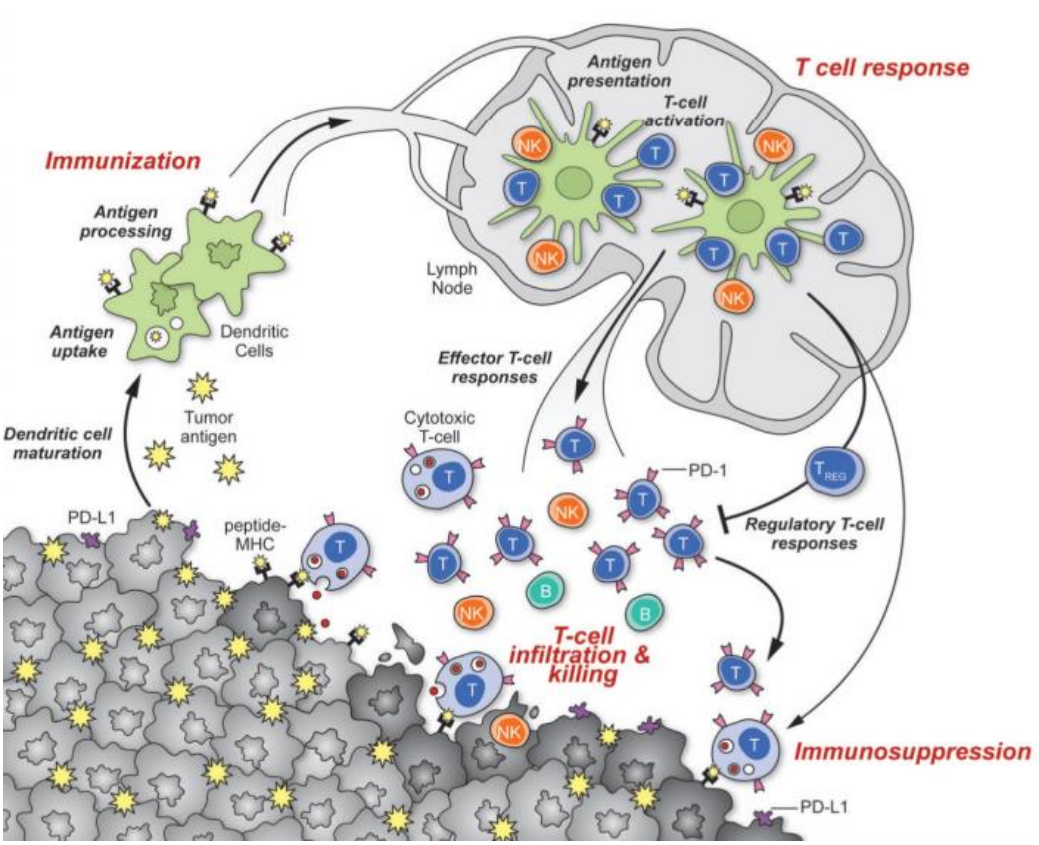
[84] Ratnam NM, Gilbert MR, Giles AJ. Immunotherapy in CNS cancers: the role of immune cell trafficking. *Neuro-Oncol* 2019; 21: 37–46.
[85] Hirsch L, Zitvogel L, Eggermont A, et al. PD-Loma: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade. *Br J Cancer* 2019; 120: 3–5.
[86] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711–723.
[87] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Previously Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 23–34.
[88] Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2017; 376: 1015–1026.
[89] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123–135.
[90] Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 1803–1813.
[91] Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2016; 54: 139–148.
[92] Champiat S, Lambotte O, Barreau E, et al. Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: a collaborative position paper. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2016; 27: 559–574.
[93] Kostine M, Chiche L, Lazaro E, et al. Opportunistic autoimmunity secondary to cancer immunotherapy (OASI): An emerging challenge. *Rev Med Interne* 2017; 38: 513–525.
[94] Haanen JB a. G, Carbonnel F, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017; 28: iv119–iv142.
[95] Kumar V, Chaudhary N, Garg M, et al. Current Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) Induced by Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front Pharmacol* 2017; 8: 49.
[96] Boutros C, Tarhini A, Routier E, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13: 473–486.
[97] Day D, Hansen AR. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 2016; 30: 571–584.
[98] FDA-NIH Biomarker Working Group. *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource*. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/ (2016, accessed 30 May 2019).
[99] Pagès F. Biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitements bloquant les voies de costimulation inhibitrices. Bull Cancer 2016, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057179 (2016, accessed 26 August 2019).
[100] Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016; 17: e542–e551.
[101] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375: 1823–1833.
[102] Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2016; 387: 1540–1550.
[103] Pagès F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2654–2666.
[104] Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019; 30: 44–56.
[105] Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon-γ in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; 17: 6118–6124.
[106] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* 2018; 81: 45–51.
[107] Zandberg DP, Algazi AP, Jimeno A, et al. Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from a single-arm, phase II study in patients with ≥25% tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2019; 107: 142–152.
[108] Siu LL, Even C, Mesía R, et al. Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1-Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCC: The Phase 2 CONDOR Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019; 5: 195–203.
[109] Ferris RL, Even C, Haddad R, et al. Phase III, randomized, open-label study of durvalumab (MEDI4736) monotherapy, or durvalumab + tremelimumab, versus standard of care (SoC), in recurrent or metastatic (R/M) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): eagle. *J Immunother Cancer* 2015; 3: P150.

