

7^e Colloque

ONCOTRANS



5-6 novembre 2024

ESEO Grande École d'Ingénieurs
Dijon

RECUEIL ABSTRACTS

COMITÉ D'ORGANISATION

Dr Céline Mirjolet et Pr Emeric Limagne

Radiothérapie et traitements combinés
Médecine nucléaire et
radiothérapie interne vectorisée
Nanoparticules en médecine
Technologies innovantes
Immunothérapie
Biomarqueurs



COMITÉ SCIENTIFIQUE

Pr M. Barberi-Heyob, Nancy
Pr F. Ghiringhelli, Dijon
Pr A. Cochet, Dijon
Pr A. Harlé, Nancy
Pr N. Millot, Dijon
Pr J-L. Merlin, Nancy
Pr C. Paul, Dijon

Pr O. Adotevi, Besançon
Pr A. Beduneau, Besançon
Dr J. Boustani, Besançon
Dr H. Burckel, Strasbourg
Pr A. Detappe, Strasbourg
Dr J. Devy, Reims
Pr G. Malouf, Strasbourg
Dr S. Potteaux, Reims
Dr F. Schaffner, Strasbourg





SOMMAIRE SESSIONS

SOMMAIRE ABSTRACTSP.3

SESSION 1 : IMMUNOTHÉRAPIE.....P.7

SESSION 2 : RADIOTHÉRAPIE EXTERNE ET TRAITEMENTS COMBINÉSP.25

**SESSION 4 : RADIOTHÉRAPIE INTERNE VECTORISÉE ET DÉVELOPPEMENT
DE NOUVEAUX TRACEURS EN MÉDECINE NUCLÉAIRE**P.33

SESSION 5 : NANOPARTICULES EN ONCOLOGIE.....P.43

SESSION 6 : BIOMARQUEURSP.58

AUTRES.....P.65



Mardi 5 novembre

SESSION 1 IMMUNOTHÉRAPIE	N° page
ABDELJAOUED SYRINE - Caractérisation des sous-populations de lymphocytes T résidents mémoires dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux	p.8
BENOIT-LIZON ISIS - STING-induced autophagy and CASM differentially modulates myeloid and lymphoid cells responses	p.9
BROZEK PERRINE - Réponse et marqueurs pronostiques du cancer colorectal métastatique à microsatellite stable traité par chimio-immunothérapie	p.10
FARVAQUE PIA - Activation signal optimization for the development of a new generation of bispecific CAR-Ts in myeloma	p.11
GROETZ EMMA - Monounsaturated fatty acids metabolism and Th9 antitumor proprieties	p.12
HAMPE LÉA - Développement et optimisation d'un panel de cytométrie spectrale de 45 couleurs pour l'identification des populations cellulaires présentes dans le sang et la tumeur chez l'Homme	p.13
JACQUOT GUILLAUME - Chitosan-based hydrogel formulation for subcutaneous administration of monoclonal antibodies	p.14
LALLE GUILHEM - Études des impacts immunologiques de la combinaison adagrasib (inhibiteur de KRASG12C) et chimio-immunothérapie dans le cancer bronchique à petite cellules : identification d'un mécanisme induit de tolérance impliquant le TGF- β .d	p.15
LATOUR CHARLÈNE - Rôle des interactions NK/TAM et de CXCL9 sur le recrutement des T-CD8+ et l'efficacité de la combinaison chimio-immunothérapie et inhibiteur de MEK dans les cancers bronchiques	p.17
LATOUR CHARLÈNE - Développement d'une analyse phénotypique 43 marqueurs du microenvironnement tumoral chez la souris par cytométrie en flux spectral	p.18
LAMORLETTE CINDY - IL15-GD2 CAR-T cells antitumor efficacy in the immunosuppressive tumor microenvironment of glioblastoma	p.19
MARION THIBAUD - Phase I dose escalation study to evaluate safety and preliminary efficacy data of trifluridine/tipiracil +/- bevacizumab plus XB2001 (anti-IL-1 α True Human antibody)	p.20
MORIN THOMAS - Immunosenesitizing Effect of TLR Agonist Combination in the Treatment of Cold Tumors	p.21
PERRICHET ANAÏS - Ciblage de l'IL-1beta pour améliorer l'efficacité de la chimio-immunothérapie dans le cancer du pancréas	p.22
PERRICHET ANAÏS - Ciblage de l'IL-1beta pour améliorer l'efficacité de la chimio-immunothérapie dans le cancer du poumon	p.23
VERNET THIBAUT - La déplétion en LTCD4 contrôle la réponse anti-tumorale des LTCD8 et améliore l'efficacité de l'immunothérapie ciblant PD-1	p.24

SESSION 2 RADIOTHÉRAPIE EXTERNE ET TRAITEMENTS COMBINÉS

BAUDE JÉRÉMY - Étude de la radiothérapie et de son fractionnement sur les cellules Natural Killer et évaluation de l'efficacité d'une combinaison radiothérapie, anti-PD-L1 et anti-NKG2A	p.26
BURCKEL HÉLÈNE - Irradiation par photons ou protons : quel impact sur la réponse immunitaire radio-induite ?	p.27
DARDARE JÉRÉMY - Rôle de DDB2 dans la résistance à la radiothérapie des cellules de PDAC	p.28
KOTAICH NOUR - Exploring the expression and secretion of galectin-9 isoforms in triple-negative breast cancer cells following radiotherapy and chemotherapy	p.29
NEYBECKER CAMILLE - Therapeutic interest of an iron-based complex to improve treatments against pancreatic and triple negative breast cancers.	p.30
RAKOTOSAMIMANANA MANOU - Radiothérapie stéréotaxique des cancers de prostate localisés Accélérateurs linéaires couplés à une IRM versus accélérateurs linéaires conventionnels toxicités et contrôle biochimique à 2 ans	p.31
YAOYAO XIE - Chemoradiation-induced immune system peripheral changes in patients with non-small cell lung cancer	p.32

Mercredi 6 novembre

SESSION 4 RADIOTHÉRAPIE INTERNE VECTORISÉE ET DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX TRACEURS EN MÉDECINE NUCLÉAIRE

BELLAYE PIERRE-SIMON - Targeted radionuclide therapy against GARP expressing T regulatory cells after tumour priming with external beam radiotherapy in a murine syngeneic model	p.34
BESSION VICTOR - Évaluation de la Tomographie par Emission de Positron (TEP) au 18F-Fluorodésoxyglucose (FDG) et à la 18F-Fluorocholine (FCH) comme marqueur prédictif précoce de la survie globale chez les patients suivis pour un carcinome hépatocellulaire avancé traité par Sorafenib : une étude prospective et multicentrique	p.35
CHEVEAU MAXIME - Développement d'agents chélatants bifonctionnels pour les radiométaux émetteurs alpha	p.36
FRENAY JAMES - Cancers hématologiques surexprimant IL-1RAP : utilisation d'un anticorps radiomarqué pour une approche théranostique	p.37
JEAN CHLOE - Évaluation de la performance du [18F]-FES en imagerie TEP dans la détection des mutations du récepteur des œstrogènes dans les cancers du sein ER+	p.38
KOWNACKA AGNIESZKA - Imagerie préclinique SPECT des cancers HER2 positifs avec [111In]In-DOTAGA-trastuzumab et [111In]In-DOTAGA-pertuzumab	p.39
PAYAN - Is pre-therapeutic dosimetry on dynamic 68Ga-PSMA-11 PET/CT imaging a good estimate of post- 177Lu-PSMA-617 therapy absorbed dose in metastatic, castration-resistant prostate cancer?	p.40

PETITOT CAMILLE - Imagerie TEP théranostique préclinique des cancers CD38 positifs avec les sondes [Zr89]Zr-DFO/DOTAGA-Isatuximab et [Zr89]Zr-DFO/DOTAGA-Daratumumab	p.41
VIVIER DELPHINE - Stratégie bischélate pour « paire théranostique » (TEP et RIV) : synthèse du premier immunoconjugué DFO/DOTAGA en version site-spécifique	p.42

SESSION 5

NANOPARTICULES EN ONCOLOGIE

BETZ MARGAUX - The use of cfDNA follow-up to track resistance mutations in patient with advanced breast cancer treated with anti-aromatase and CDK4/6 inhibitors: first results of the CICLADES study	p.44
BOIDOT ROMAIN - L'analyse RNAseq du sang total circulant détecte l'activation du système immunitaire et prédit la réponse à l'immunothérapie dans le cancer de la vessie.	p.45
DAUMOINE SUSY - Effet de la radio-chimiothérapie sur la réponse immunitaire périphérique dans le glioblastome	p.46
DERANGERE VALENTIN - Classification morphologique et histoprognostique automatisée par deep learning de métastases hépatiques d'origine colorectal	p.47
DI DOMIZIO NOLWEN - Frequency of HPV DNA detection below the clinical decision threshold of the Alinity m HR-HPV technique (Abbott) and context of occurrence	p.48
EL TAHECH HAYAT - Apprentissage supervisé d'images spectrales infrarouge pour le diagnostic des différents sous-types de cancer du sein	p.49
GILSON PAULINE - Évaluation d'une nouvelle technique de PCR automatisée Idylla IDH1-2 mutation assay pour la détection de variants hotspots IDH1 et IDH2 dans les tumeurs solides et cancers hématologiques	p.50
LECUELLE JULIE - Mise en évidence d'une signature pronostique HERV dans le cadre du cancer du sein précoce	p.51
LECUELLE JULIE - L'évaluation de l'infiltrat immunitaire par intelligence artificielle permet de prédire la survie dans une analyse groupée de trois cohortes internationales de cancer du côlon de stade III	p.52
LEN KATERYNA - Le récepteur de la vitamine D limite la progression du cancer de la prostate en atténuant le stress oxydatif et le recrutement des neutrophiles	p.53
MERLIN JEAN-LOUIS - Intérêt d'un diagnostic moléculaire intégré par NGS incluant l'amplification ERBB2 dans les cancers du sein	p.54
MICHEL CASSANDRA - Détermination du déficit en recombinaison homologue par l'étude de la méthylation des promoteurs de BRCA1 et RAD51C chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire séreux de haut grade : résultats de l'étude BOVARY-Pilot et de la cohorte de l'ICL	p.55
MISSAOUI FADOUA - Identification of immune cells in PBMCs and tumors from a cohort of Tunisian CRC patients	p.56
WITZ ANDREA - Évaluation de l'intérêt du suivi longitudinal de l'ADN libre circulant de patients opérés d'un adénocarcinome canalaire pancréatique inclus dans la cohorte PANCREAS-CGE : étude PAN-CGE-BLISS Pilot	p.57