[110] Spiotto M, Fu Y-X, Weichselbaum RR. The intersection of radiotherapy and immunotherapy: mechanisms and clinical implications. *Sci Immunol*; 1. Epub ahead of print September 2016. DOI: 10.1126/sciimmunol.aag1266.
[111] Szekely B, Bossuyt V, Li X, et al. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2018; 29: 2232–2239.
[112] Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 2018; 378: 1789–1801.
[113] Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018; 378: 2078–2092.
[114] Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 378: 1277–1290.
[115] Sun XS. A phase II randomized trial of pembrolizumab versus cetuximab, concomitant with radiotherapy (RT) in locally advanced (LA) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): First results of the GORTEC 2015-01 "PembroRad" trial.
[116] Lei Y, Xie Y, Tan YS, et al. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. *Oral Oncol* 2016; 61: 159–165.
[117] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960–1964.
[118] Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet Lond Engl* 2018; 391: 2128–2139.
[119] Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Disease Progression on or After Platinum-Containing Chemotherapy. *The Oncologist* 2017; 22: 873–878.
[120] De Meulenaere A, Vermassen T, Creytens D, et al. Importance of choice of materials and methods in PD-L1 and TIL assessment in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2018; 73: 500–509.
[121] Balermpas P, Michel Y, Wagenblast J, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 2014; 110: 501–509.
[122] Balermpas P, Rödel F, Rödel C, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes in relation to HPV status and clinical outcome in patients with head and neck cancer after postoperative chemoradiotherapy: A multicentre study of the German cancer consortium radiation oncology group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* 2016; 138: 171–181.
[123] Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol*; 11. Epub ahead of print 8 October 2016. DOI: 10.1186/s13000-016-0545-8.
[124] El Sissy C, Marliot F, Haicheur N, et al. [Focus on the Immunoscore and its potential clinical implications]. *Ann Pathol* 2017; 37: 29–38.
[125] Donnem T, Hald SM, Paulsen E-E, et al. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015; 21: 2635–2643.
[126] Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 2016; 44: 698–711.
[127] Galon J, Fox BA, Bifulco CB, et al. Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J Transl Med* 2016; 14: 273.
[128] Kim HR, Ha S-J, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. *Sci Rep* 2016; 6: 36956.
[129] Müller T, Braun M, Dietrich D, et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 52889–52900.
[130] Yang W-F, Wong MCM, Thomson PJ, et al. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2018; 86: 81–90.

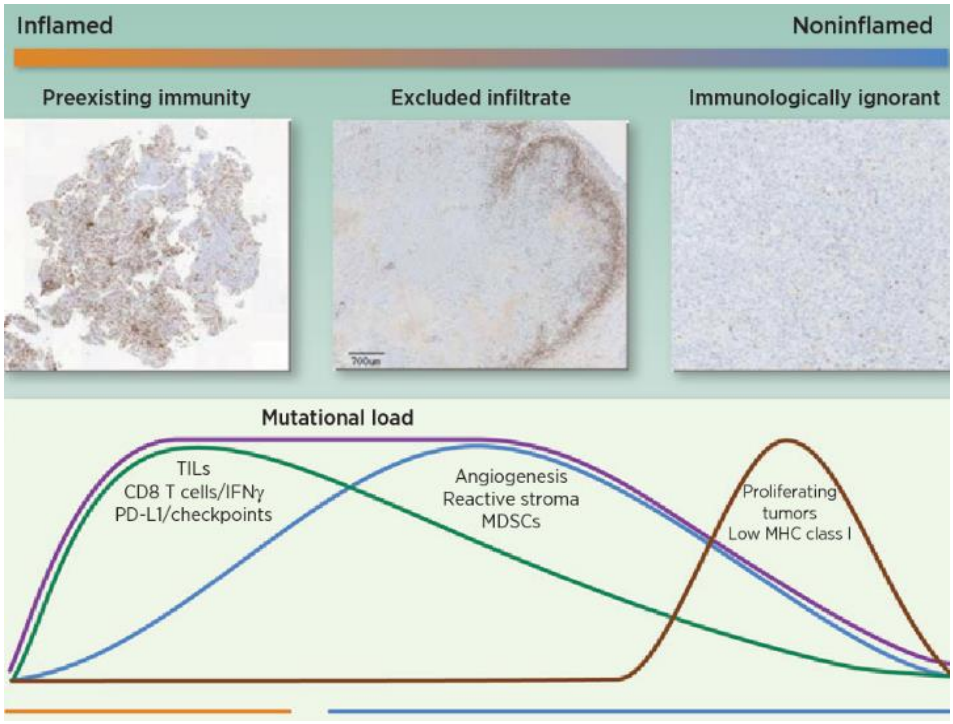
ANNEXES



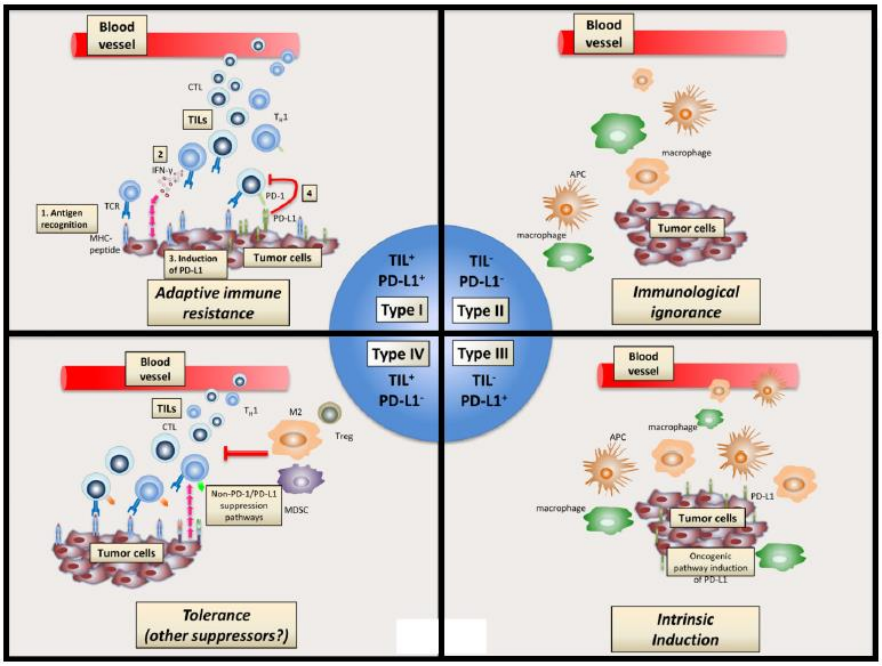
Annexe 1 : Les signatures mutationnelles dans les différents types de cancers humains. Les colonnes correspondent aux différents types de cancers humains classés selon l'ordre alphabétique. Les lignes représentent les signatures mutationnelles (1A à 21). La prévalence d'un cancer donné indique son pourcentage au sein de l'échantillon comportant 7 042 cancers dont les signatures ont produit un nombre significatif de mutations somatiques. Pour la plupart des signatures, un nombre significatif de mutations somatiques dans l'échantillon était défini par plus de 100 substitutions ou plus de 25% de la totalité des mutations de l'échantillon. D'après Alexandrov et al, Nature 2013 [22].



Annexe 2 : Activation et régulation de l'immunité antitumorale. Les cellules dendritiques agissent en tant que cellules co-stimulatrices des lymphocytes T car elles les activent lorsqu'elles présentent des antigènes. Les lymphocytes T sont ainsi activés et effectuent la réponse immunitaire antitumorale. D'après Mellman et al, Nature 2011[60].