SESSION 5**NANOPARTICULES EN ONCOLOGIE**

ARSLAN SERGEN - Isolement, caractérisation et impact des petites vésicules extracellulaires issues de cellules tumorales infectées par HPV16	p.59
BANERJEE MAINAK - Bottle-brush Polymers to Deliver Molecular Glues for Multiple Myeloma	p.60
BECHETNIA MAHRAN - Ultrasonication-Driven Advances in MnO ₂ Nanomaterials: Unlocking New Horizons for Cancer Treatment	p.61
EL BASSET WASSIM - Size-dependent toxicity of PTX/Gold co-loaded PLGA Formulations in 2D and 3D murine models of glioma	p.62
FROUX AURANE - A new generation of G-quadruplex binding compounds: from their synthesis to the characterization of their anticancer effects	p.63
GOCTU ASLI - Drug release of PLGA NPs designed for combining radiotherapy and chemotherapy	p.64

AUTRES

BURLLOT CHLOÉ - PK characterisation of S65487 and assesment of variability using pharmacometrics in healthy volunteers and patients with cancer	p.66
STERLE MARYLISE - Population pharmacokinetics modelling in real-life abemaciclib-treated patients: A comparison of predictive performance of two published population PK models	p.67



ABSTRACTS

SESSION 1

IMMUNOTHÉRAPIE

Caractérisation des sous-populations de lymphocytes T résidents mémoires dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux

Auteurs : Syrine Abdeljaoued^{1,2}, Émilien Laloy¹, Alexandre Doussot³, Marie Kroemer^{1,2,4}, Jean-René Pallandre¹, Antoine El Kaddissi^{1,5}, Laurie Spehner^{1,2}, Adeline Bouard^{1,6}, Virginie Mougey^{1,6}, Ugo Chartral¹, Angélique Vienot^{1,2,5}, Julien Viot^{1,2,5}, Zaher Lakkis^{1,3}, Franck Monnier^{1,7}, Romain Loyon¹, Christophe Borg^{1,2,5}

1. Université de Franche-Comté, EFS, INSERM, UMR RIGHT, F-25000 Besançon, France
2. Centre d'investigation Clinique, CIC-1431, F-25000 Besançon, France
3. Service de Chirurgie viscérale, digestive et cancérologique - Unité de transplantation hépatique, CHU de Besançon, F-25000 Besançon, France.
4. Service de Pharmacie, CHU de Besançon, F-25000 Besançon, France
5. Service d'Oncologie Médicale, CHU de Besançon, F-25000 Besançon, France
6. Plateforme ITAC, Université de Franche-Comté, UMR RIGHT, F-25000 Besançon, France
7. Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Besançon, Besançon, France

Introduction :

Les T résidents mémoires ou « TRM » sont des lymphocytes T mémoires situés principalement dans les tissus et caractérisés par l'expression de marqueurs de résidence tissulaire tels que le CD103, le CD69 et le CXCR6. Les TRM représentent un déterminant solide de la réponse à l'immunothérapie. Dans l'ensemble, l'évaluation de l'infiltration des TRM dans le microenvironnement tumoral pourrait être un biomarqueur pronostique et prédictif de la réponse aux immunothérapies dans plusieurs types de cancers solides. Bien que la caractérisation des TRM a été réalisée dans plusieurs cancers, les caractéristiques des TRM infiltrant les métastases hépatiques des cancers colorectaux (CCR) restent peu connus. Dans ce travail on a étudié l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des TRM au sein des métastases hépatiques de CCR ainsi que leur valeur pronostique et prédictive de réponse aux checkpoints inhibiteurs (ICI).

Méthodes :

Dans cette étude, une caractérisation phénotypique et fonctionnelle exhaustive des lymphocytes T infiltrant la tumeur issues de 27 échantillons de métastases hépatiques de CCR a été réalisée par cytométrie en flux multiparamétrique. Un TCRseq des différentes populations de TRM a été réalisé afin d'étudier leur répertoire TCR. Afin d'investiguer l'impact de l'infiltration TRM dans la réponse aux ICI dans le CCR on a utilisé deux modèles murins (CT26 et MC38) traités ou non par des anti-PD-1 +/- des anti-CTLA-4.

Résultats :

L'analyse menée par notre équipe de recherche sur 27 échantillons de métastases hépatiques de CCR a montré une forte infiltration de cellules TRM. Deux sous-populations de TRM CD8⁺ ont été identifiées ; CD69⁺ CD103⁺ et CD69⁺ CD103⁻. Près de la moitié des TILs CD8⁺ de métastases hépatiques de CCR testés étaient des CD69⁺ CD103⁻ (médiane, 46,6 %) et environ un quart co-exprimés CD69 et CD103 (médiane, 24,6 %). Seule l'infiltration avec des cellules CD103⁺ CD69⁺ TRM était prédictive de la survie sans récurrence (RFS). Cependant, malgré le pronostic favorable de l'infiltration des TRM CD103⁺ CD69⁺, l'expression de CXCR6 sur cette population a permis de stratifier davantage l'impact pronostique de TRM et a été associée à une RFS plus courte. L'analyse de corrélation a montré que l'expression de CXCR6 était inversement corrélée à l'expression de PD1, HLA-DR et CD39, trois biomarqueurs bien validés de lymphocytes T réactifs aux tumeurs. L'expression de PD1 sur cette population TRM a été associée à un meilleur pronostic des patients. Vu que le rôle des TRM dans la réponse aux ICI dans le CCR métastatique n'a jamais été étudié, nous avons utilisé des modèles de souris MSS et MSIhigh CCR (MC38 et CT26, respectivement). Nos résultats préliminaires ont montré une augmentation significative de la fréquence d'infiltration de TRM CD103⁺ CD69⁺ après traitement anti-PD1/CTLA-4 dans un modèle de souris CT26.

Conclusions :

Dans l'ensemble, notre travail démontre l'existence d'une hétérogénéité phénotypique des TRM dans les métastases hépatiques du cancer colorectal. Dans cette étude, nous avons identifié une population de TRM CD103⁺CD69⁺ présentant des caractéristiques de réactivité tumorale et corrélée à un meilleur pronostic des patients, avec une implication potentielle dans des stratégies thérapeutiques.

Mots clés : T résidents mémoires, TRM, Cancer colorectal métastatique, Pronostic, Immunothérapie.

STING-induced autophagy and CASM differentially modulates myeloid and lymphoid cells responses

Auteurs : Benoit-Lizon Isis^{1,2}, Cassandre Pignol¹, Caroline Truntzer³, Kirsty Hooper⁴, Oliver Florey⁴, Christian Poüs⁵, Catherine Paul², Lionel Apetoh⁶, Élise Jacquin¹

1. Center for Translational and Molecular Medicine, Inserm U1231, Université de Bourgogne, Dijon, France
2. EPHE-PSL
3. Cancer Biology Transfer Platform, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
4. The Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom
5. Inserm U1193, Université Paris-Saclay, France
6. Indiana University, Indianapolis, United States

Introduction

The Stimulator of Interferons Gene (STING) pathway of cytosolic DNA sensing triggers immune responses through Type I Interferon and pro-inflammatory cytokine production. Targeting STING using specific agonists is therefore a promising strategy for cancer treatment, but a deeper comprehension of the underlying molecular mechanism is needed. Several studies have shown that STING activation can induce autophagy, a highly conserved catabolic process essential for cell homeostasis, as assessed by increased LC3 lipidation. Furthermore, a recent study has shown that STING activation can also induce a non-canonical form of autophagy called CASM for Conjugation of ATG8 to Single Membranes. However, the molecular mechanisms and functional consequences of STING-driven autophagy and CASM in STING-relevant immune cells remain unexplored.

Methods

We used both myeloid (RAW264.7 cell lines and Bone-Marrow-derived Dendritic Cells, BMDCs) and lymphoid cells (Primary CD4 T cells) stimulated with the STING agonist 2'3'-cGAMP. Cells were either wild-type or incompetent for autophagy (ATG13^{-/-}; Fip200^{flox/flox}:Cd4Cre) or CASM (ATG16L1K490A) and LC3 lipidation was analyzed by Western Blot. To evaluate the impact of autophagy or CASM deficiency on immune cell responses, STING-associated targets were analyzed by qPCR, ELISA and RNA sequencing.

Results

We found that STING activation induces LC3 lipidation independently of the autophagy pre-initiation complex (ULK1/2-FIP200-ATG13-ATG101), thus suggesting CASM activation in immune cells. Importantly, using Fip200^{flox/flox}:Cd4Cre mice we showed that this phenomenon also occurs in tumor-infiltrating CD4 T cells in MC38 tumor-bearing mice. Moreover, using CASM-deficient cells expressing ATG16L1 with a single point mutation in its C-terminal WD40 domain, we confirmed that STING activation triggers CASM. Interestingly, prolonged STING activation also induces autophagy which in turn acts as a negative feedback mechanism on the STING pathway. Conversely, STING-induced CASM does not seem to modulate STING-associated gene expression in response to STING activation. To further explore the functional consequences of STING-induced CASM, we performed RNA sequencing analyses in BMDCs from mice competent or incompetent for CASM in the context of STING activation and we are currently confirming potential hits.

Conclusions

Using primary immune cells and a genetic model of CASM inactivation, we show for the first time that STING activation can induce both autophagy and CASM in myeloid and lymphoid immune cells and in tumors. These distinct roles of autophagy proteins upon activation of the STING pathway differentially regulates immune cell responses which therefore could provide important insight for the development of STING-based cancer therapies.

Mots clés : Autophagy ; CASM ; STING ; Immune cells ; Immunotherapy

Réponse et marqueurs pronostiques du cancer colorectal métastatique à microsatellite stable traité par chimio-immunothérapie

Auteurs : Perrine Brozek^{1,2,3}, Léa Hampe^{1,2,3}, Susy Daumoine^{1,2,3}, Caroline Truntzer^{1,2,3,4}, François Ghiringhelli^{1,2,3,4,5}, Marion Thibaudin^{1,2,3,4}

1. Université de Bourgogne, Dijon, France
2. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Département de Biologie et Pathologie des Tumeurs, Centre de Lutte Contre le Cancer Georges François Leclerc, UNICANCER, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France
4. Institut médical de génétique et d'immunologie, Dijon, France
5. Département d'Oncologie Médicale, Centre Georges François Leclerc, Dijon, France

Introduction :

Le cancer colorectal métastatique à microsatellite stable (CRC MSS) représente un défi thérapeutique majeur en raison de la faible infiltration du système immunitaire, ce qui rend l'immunothérapie par inhibition des points de contrôle immunitaire seule nettement moins efficace que dans le CRC à microsatellite instable (MSI). Cependant, une étude récente a montré que la combinaison d'une double immunothérapie par anti-PD-L1 (durvalumab) et anti-CTLA-4 (tremelimumab), associée à une chimiothérapie immunogène (FOLFOX), peut être efficace dans le CRC MSS (Thibaudin et al, Nature Medicine, 2023). Dans la continuité de ces résultats, cette étude a pour objectif de regarder si l'expression des cibles des immunothérapies, telles que CTLA-4, PD-1 et PD-L1 ainsi que la présence de lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8+) à différents niveaux biologiques (protéique, transcriptomique et histologique) peuvent être associées à la réponse au traitement. De plus, nous évaluerons leur potentiel en tant que marqueurs prédictifs ou pronostiques.

Méthodes :

L'étude a inclus 56 patients atteints de cancer colorectal métastatique, traités par une combinaison de chimiothérapie et d'immunothérapie. La survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) ont été évaluées pendant un an à l'inclusion dans l'essai clinique. La réponse au traitement a été mesurée selon les critères RECIST, classant les patients en répondeurs (réponse complète ou partielle) et non répondeurs (maladie stable). Les données de réponse ont été corrélées avec plusieurs variables. L'expression des cibles d'immunothérapie et du marqueur CD8, déterminée par séquençage ARN a été étudiée. La concentration plasmatique des cibles d'immunothérapie, mesurée par ELISA et Luminex, a également été prise en compte. Enfin, la dernière variable correspond à la présence de la protéine PD-L1 et des lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8+), évaluée par double marquage immunohistochimique.

Résultats :

Les résultats de l'étude montrent qu'une forte expression de CTLA-4 est associée à une meilleure survie sans progression (PFS). De plus, la combinaison de fortes présences de la protéine PD-L1 et des lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8+) au sein de la tumeur est associée à une meilleure survie globale (OS), une meilleure réponse au traitement, et une tendance vers une meilleure PFS. Enfin, une faible concentration plasmatique de CTLA-4 et de PD-1 trois mois après le début du traitement est associée à une meilleure PFS.

Conclusion :

En résumé, certains marqueurs comme l'expression de CTLA-4, une forte présence de LT cytotoxique et de cellules exprimant PD-L1 avant traitement pourraient être indicatifs d'une réponse favorable au traitement et représenter un facteur de bon pronostic. De plus, les concentrations plasmatiques de PD-1 et CTLA-4 seraient des facteurs prédictifs de la PFS. Ces résultats suggèrent que l'évaluation des marqueurs au niveau protéique, transcriptomique et histologique pourrait améliorer la prédiction de la réponse à l'immunothérapie, pouvant aider à identifier les patients les plus susceptibles de tirer bénéfice de l'immunothérapie. Une étude plus large avec une cohorte de validation est nécessaire pour confirmer ces résultats et identifier d'autres biomarqueurs potentiels.

Mots clés : Cancer colorectal, Biomarqueurs, Immunothérapie, Chimiothérapie

Activation signal optimization for the development of a new generation of bispecific CAR-Ts in myeloma

Auteurs : P. Farvaque-Josson¹, P-E. Baurand², E. Sergent², P. Letondal¹, C. Ferrand¹, O. Adotevi¹

1. University of Franche Comté, EFS, INSERM, UMR RIGHT, 25000 Besançon, France
2. Diaclone SAS – Part of Medix Biochemica Group, 25000 Besançon, France

Introduction :

Over the past few years, CAR-T cells (for Chimeric Antigen Receptor T cells) have proven to be a revolutionary treatment for hematological cancers. This immunotherapy is based on the genetic modification of T lymphocytes, to make them express a receptor that recognizes a protein expressed on the surface of cancer cells, enabling them to specifically target and destroy the tumor. However, relapses occur in treated patients. These can be due to either a lack of CAR-T efficacy and persistence, or the escape of cancer cells from CAR-T recognition through loss of expression of the target protein. Bi-specific CAR-T strategy, using the recognition of two targets simultaneously, has shown to be effective to overcome the latter escape mechanism in some cases. However, relapses are still observed, that could be due to suboptimal design of the bispecific CAR-Ts, particularly co-stimulation domains which rule CAR-T activation, functionality and persistence.

Méthodes :

We therefore plan to develop a new generation of bispecific CAR-T cells in the context of multiple myeloma, a type of cancer that remains incurable. We will be targeting BCMA and CD38, two molecules overexpressed by myeloma tumor cells, that are validated targets in the literature. Our aim is to design and evaluate the efficiency of several constructs of bispecific CAR-T cells according to different targeting strategies (OR and IF-BETTER Boolean gates). Associated with an optimization of activation signals, we hope to limit cancer cell escape and boost CAR-T cell efficiency.

Résultats :

In the first step of this project, we generated several antibodies targeting CD38 and BCMA and verified their affinities and their functionality in single-targeted CAR constructs using flow cytometry. We successfully developed 7 functional CAR-Ts among which we selected a few candidates to proceed with the design and production of different constructs of bispecific CARs. We plan to assess how they modulate gene expression, T cell function and differentiation using flow cytometry, BioID and RNA sequencing.

Conclusions :

With this project, we hope to provide input on an unanswered biological question, how a bispecific CAR modulates T cell biology, and establish guidelines on how to efficiently design a bispecific CAR-T cell, that could be used to develop CAR-T cells to treat other malignancies. We also hope to propose promising candidates for a potential clinical development for the treatment of myeloma.

Mots clés :

CAR-T cells, myeloma, immunotherapy, bispecific, co-stimulation

Monounsaturated fatty acids metabolism and Th9 antitumor properties

Auteurs : Groetz E.^{1,2,3}, Perrey S.^{1,2}, Baeza-Garcia A.¹, Pierre L.^{1,2}, Kieu V.^{1,2,3}, Pichon L.^{1,2}, Végran F.¹, Apetoh L.⁴, Ghiringhelli F.^{1,2,5} and Rialland M.^{1,2}

1. UMR1231 Dijon, France ;
2. Université de Bourgogne ;
3. Université de Bourgogne Franche-Comté ;
4. Indiana University School of Medicine, USA ;
5. Centre FG Leclerc Dijon, France

Introduction :

IL-9 producing CD4⁺ T helper lymphocytes (Th9) are involved in anti-cancer immunity as described in several murine cancer models. Th9 transcriptional program induced by TGFβ1 and IL4 depends on a set of transcription factors including PU.1, STAT5, STAT6, IRF8, IRF4 and BATF. The commitment of CD4⁺ T lymphocytes toward a specific subtype and functions might be driven by the metabolism according to the environmental context. The Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) enzyme is involved in the lipogenesis : it catalyzes the biosynthesis of monounsaturated fatty acids by converting palmitic and stearic acids into palmitoleic and oleic acids respectively. The SCD enzyme exists in two isoforms in human and four in mice. SCD1 is currently the only isoform common to both human and mice.

Méthodes :

The aim of the project is to determine the role of the SCD1 and the metabolism of monounsaturated fatty acids in the induction and antitumor activity of Th9 lymphocytes.

Résultats :

Our results showed that Th9 displayed a specific fatty acid profile compared to Th1, Th2, iT17 and regulatory T cells. The expression of SCD1 is induced during in vitro Th9 differentiation and in intra-tumoral Th9 purified from mice-bearing B16-F10 tumors. We demonstrated that the SMAD3 and PI3K pathways were essential for the induction of SCD1 expression in Th9. CD4⁺ T helper lymphocytes with genetic or activity invalidation of SCD1 under Th9 polarization showed a decrease in IL-9 production and Th9 differentiation program-associated transcription factors expression. Furthermore, the lack of SCD1 activity triggered a reduction of palmitoleic and oleic acids. However, only oleic acid was able to rescue Th9 polarization in SCD1-invalidated T lymphocytes. Finally, the adoptive transfer of Th9 without SCD1 expression or activity into mice-bearing B16-F10 tumors lost their antitumoral properties.

Conclusion :

To conclude, the data highlighted that SCD1 and oleic acid were essential for Th9 polarization and their anti-cancer function.

Développement et optimisation d'un panel de cytométrie spectrale de 45 couleurs pour l'identification des populations cellulaires présentes dans le sang et la tumeur chez l'Homme

Auteurs : Léa Hampe^{1,2,3}, Susy Daumoine^{1,2,3}, Perrine Brozek^{1,2,3}, François Ghiringhelli^{1,2,3,4,5}, Marion Thibaudin^{1,2,3,4}

1. Université de Bourgogne, Dijon, France
2. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Département de Biologie et Pathologie des Tumeurs, Centre de Lutte Contre le Cancer Georges François Leclerc, UNICANCER, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France
4. Institut médical de génétique et d'immunologie, Dijon, France
5. Département d'Oncologie Médicale, Centre Georges François Leclerc, Dijon, France

Introduction :

Depuis plusieurs années, la cytométrie en flux connaît un essor important et permet, grâce à l'ajout de lasers et de détecteurs, une analyse de plus en plus approfondie et à haut débit de marqueurs cellulaires. Ce développement nous permet d'explorer plus en détail la complexité de la réponse immunitaire humaine mise en place dans un contexte de cancer par exemple. Une meilleure caractérisation des sous populations cellulaires permet également de mieux comprendre les mécanismes mis en place à la suite de traitements comme l'immunothérapie.

Méthodes :

Dans notre projet, nous avons voulu mettre au point un panel de cytométrie spectrale, développé sur un cytomètre Aurora (Cytek), pour réaliser un immunophénotypage en profondeur des populations cellulaires sanguines et infiltrant la tumeur chez l'Homme. En nous appuyant sur les résultats de l'article OMIP-69 (Park et al., 2020), nous avons sélectionné les différents marqueurs importants pour l'observation des grandes populations immunitaires ainsi que l'expression de différents points de contrôle immunitaires tels que PD-1, CTLA-4, etc...

Résultats :

Premièrement, nous avons optimisé le protocole de marquage et pour cela nous avons déjà testé différents kits de fixation/perméabilisation afin d'obtenir la meilleure résolution pour les marqueurs intracellulaires, sans trop impacter les épitopes membranaires et la morphologie des cellules et le kit de BD Biosciences Cytotfix/Cytoperm™ a été choisi. Ensuite, nous avons testé différentes étapes du protocole, toujours dans le but d'optimiser notre panel :

- Une étape d'incubation, avant le marquage membranaire, a été ajoutée dans le but de bloquer les sites non spécifiques,
- L'influence du nombre de lavages après fixation a été testée,
- Différents temps de marquages intracellulaires ont été testés (30, 45 et 60 minutes).

Une fois le protocole de marquage optimisé, et l'association des fluorochromes aux marqueurs qui nous intéressaient réalisée, nous avons pu commencer à tester les différents anticorps. Après titration de chaque anticorps, afin de définir le volume idéal pour avoir une bonne résolution sans trop impacter le reste du panel, nous avons lancé les premiers tests du panel complet. Certains problèmes sont alors apparus, le premier étant une faible résolution du marquage des différents récepteurs aux chimiokines. Nous avons alors testé d'ajouter ces anticorps en amont du mix d'anticorps membranaire, comme pour le TCRγδ. Ensuite, comme la résolution du marquage CD3 n'était pas très bonne, notamment dans la tumeur, nous avons essayé d'augmenter le volume d'anticorps ou de l'ajouter en amont du mix. Mais aucune amélioration n'a été observée et le fluorochrome associé à cet anticorps (SparkBlue574) a donc été remplacé par un autre fluorochrome plus brillant, le RealBlue544, permettant d'améliorer la qualité du marquage.

Conclusion :

Toutes les étapes d'optimisation de notre panel, que ça soit pour le protocole de marquage ou encore pour le choix des anticorps utilisés, nous ont permis d'arriver aujourd'hui à un panel spectral de 45 couleurs pour 53 marqueurs. Ce panel pourra être utilisé pour étudier de manière approfondie le système immunitaire et le microenvironnement tumoral de patients de divers études ou essais cliniques.

Mots clés : Cytométrie spectrale, immunophénotypage, points de contrôle immunitaire

Chitosan-based hydrogel formulation for subcutaneous administration of monoclonal antibodies

Auteurs. Guillaume Jacquot^{1, 2, 3, *}, Thomas Grea^{4, 5, *}, Alexandre Detappe^{1, 3, 6}

1. Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS)
2. Nano-H
3. Strasbourg Drug Discovery and Development Institute (IMS)
4. Institut Lumière Matière, UMR 5306, Université Claude Bernard Lyon1-CNRS
5. Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Université Jean Monet, CNRS, UMR 5223 Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP)
6. Équipe de Synthèse Pour l'Analyse, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR 7178 CNRS/Université de Strasbourg

Introduction :

Subcutaneous (SC) administration of monoclonal antibodies (mAbs) is an established approach for enhancing therapeutic outcomes and patient adherence to treatment. The FDA-/EMA-approved enzymatic approach, using recombinant human hyaluronidase (rHuPH20) for mAbs SC delivery, lacks tunable release properties and necessitates individual optimization for each mAb. Here, we report the development of a novel two-component hydrogel comprising chitosan and chitosan@DOTAGA, mixed with sterile intravenous mAb formulations to repurpose them as novel, tunable SC formulations.

Méthodes :

To synthesize the solution chitosan@DOTAGA and chitosan mixtures were prepared at a concentration of 5 w/w % by adding appropriate amounts of each component based on the desired formulation. A clinically-approved sterile intravenous formulation of mAbs was reconstituted at 200 mg mL⁻¹. One milliliter of the reformulated mAb solution was added to a syringe and 1 mL of the previously polymer solution was added to another syringe. The two syringes were connected and mixed by repeatedly injecting the contents of one syringe into the other and vice versa.

Résultats :

After obtaining the chitosan@DOTAGA:chitosan-mAb mixture, we first tested the release of this hydrogel in vitro, with several mAbs: trastuzumab (Trazimera, Pfizer), combination trastuzumab-pertuzumab (trazimera-perjeta, Roche), rituximab (Ruxience, Pfizer) and daratumumab (Darzalex, Janssen). Further, we validated the biodegradability and biocompatibility of the formulation with trastuzumab in mice studies and in nonhuman primates (NHPs), with clinically relevant administered volumes. Pharmacokinetic studies in mice and in NHPs demonstrated the ability to achieve tunable controlled release, based on the hydrogel formulation, a feat currently unattainable with rHuPH20, but also the possibility to obtain comparable pharmacokinetic parameters to that of the rHuPH20+mAbs formulation for a faster clinical translation approval. These results suggest the potential for rapid translational application to humans and open possibilities for the clinical development of this novel formulation for SC biosimilars.

Conclusion :

We report a new platform that enables unprecedented advances in controlled release for large protein post-SC delivery (150kDa), with a biocompatibility observed regardless to the species and the volume administered. We can develop a formulation for short or long term release. Our hydrogel-trastuzumab formulation demonstrates similar pharmacokinetic profile to rHuPH20-trastuzumab and will undergo GLP/GMP manufacturing for future phase I trial.

Mots clés :

Subcutaneous administration; hydrogel; antibody

Études des impacts immunologique de la combinaison adagrasib (inhibiteur de KRASG12C) et chimio-immunothérapie dans le cancer bronchique à petite cellules : identification d'un mécanisme induit de tolérance impliquant le TGF- β . (partie 1)

Auteurs : Guilhem Lalle^{1,2,3,4}, Charlène Latour^{1,2,3,4}, Lisa Nuttin^{1,2,3,4}, Pauline Russo^{1,2,3,4}, Caroline Truntzer^{1,2,3,4}, Julie Lecuelle^{1,2,3,4}, Valentin Derangère^{1,2,3,4}, David Rageot^{1,2,3,4}, Jill Hallin⁵, James G Christensen⁵, François Ghiringhelli^{1,2,3,4}, Emeric Limagne^{1,2,3,4} *

1. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR 1231, Université de Bourgogne, Dijon, France
4. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France,
5. Mirati Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA.

Introduction :

Dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), le traitement standard consiste à traiter les patients par une bi-chimiothérapie (pemetrexed + sels de platine) combinées à un anticorps anti-PD-1. L'efficacité de cette combinaison a été évaluée lors de la KEYNOTE-189 (Garassino et al, 2023). Le rationnel biologique de cette association repose en partie sur les capacités des chimiothérapies à induire des signaux inflammatoires. Malgré tout, de nombreux patients ne répondent pas à cette combinaison, probablement dû à un microenvironnement tumoral « immuno-désertique ». Une méta-analyse récente a montré qu'une forte expression intra-tumorale des chimiokines associées à CXCR3 est corrélée à une meilleure réponse aux immunothérapies de type anti PD-1/PD-L1 (Litchfield et al, 2021).

En utilisant un modèle murin de CBNPC résistants à la combinaison de chimio-immunothérapie (modèle LLC1), mon équipe a lié l'échec de ce traitement à son incapacité à induire le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs au sein de la tumeur. L'ajout d'un inhibiteur de MEK (MEKi) à la chimiothérapie, permet d'induire l'expression de CXCL10 et le recrutement des LT CD8⁺ au sein de la tumeur, ce qui restaure la sensibilité de ce modèle au blocage de PD-L1. Cependant, l'utilisation clinique des MEKi montre des résultats mitigés dans le CBNPC et des toxicités non négligeables (Han et al, 2021). Dans ce contexte, nous avons cherché à utiliser d'autres molécules capables de sensibiliser les tumeurs « froides » à la chimio-immunothérapie par inhibition du signal oncogénique de la voie KRAS/MEK.

Des inhibiteurs spécifiques de KRASG12C (KRASi) ont récemment été développés, dont l'Adagrasib, qui a démontré une efficacité clinique prometteuse dans le CBNPC et le cancer du côlon, ainsi qu'une faible toxicité par rapport au MEKi (Ignatius Ou et al, 2022). De nombreuses études décrivent les effets des KRASi sur le microenvironnement tumoral (TME), contribuant à la mise en place d'une réponse immunitaire anti tumorale (RIAT) efficace (Molina-Arcas et al, 2024). Cela ne semble pas être le cas en monothérapie dans le modèle LLC1 (muté KRASG12C) de CBNPC que nous utilisons. Nous avons donc cherché à combiner l'Adagrasib à un traitement standard de chimio-immunothérapie pour potentialiser l'effet immunitaire et thérapeutique de ces thérapies. Malgré sa capacité à recruter des LT au sein de la tumeur, tel que nous l'avons observé avec le MEKi, cette combinaison ne présente aucun bénéfice thérapeutique dépendant de la réponse T-CD8⁺ dans notre modèle. Nous avons

donc cherché à explorer plus en profondeur les effets immunitaires de ce schéma thérapeutique dans le but de comprendre cette inefficacité et de trouver des cibles permettant d'induire une RIAT et potentialiser l'efficacité thérapeutique de nos traitements.

Méthodes :

Nous travaillons avec la lignée froide de CBNPC LLC1Nras^{-/-} exprimant la mutation KRASG12C.

In vitro nous avons évalué l'effet de la combinaison Cisplatine/Pemetrexed (CDDP/PEM) + KRASi sur la survie des cellules tumorales, la mort immunogène (CXCL10) et sur l'expression des gènes associés à la réponse immunitaire par RNAseq. Nous avons ensuite validé l'expression du TGF- β par multiplex.

In vivo nous avons évalué l'efficacité thérapeutique du KRASi seul ou en combinaison avec une chimio-immunothérapie (CDDP/PEM + anti PD-L1). Des souris C57bl/6j immunocompétentes porteuses de tumeurs LLC1Nras^{-/-} ont été traitées par CDDP/PEM et anti-PD-L1 +/- KRA-Si (Adagrasib). La pousse tumorale a été monitoré trois fois par semaine.

Afin d'étudier l'effet de ces traitements, seuls ou en combinaison, sur la réponse immunitaire anti tumorale, nous avons récupéré les tumeurs 1, 3 ou 8 jours après l'administration de chimiothérapie pour conduire des analyses de cytométrie spectrale, de microscopie, d'ELISPOT, d'analyse multiplex et des analyses transcriptomiques. Nous avons ensuite cherché à bloquer le TGF- β par injection intra péritonéale d'un anticorps bloquant.

Études des impacts immunologique de la combinaison adagrasib (inhibiteur de KRASG12C) et chimio-immunothérapie dans le cancer bronchique à petite cellules : identification d'un mécanisme induit de tolérance impliquant le TGF- β . (partie 2)

Auteurs : Guilhem Lalle ^{1,2,3,4}, Charlene Latour ^{1,2,3,4}, Lisa Nuttin ^{1,2,3,4}, Pauline Russo ^{1,2,3,4}, Caroline Truntzer ^{1,2,3,4}, Julie Lecuelle ^{1,2,3,4}, Valentin Derangère ^{1,2,3,4}, David Rageot ^{1,2,3,4}, Jill Hallin⁵, James G Christensen ⁵, François Ghiringhelli ^{1,2,3,4}, Emeric Limagne ^{1,2,3,4} *

1. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR 1231, Université de Bourgogne, Dijon, France
4. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France,
5. Mirati Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA.

Résultats :

L'efficacité thérapeutique du KRASi n'est pas additive avec la chimio-immunothérapie ni dépendante des LT CD8+, bien que la combinaison des traitements induise l'expression de CXCL10 et l'accumulation intra tumorale de LT effecteurs. En étudiant le phénotype et la fonctionnalité des LT, nous avons pu observer qu'ils produisent moins de cytokines inflammatoires que les LT intratumoraux issus des souris non traitées. Cela suggère que des mécanismes immunosuppresseurs induits par les traitements bloquent la RIAT médiée par les LT. In vitro les traitements semblent induire l'expression du TGF- β 1 et de molécules associés. Nous avons confirmé ces observations in vivo en plus d'observer une forte accumulation de Treg au sein de la tumeur. L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-TGF- β , nous a permis de sensiblement améliorer l'efficacité des traitements et de guérir la moitié des souris. Cet effet est perdu lorsque les souris sont déplétées en LT CD8+. De plus, lorsque les souris sont guéries, elles semblent présenter une mémoire anti tumorale spécifique des tumeurs LLC1Nras-/-.

Conclusion :

La combinaison de chimio-immunothérapie + KRASi induit le recrutement de LT effecteurs au sein de la tumeur mais ceux-ci sont inhibés par la production concomitante de TGF- β 1. L'addition d'un anticorps anti TGF- β à la combinaison de traitement permet de restaurer la RIAT dépendant des LT et d'améliorer la réponse thérapeutique.

Mots clés : Autophagy ; CASM ; STING ; Immune cells ; Immunotherapy

Rôle des interactions NK/TAM et de CXCL9 sur le recrutement des T-CD8⁺ et l'efficacité de la combinaison chimio-immunothérapie et inhibiteur de MEK dans les cancers bronchiques

Auteurs : Charlene Latour^{1,2,3,5,*}, Lisa Nuttin^{1,2,3,5,*}, Valentin Derangère^{1,2,3,5}, Romain Aucagne^{2,3,5,6}, François Ghiringhelli^{1,2,3,4,5} and Emeric Limagne^{1,2,3,5},

1. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR 1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
4. Département d'Oncologie Médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
5. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France, Plateforme CRIGEN, CHU Dijon, France
- *. co-auteurs

Introduction : Chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) métastatique, la bi-chimiothérapie à base de platine (cisplatine ou carboplatine) et pemetrexed combinée à un anticorps anti-PD-1 a montré un bénéfice clinique significatif et est devenue le standard de traitement (essai KEYNOTE-189). Le rationnel biologique de cette association repose en partie sur les capacités des chimiothérapies à induire des signaux inflammatoires, tels que la chimiokine CXCL10, impliquée dans le recrutement des T-CD8⁺ et la réponse à l'anti-PD-1 (Litchfield et al, Cell, 2021). Malgré le progrès thérapeutique que représente la chimio-immunothérapie, certains patients sont intrinsèquement résistants à cette combinaison, suggérant qu'il existe des mécanismes de résistance. Récemment, nous avons montré que la signalisation oncogénique RAS/MEK limite la capacité du doublet cisplatine/pemetrexed à induire la chimiokine CXCL10, et le recrutement lymphocytaire T-CD8⁺. Ainsi, l'ajout d'un inhibiteur de MEK (MEKi) à la combinaison chimio-immunothérapie restaure un signal immunogène via CXCL10, permettant aux T-CD8⁺ d'infiltrer plus largement la tumeur, la rendant plus sensible à l'immunothérapie (Limagne E et al, Cancer Cell, 2022). Suite à ce travail, nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes NK pouvaient également être recrutés et activés dans le microenvironnement tumoral et participer directement ou indirectement (via les macrophages) au recrutement des T-CD8⁺ et à l'effet thérapeutique de la combinaison chimio-immunothérapie/MEKi.

Méthodes : Nous avons utilisé le modèle préclinique de cancer du poumon LLC1, muté KRASG12C. Des souris c57bl/6 immunocompétentes porteuses de tumeurs LLC1 ont été traitées par cisplatine/pemetrexed et anti-PD-L1 en combinaison au MEKi (trametinib). Pour mettre en lumière le rôle des NK et des macrophages dans notre modèle, nous avons utilisé différentes techniques d'immunomonitoring (Nanostring, cytométrie en flux spectrale, marquage intracellulaire des cytokines, IHC, ELISPOT) et de déplétion des cellules NK (anticorps anti-NK1.1). Nous avons aussi utilisé des anticorps neutralisant les molécules CXCL9, CXCR3, NKG2D et IFN γ de manière à modifier la biologie du microenvironnement des tumeurs et à mettre en évidence les mécanismes immunologiques in vivo. Enfin, nous avons également généré des cellules LLC1 Qa1b^{-/-} pour mettre en évidence l'intérêt de bloquer la voie inhibitrice des cellules NK : Qa1b/NKG2A.

Résultats : Nous montrons que la combinaison chimiothérapie/MEKi favorise le recrutement et l'activation des cellules NK dans le microenvironnement tumoral par l'intermédiaire de CXCL10 et du ligand activateur NKG2D (Rae1 et Mult1 sont induit par la chimiothérapie à la surface des cellules tumorales LLC1). CXCL9 n'est pas impliquée dans le recrutement des cellules NK. L'activation des NK provoque la sécrétion d'IFN γ , ce qui déclenche la repolarisation des macrophages intra-tumoraux et la production de CXCL9. En parallèle de l'expression de CXCL10 par les cellules tumorales, l'expression de CXCL9 par les macrophages amplifient le recrutement des cellules T-CD8⁺. Ainsi, la déplétion des cellules NK, la neutralisation de CXCR3, de CXCL9 ou de NKG2D limite le recrutement des cellules T-CD8⁺ et leur capacité à induire une réponse contre les néo-antigènes tumoraux. L'efficacité thérapeutique de la combinaison chimiothérapie/MEKi est également réduite. L'activation de l'immunité via l'IFN γ déclenche en retour l'expression du ligand à NKG2A, Qa-1b (HLA-E chez l'homme), ce qui limite l'activation des cellules NK et le recrutement des cellules T CD8⁺. Ainsi, la réduction de la voie NKG2A, en utilisant des cellules LLC1 Qa1b^{-/-}, améliore l'efficacité anti-tumorale de notre combinaison. Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle préclinique « froid » de cancer du côlon CT26 traité par chimio-immunothérapie (TAS102/oxaliplatine/aPD1).

Conclusion : Nos résultats permettent de mieux comprendre l'additivité immunologique et thérapeutique de la combinaison cisplatine/pemetrexed/aPD1 et MEKi. En effet, nous montrons qu'elle stimule à la fois le recrutement des NK (via CXCL10) et leur activation (via NKG2D). Ce phénomène assure, via l'IFN γ , une repolarisation des macrophages intra-tumoraux vers des cellules davantage productrices de CXCL9. Cette chimiokine assure une boucle d'amplification du recrutement des T-CD8⁺ parallèle à CXCL10. Enfin, nous montrons que cette activation des NK génère une boucle de rétrocontrôle dépendante de la voie NKG2A/Qa1b et que le ciblage de cette voie amplifie l'inhibition de la croissance tumorale.

Globalement, notre projet montre que dans un contexte de résistance à la chimio-immunothérapie, le ciblage des NK (recrutement et inhibition des voies régulatrices) pourrait être une piste intéressante pour amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale en modulant à la fois la biologie des macrophages intra-tumoraux et le recrutement des cellules T CD8⁺.

Mots clés : Chimio-immunothérapie, MEKi, T-CD8⁺, NK, Macrophages, CXCL10/CXCL9, NKG2D/A

Développement d'une analyse phénotypique 43 marqueurs du microenvironnement tumoral chez la souris par cytométrie en flux spectral

Auteurs : Charlène Latour^{1,2,3,4}, Lisa Nuttin^{1,2,3,4}, Emeric Limagne^{1,2,3,4}

1. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM LNC-UMR 1231, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
4. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France, Plateforme CRIGEN, CHU Dijon, France

Introduction :

Pouvoir analyser la composition du microenvironnement tumoral est essentiel pour déterminer l'impact de nos traitements. Comprendre pourquoi celui-ci est efficace ou non permet alors d'ajuster les associations de traitements comme des immunothérapies. La cytométrie spectrale permet d'étudier un grand nombre de marqueurs et donc une description plus détaillée du microenvironnement tumoral. Le développement de cette analyse phénotypique devait nous permettre de caractériser nos modèles tumoraux et de mieux évaluer l'impact des traitements sur le microenvironnement tumoral. Nous avons donc choisi des marqueurs qui nous permettent d'étudier à la fois les populations immunitaires et les cellules non immunitaires telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes associés au cancer.

Méthodes :

Ce panel a été développé sur le cytomètre en flux spectral Aurora (Cytek). Pour développer cette analyse phénotypique, plusieurs étapes ont été nécessaires. La première a été de choisir quelles populations étudier et donc quels marqueurs étaient appropriés. L'association des fluorochromes et des marqueurs a été définie lors de la conception du panel. Et afin d'obtenir de meilleurs marquages, nous avons optimisé le protocole en ajoutant des tampons, en maximisant la digestion des tumeurs, en testant différents clones d'anticorps et en les titrant. L'analyse manuelle des données a été réalisée sur SpectroFlo et OMIQ, et l'analyse non supervisée a été réalisée sur OMIQ.

Résultats :

Dans un premier temps une stratégie de gating théorique permettant d'isoler nos populations d'intérêt a permis de valider théoriquement les marqueurs choisis. Nous avons par la suite associé nos marqueurs en fonction de leurs expressions, leurs co-expressions, à des fluorochrome plus ou moins brillant et des signatures spectrales plus ou moins similaire.

Au niveau technique nous avons optimisé le protocole de marquage avec l'utilisation de tampons (True-Stain Monocyte Blocker, TrueStain FcX PLUS et Brilliant stain buffer plus) et la titration des anticorps. Tout cela nous a permis de réduire considérablement les marquages non spécifique ainsi que de diminuer l'étalement de la fluorescence et d'augmenter la résolution des marqueurs co-exprimés.

Au cours des différents tests de marquages nous avons observé que l'une des enzymes utilisée pour la digestion des tumeurs dégradait certains épitopes de marqueurs tels que CD27, Ly6C et autres, c'est pourquoi nous avons titré cette enzyme.

A l'issue de ces tests, nous avons réalisé des marquages complets qui ont mis en avant des diagonalisations trop importantes des cellules négatives dans certains marqueurs entraînant une perte de résolution. Cela nous a poussés à repenser au panel et repasser par une seconde phase de réflexion théorique du panel. De nouvelles titrations ont alors été réalisées ainsi que des tests de marquage complet pour ré-optimiser notre panel. Une fois optimisé, nous avons effectué cette analyse phénotypique sur différents modèles de tumeurs précliniques afin de les caractériser.

Conclusion :

La mise en place d'un panel de 43 marqueurs nécessite une mise au point rigoureuse du protocole de marquage pour améliorer la qualité de l'analyse supervisée et non supervisée. Ce panel nous permet d'avoir une meilleure vue d'ensemble des populations immunitaires et non immunitaires du microenvironnement tumoral. Et ainsi une meilleure compréhension de l'impact de nos traitements sur celui-ci.

Mots clés : cytométrie spectrale de flux - analyse phénotypique

IL15-GD2 CAR-T cells antitumor efficacy in the immunosuppressive tumor microenvironment of glioblastoma

Auteurs : Cindy Lamorlette ^{1,2}, A. Chateau ³, T. Moulinet ^{5,1,2}, T. Briot ^{3,2}, S. Pinel ³, C. Boura ³, G. Dotti ⁶, D. Bensoussan ^{4,1}, L. Reppel ^{4,1}.

1. Meurthe-et-Moselle, Ingénierie Moléculaire, Cellulaire et Physiopathologie (IMoPA-UMR 7365) Vandoeuvre-lès-Nancy, Grand Est, France.
2. Meurthe-et-Moselle, Université de Lorraine, École doctorale Biologie Santé Environnement ; Nancy, Grand Est, France.
3. Meurthe-et-Moselle, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN-UMR 7039) ; Nancy, Grand Est, France.
4. Meurthe-et-Moselle, Unité de Thérapie Cellulaire (UTCT), Centre Hospitalier Universitaire de Nancy ; Nancy, Grand Est, France.
5. Meurthe-et-Moselle, Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre hospitalier universitaire de Nancy ; Nancy, Grand Est, France.
6. The University of North Carolina (UNC) at Chapel Hill Lineberger Comprehensive Cancer Center ; Chapel Hill, NC, United States.

Introduction

Glioblastomas (GBMs) are the most common and aggressive brain tumors with current treatments resulting in 90% recurrences. These therapeutic failures are partly attributed to the immunosuppressive tumor microenvironment (TME).

CAR-T cells are innovative immunotherapies and have emerged with promising potential. But despite their efficacy in treating hematological malignancies, their application to solid tumors remains challenging.

Several studies demonstrated the efficacy and safety of GD2 CAR-T cells for the treatment of GBMs. However, recurrences occur in vivo applications. Besides, the GBM TME impact on the sustainability of the curative effect remains poorly studied.

In this study, we sought to investigate the role of myeloid derived suppressor cells (MDSC), a predominant cell type in the GBM TME, in the acquisition of resistance and in the recurrence after CAR-T cells therapy.

Methods

GD2 CAR-T cells were generated by retroviral transduction, and their function was tested on GBM GD2-high and -low cell lines in monolayer and spheroid cultures.

GBM induced monocytic-like MDSCs (m-MDSCs) were generated in vitro, by one-week cocultures between GBM cell line and peripheral blood mononuclear cells from healthy donors, in a GM-CSF enriched medium.

Bi-/tri-cultures were then performed between GBM cells, CAR-T cells and m-MDSCs, in normoxia or hypoxia conditions, and CAR-T cells functional assays were carried-out.

Results

In vitro cultures showed that GD2 CAR-T cells exert specific cytotoxic activity against GD2-high cell lines in bi-/tri-dimensional models.

GBM cell line induced monocytic-like MDSCs in vitro, with immunosuppressive activity towards activated T cells.

These glioblastoma-induced m-MDSCs were also able to inhibit CAR-T cells proliferation and display an exacerbate immunosuppression in hypoxia context in a bidimensional in vitro model.

Conclusion

To conclude, GD2 CAR-T cells exert a specific and efficient antitumor activity in GD2-positive GBM in vitro models. However, GBM induced m-MDSC seem to be able to alter their functions. In the future, we'll thoroughly characterize these GBM-induced m-MDSCs to understand their mechanism of action and attempt to inhibit their suppressive function. This complex in vitro model could allow developing a combined strategy, associating GD2 CAR-T cells and an anti-TME agent, making it possible to improve the management of GBM patients.

Keywords: GD2 CAR-T cells, Glioblastoma, Myeloid derived suppressor cells, Immunosuppressive microenvironment

Phase I dose escalation study to evaluate safety and preliminary efficacy data of trifluridine/tipiracil +/- bevacizumab plus XB2001 (anti-IL-1 α True Human antibody)

Auteurs : Marion Thibaudin ^{1,2,3,4}, Nicolas Roussot ^{1,2,3,4,5}, Chloé Burlot ⁶, Antonin Schmitt ⁶, Julie Vincent ⁵, Zoé Tharin ⁵, Leila Bengrine ⁵, Hélène Bellio ⁵, Aurélie Bertaut ⁷, Léa Hampe ^{1,2}, Susy Daumoine ^{1,2}, Emilie Rederstorff ⁸, Morgane Peroz ^{1,2}, Titouan Huppe ^{1,2}, Valentin Derangère ^{1,2,4,5}, David Rageot ^{1,2,4}, John Simard ⁹, Caroline Truntzer ^{1,2}, Jean David Fumet ^{1,2,3,4,5}, Francois Ghiringhelli ^{1,2,3,4,5}

1. Centre de Recherche INSERM Center for Translational and Molecular Medicine, 21000 Dijon, France
2. Cancer Biology Transfer Platform, Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France
3. University of Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
4. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France
5. Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France
6. Pharmacy Department, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue Pr Marion, 21079, Dijon Cedex, France.
7. Methodolgy and biostatistics unit, GF Leclerc Center, Dijon, France
8. Clinical research center, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
9. XBiotech, Austin, Texas, USA

Introduction :

XB2001 est un anticorps monoclonal d'origine humaine, sans modification, qui neutralise l'activité biologique de l'IL-1 alpha. Dans le micro-environnement tumoral, l'IL-1 alpha stimule la néoangiogenèse, le remodelage de la matrice tissulaire et induit l'endothélium vasculaire pour faciliter la migration trans-endothéliale. L'IL-1 alpha est fortement exprimé dans les cancers colorectaux humains et est associé à un mauvais pronostic. Nous avons évalué les données de sécurité et d'efficacité clinique préliminaire de l'association du trifluridine/tipiracil (FTD/TPI), du bevacizumab et du XB2001 dans le cadre du traitement du cancer colorectal métastatique (mCRC) multi-traité.

Méthodes :

Cette étude est une étude de phase 1, monocentrique, initiée par un investigateur, utilisant un schéma 3+3. L'essai de phase I a été mené pour étudier la dose maximale tolérée (DMT) de XB2001 à des doses de 250 mg, 500 mg et 1000 mg tous les 14 jours, associée au FTD/TPI les jours 1-5 et 8-12 tous les 28 jours. La dose DMT de XB2001 + FTD/TPI a ensuite été associée avec le bevacizumab administré par voie orale à 35 mg/m² les jours 1 et 15. La sécurité, l'efficacité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie ont été évaluées.

Résultats :

Dix-sept patients ont été inclus. L'âge médian était de 67,4 ans (49-81), 9 étaient des hommes, ECOG 0/1 = 8/9. Aucun patient n'a présenté de toxicité limitant la dose à aucune dose. Les événements indésirables liés au traitement (TRAE) les plus courants, tous grades confondus (G), étaient la diarrhée (35,3 %), les nausées (47,1 %) et l'anémie (35,3 %). Les TRAE de grade 3-4 étaient la neutropénie (17,6 %), l'hypertension et l'infection (5,9 % chacun). La dose recommandée pour la phase 2 (RP2D) de XB2001 a été déterminée à 1000 mg. Le taux de contrôle de la maladie était de 76 % avec 23 % de réponse partielle. La réponse et une survie sans progression plus longue étaient associées à une diminution des niveaux sériques d'IL-6 pendant le traitement. Une forte expression intra-tumorale de l'IL-1 α au départ et l'infiltration CD8/PD-L1 sont associées à une meilleure survie sans progression.

Conclusion :

L'association du XB2001 avec le FTD/TPI et le bevacizumab est faisable et sûre, et a montré une activité clinique encourageante dans les cas de mCRC chimiorésistants.

Mots clés : cancer colorectal, immunothérapie, essai clinique, infiltration immunitaire

Immunosensitizing Effect of TLR Agonist Combination in the Treatment of Cold Tumors

Auteurs : Thomas MORIN^{1,2}, Isis BENOIT-LIZON^{1,2}, Cindy RACOEUR^{1,2}, Maxime CABBILLARD¹, Elise JACQUIN¹, Catherine PAUL^{1,2}

1. Université de Bourgogne, INSERM UMR1231 CTM, Dijon, France

2. École Pratique des Hautes Études, Université PSL, Paris, France.

Introduction

In recent years, immune checkpoint inhibitors (ICIs) have revolutionized cancer treatment by harnessing the natural capacities of the immune system to target tumors. However, these therapies are primarily effective in tumors infiltrated by T lymphocytes, known as “hot” tumors. Regarding non-infiltrated or “cold” tumors, new strategies aim to stimulate the innate immune system and promote tumor infiltration by lymphocytes. Various methods are being explored to convert cold tumors to hot ones, including the direct stimulation of the immune response using Toll-like receptor (TLR) agonists, which are involved in pathogen recognition and immune response modulation. Certain TLR agonists are already used in clinics for the treatment of cervical cancer (Monophosphoryl Lipid A (MPLA), a TLR4 agonist), bladder cancer (Bacillus Calmette-Guerin (BCG), a TLR2/4/9 agonist), and superficial skin carcinomas (Imiquimod, a TLR7 agonist). Thus, TLR agonists represent a highly promising therapeutic strategy. However, their efficacy remains limited, especially in advanced-stage cancers. To overcome this limitation, our project aims to combine different TLR ligands (TLR4 and TLR7) that act through different signaling pathways (MyD88 and TRIF-dependent pathways) to enhance their effect and achieve a more robust and synergistic immune response.

The objectives of this project focus on evaluating and characterizing the ability of TLR4 and TLR7 agonist combination to convert cold tumors into hot ones and to treat them effectively.

Methods

In vivo: CT26 colon carcinoma cells were subcutaneously injected into BALB/c mice. Tumor-bearing mice received intravenous injections of OM-174 (TLR4 agonist), Resiquimod (TLR7/8 agonist), or their combination. Tumor growth was monitored, and treatments were evaluated for efficacy.

In vitro: RAW264.7 macrophages and BMDCs were treated with OM-174, Resiquimod, or their combination. iNOS expression, IRF5 nuclear translocation, IL-12 secretion were assessed using Western blotting and ELISA respectively.

Results

We tested the anti-tumor efficacy of two compounds, OM-174 (a TLR4 agonist) and Resiquimod (a TLR7/8 agonist), both individually and in combination. Our preliminary data show that while individual treatments exert limited anti-tumor activity, the combination of OM-174 with Resiquimod induces strong tumor growth inhibition and even complete regressions. To explore the mechanisms underlying the enhanced efficacy of the OM-174 and Resiquimod combination, we conducted in-depth studies on immune cell models, particularly RAW264.7 macrophages. Our results revealed that the combination of the two agonists significantly increases the activation of iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), a marker of M1 macrophage polarization, known for its anti-tumor properties. We also observed that the combination induces stronger nuclear translocation of IRF5, a transcription factor involved in the expression of M1 genes, such as IL-12 which promotes Th1 polarization of CD4 T lymphocytes. The increased secretion of IL-12 was also confirmed by ELISA in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs).

Conclusion

Our results demonstrate that the combination of OM-174 and Resiquimod induces a synergistic immune response, leading to strong tumor growth inhibition and even complete cures. From our in vitro data, this enhanced efficacy could be partly linked to the increased activation of M1 macrophages through significant induction of iNOS and enhanced nuclear translocation of the IRF5 factor, resulting in increased IL-12 secretion.

Keywords: Cancer, Immunotherapy, TLR Agonists, Tumor Microenvironment

Ciblage de l'IL-1 β pour améliorer l'efficacité de la chimio-immunothérapie dans le cancer du pancréas

Auteurs : Perrichet Anaïs ¹, Thieffin Marie ¹, Jacob Pierre ¹, Derangère Valentin ¹, Ghiringhelli François ¹, Rébé Cédric ¹

1. PTBC (Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer), Centre GF Leclerc, Dijon ; INSERM1231, UFR des sciences de santé, Dijon. Équipe labélisée Ligue Contre le Cancer.

Introduction

L'incidence de l'adénocarcinome canalaire pancréatique a considérablement augmenté au cours des 30 dernières années. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ciblant PD-1/PD-L1 ont révolutionné la prise en charge de nombreux cancers en activant principalement les cellules T CD8. Toutefois, ces derniers n'ont montré aucune efficacité pour les patients présentant un cancer du pancréas.

L'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire produite par la voie des inflammasomes et l'activation de la caspase-1, joue un rôle crucial dans le développement du cancer pancréatique, principalement par ses effets pro-inflammatoires et pro-tumoraux.

Methods

Pour ce projet, les cellules KPC ont été utilisées. Ces cellules expriment des mutations oncogènes dans les gènes Kras (Kras^{G12D}) et Trp53 (Trp53^{R172H}), deux mutations fréquemment observées dans les cancers pancréatiques humains. Les expériences ont été réalisées avec des souris C57BL/6 WT, Il1b^{-/-} et Il1r1^{-/-} afin de comprendre le rôle de l'IL-1 β .

Results

"Nos résultats montrent que l'inhibition de l'IL-1 β chez des souris Il1b^{-/-} ou Il1r1^{-/-} améliore significativement l'efficacité de la chimio-immunothérapie, allant jusqu'à la guérison des souris dans des modèles de PDAC (KPC). Nous montrons également que les cellules T CD8⁺ jouent un rôle crucial dans l'efficacité du traitement, mais que l'IL-1 β contribue à leur absence au sein de la tumeur. Un blocage partiel de l'efficacité des traitements via l'utilisation d'anticorps indique que les cellules T CD8⁺ sont partiellement recrutées via l'interaction CXCR3-CXCL9/10, bien qu'une autre voie de recrutement puisse être active en parallèle. Par ailleurs, nous démontrons que l'IL-1 β est produite par les macrophages associés aux tumeurs (TAM) dans le microenvironnement tumoral, tandis que les fibroblastes associés au cancer (CAF) semblent être les principales cellules cibles."

Conclusion

Nos résultats sur le cancer pancréatique démontrent que l'inhibition de l'IL-1 β améliore significativement l'efficacité de la chimio-immunothérapie, notamment en augmentant la présence des cellules T CD8⁺ via l'axe CXCR3-CXCL9/CXCL10 ainsi qu'une seconde voie qui reste à confirmer.

Mots clés : IL-1 β , chimio-immunothérapie, cancer pancréatique

Ciblage de l'IL-1 β pour améliorer l'efficacité de la chimio-immunothérapie dans le cancer du poumon

Auteurs : Perrichet Anaïs¹, Lecuelle Julie¹, Limagne Emeric¹, Hélène Bellio¹, Thieffin Marie¹, Aucagne Romain², Truntzer Caroline¹, Derangère Valentin¹, Ghiringhelli François¹, Rébé Cédric¹

1. PTBC (Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer), Centre GF Leclerc, Dijon ; INSERM1231, UFR des sciences de santé, Dijon. Équipe labélisée Ligue Contre le Cancer.
2. Plateforme "CRIGEN: CRISPR Genomics" - CHU Dijon-Bourgogne – INSERM1231, UFR des sciences de santé, Dijon.

Introduction :

L'immunothérapie PD-1/PD-L1 a révolutionné la prise en charge de nombreux cancers. Ces molécules, généralement associées à la chimiothérapie, agissent essentiellement en activant les cellules immunitaires T CD8. Toutefois, dans le cas des cancers métastatiques du poumon non-à-petites cellules (CBNPC), la plupart des patients présentent une résistance intrinsèque à ces inhibiteurs de «checkpoints».

L'IL-1 β dont la production peut être induite par la voie des inflammasomes et l'activation de la caspase-1, est une cytokine qui peut être soit bénéfique, soit délétère, selon les modèles et les agents cytotoxiques utilisés.

Dans un contexte de cancer pulmonaire, l'IL-1 β apparaît comme pro-tumorale en absence de traitement. En effet, plusieurs études précliniques ont montré que l'IL-1 β favorisait la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse ainsi que le recrutement de macrophages de type 2 dans la tumeur. Ces observations ont été renforcées par l'étude CANTOS (Novartis Pharmaceuticals, 2020) dans laquelle le traitement par canakinumab, un anticorps ciblant l'IL-1 β , a permis de réduire l'incidence et la mortalité liées au cancer du poumon pour des patients atteints de maladies cardiovasculaires. Cependant, aucune étude préclinique ne s'est intéressée au rôle de l'IL-1 β dans l'efficacité des traitements standards, à savoir une association chimiothérapie et immunothérapie. En outre, les essais cliniques CANOPY ne montrent pas de bénéfice à l'ajout du canakinumab dans le traitement du CBNPC.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de l'IL-1 β dans la réponse aux traitements par chimio- immunothérapie, dans le but de cibler cette interleukine et d'améliorer la réponse aux traitements dans le cancer du poumon.

Méthodes :

Pour ce projet nous avons utilisé des cellules LLC1 présentant une mutation activatrice de KRAS et une suractivation de la voie MAP kinase. Des cellules LLC1 modifiées par crispr-cas9 ont également été utilisées afin de confirmer l'implication de différents gènes.

Résultats :

Nous avons découvert que l'injection ou la surexpression d'IL-1 β améliore l'efficacité d'un traitement par chimio-immunothérapie (cisplatine/pemetrexed/anti-PD-1), dans des modèles murins de cancer du poumon, avec une éradication complète de la tumeur pour certaines souris. De plus, les patients ayant une expression élevée des gènes IL1B et IL1R1 ont montré une meilleure réponse à ces traitements. L'effet antitumoral de l'IL-1 β dépend de la production de CXCL10 dérivée des cellules cancéreuses, ce qui favorise le recrutement des cellules T CD8 sur le site tumoral.

La protéine AIM2 est fortement exprimée dans les tissus tumoraux humains et les lignées de cellules cancéreuses pulmonaires, son activation favorise l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1 β . Le ligand d'AIM2 étant l'ADN double brin, nous avons mis en lumière le rôle de la protéine TXNIP (Thioredoxin Interacting Protein), qui déclenche la libération de l'ADN mitochondrial (mtDNA) dans le cytosol des cellules cancéreuses pulmonaires, entraînant ainsi l'activation de la caspase-1, la sécrétion d'IL-1 β et de CXCL10, et inversant la résistance à la chimio-immunothérapie.

Conclusion :

Ce travail met en évidence un rôle positif inattendu de l'IL-1 β dans le contexte du cancer du poumon et montre que promouvoir la production d'IL-1 β au site tumoral peut être utilisé pour inverser la résistance à la chimio-immunothérapie.

Mots clés : IL-1 β , chimio-immunothérapie, cancer pulmonaire"

La déplétion en LTCD4 contrôle la réponse anti-tumorale des LTCD8 et améliore l'efficacité de l'immunothérapie ciblant PD-1

Auteurs : Thibault Vernet^{*1,2,3}, Fanny Chalmin^{*1,2,3}, Anaïs Perrichet^{1,2,3}, Cédric Rébé^{1,2,3}, Caroline Truntzer^{1,2,3}, François Ghiringhelli^{1,2,3}

1. Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France
2. Team 1 TIRECs: "Therapies and Immune REsponse in CancerS"
3. Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

Introduction :

L'importance des lymphocytes TCD8 (LTCD8) dans l'immunité anti-tumorale a été démontrée dans de nombreux types de cancers. Cependant, les tumeurs peuvent échapper à la réponse immunitaire par divers mécanismes d'immunosuppression. Bien que la réactivation des réponses anti-tumorales des LTCD8 par blocage des « immune checkpoints » tel que PD-1 ait démontré des effets notables sur le traitement du cancer, malheureusement son taux de réponse doit encore être amélioré puisque de nombreux patients ne répondent pas et certains types de tumeurs restent largement réfractaires à ces thérapies. Plusieurs mécanismes, tels que l'absence d'infiltration immunitaire ou l'épuisement terminal des LTCD8 au sein de la tumeur, peuvent contribuer à cette résistance. Il est donc important de les comprendre pleinement afin de les surmonter.

Dans notre projet, nous avons observé qu'une déplétion des lymphocytes TCD4 (LTCD4) permettait de lever la résistance aux immunothérapies anti-PD-1 chez la souris dans plusieurs modèles de cancer et en particulier dans le modèle MC38 (côlon).

Méthodes :

L'efficacité de l'association anti-CD4/anti-PD1 (bithérapie) a été évaluée par des tests de croissance tumorale dans différents modèles de cancer murins résistants. L'activation, l'épuisement lymphocytaire et le recrutement, essentiels dans la réponse aux thérapies anti-PD-1, ont été analysés par cytométrie en flux, par RT-qPCR et par « single-cell RNAseq ». Ces expériences ont été réalisées dans la tumeur MC38 et dans le ganglion drainant la tumeur de souris contrôles ou déplétées en LTCD4. La spécificité de la réponse immunitaire des LTCD8 a été étudiée par un test ELISPOT et le traitement

FTY-720, bloquant les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes, a permis d'évaluer l'importance de la réponse immunitaire ganglionnaire.

Résultats :

L'anti-CD4 a amélioré l'efficacité de l'anti-PD-1 dans plusieurs modèles de cancers murins : du côlon (MC38 et CT26), de la peau (B16F10) et du sein (4T1). La déplétion des LTCD4 a déclenché une activation des LTCD8 au niveau du ganglion avec une augmentation de l'expression des cytokines et du marqueur d'activation PD-1. En parallèle, une réponse CD8 spécifique à la tumeur MC38 a été mise en évidence aussi bien dans le ganglion drainant que dans la tumeur elle-même. L'importance de la réponse immunitaire ganglionnaire a été confirmée dans un suivi de croissance tumorale où le traitement FTY-720 a induit une perte d'efficacité de la bithérapie. L'analyse du microenvironnement tumoral a montré que l'anti-CD4 favorise l'infiltration des LTCD8 dans la tumeur via l'axe CXCL9/CXCR3, conduisant à une augmentation de l'expression de plusieurs cytokines anti-tumorales (Il2, Ifng, Tnfa, Gzms). Le traitement semble aussi remodeler le programme d'épuisement des LTCD8, réduisant la proportion des LTCD8 épuisés terminaux au profit des progéniteurs, davantage réceptifs aux traitements anti-PD-1.

Conclusion :

Cette étude démontre le rôle délétère des LTCD4 dans la mise en place d'une réponse immunitaire efficace et spécifique des LTCD8 dans le ganglion et la tumeur. Cette réponse provenant du ganglion, essentielle à l'effet thérapeutique, conduit à une infiltration accrue en LTCD8 et à une composition lymphocytaire présentant majoritairement un profil d'épuisement favorable à l'efficacité des thérapies anti-PD-1. Potentialiser l'activité anti-tumorale des LTCD8 en optimisant leur recrutement et activation représente un énorme intérêt clinique en immunothérapie du cancer. Ainsi, notre projet permet de lever un des points de résistance aux anti-PD1 dans les cancers murins qui pourrait être généralisé à l'homme par la suite.

Mots clés :

Immunothérapie, Anti-PD1, Épuisement lymphocytaire, Lymphocytes TCD4, Lymphocytes TCD8.



ABSTRACTS

SESSION 2

**RADIOTHÉRAPIE EXTERNE
ET TRAITEMENTS COMBINÉS**

Étude de la radiothérapie et de son fractionnement sur les cellules Natural Killer et évaluation de l'efficacité d'une combinaison radiothérapie, anti-PD-L1 et anti-NKG2A

Auteurs : Jérémy Baude^{*1,2}, Riad Ladjohounlou¹, Lisa Froidurot¹, Véronique Morgand¹, Emeric Limagne³ et Céline Mirjolet¹

1. Département de radiobiologie et radiothérapie préclinique (X-RAIN team), INSERM 1231, CGFL, Dijon, France
2. Département d'oncologie-