Annexe 3 : Le continuum de l'immunité entre deux profils de microenvironnement tumoral : les tumeurs *« inflammées »* versus *« non inflammées »*. Les tumeurs très *« inflammées »* sont représentées par une infiltration abondante de TILs, une expression de marqueurs de checkpoints immunitaires et notamment de PD-L1, une densité importante de LT CD8+ producteurs d'IFNγ, une forte charge mutationnelle ainsi que par la préexistence d'une réponse immunitaire antitumorale. Les tumeurs *« non inflammées »* ou immunologiquement ignorantes sont représentées par une très faible infiltration de TILs, une faible charge mutationnelle, peu d'expression de PD-L1 et une importante capacité de prolifération. Le phénotype intermédiaire avec exclusion intratumorale ou stromale de l'infiltration des TILs sont représentées par l'impact d'une réaction stromale à prédominance immunosuppressive, une augmentation des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et la majoration de l'angiogénèse. Malgré une charge mutationnelle élevée, ces derniers éléments empêchent l'infiltration des TILs ou suppriment leur activation. D'après Hegde et al, Clinical Cancer Research 2016 [75].



Annexe 4 : Caractérisation de 4 types de microenvironnements tumoraux basée sur la présence de TILs et l'expression de PD-L1. Type I : résistance adaptative immune ; Type II : ignorance immunologique ; Type III : induction intrinsèque ; Type IV : tolérance immune. APC, cellule présentatrice d'antigènes; MDSCs, cellules myéloïdes suppressives; M2, macrophages M2; PD-L1, programmed cell death-ligand 1; TCR, récepteur lymphocytaire T; TH1, T helper 1; TILs, infiltration lymphocytaire T. D'après Teng et al, Cancer Research 2015 [78].

VU

NANCY, le **03 juillet 2019**
Le Président de Thèse

Professeur Thierry CONROY

NANCY, le **04 juillet 2019**
Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur Marc BRAUN

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/ **10771**

NANCY, le **09 juillet 2019**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE,

Professeur Pierre MUTZENHARDT

RÉSUMÉ

Le paysage immunologique des territoires prétraités dans les carcinomes épidermoïdes des Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS) reste peu documenté. Notre étude a eu pour but d'évaluer le microenvironnement tumoral en termes de biomarqueurs de réponse immunitaire observés dans les territoires irradiés et de le comparer à celui des tumeurs nouvellement diagnostiquées ou de novo.

Cette étude rétrospective et monocentrique a analysé 100 tissus tumoraux de carcinomes épidermoïdes des VADS provenant de patients ayant eu une chirurgie entre Janvier 2010 et Novembre 2017. Nous avons comparé le microenvironnement tumoral immun dans 50 tumeurs de novo et 50 tumeurs survenant en territoire irradié. Nous avons évalué par immunohistochimie le statut p16, les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) CD3+ et CD8+ ainsi que l'expression du Programmed death-ligand 1 (PD-L1) des cellules tumorales et immunes, dans les compartiments stromal et intratumoral.

La densité des TILs CD3+ était significativement moins importante dans les tumeurs en territoire irradié par rapport aux tumeurs de novo, que ce soit dans le compartiment intratumoral ou stromal (respectivement p=0.003 and p=0.020). L'expression des TILs CD8+ n'était pas significativement différente entre les deux cohortes. Le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 (TPS ≥ 1%) était significativement plus bas dans les tumeurs en territoire irradié que dans les tumeurs de novo (56.0% vs 86.0%) (p<0.001). Les cellules immunes exprimant PD-L1 étaient également moins nombreuses dans les tumeurs en territoire irradié. Le type de microenvironnement tumoral prédominant était la résistance immune adaptative.

En conclusion, nous avons noté la persistance de cellules cytotoxiques mais une expression moins importante de PD-L1 et de CD3+ TILs dans les tumeurs en territoire irradié en comparaison aux tumeurs de novo. Cette étude apporte de premières hypothèses expliquant le fait que ces lésions répondent moins bien à l'immunothérapie bien qu'elles aient probablement toujours une capacité antitumorale. L'évaluation de biomarqueurs de réponse immunitaire chez les patients en cours de traitement par immunothérapie dans des essais randomisés est requise.

TITRE EN ANGLAIS :

Expression of immune response biomarkers in "recurrent" head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in irradiated area

THÈSE :

MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2019

MOTS CLÉS :

Tumeur Tête et Cou, Carcinome épidermoïde, Territoire irradié, Microenvironnement tumoral, Radiothérapie, Lymphocytes infiltrant la tumeur, TIL, Programmed death-ligand 1, PD-L1, HPV

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex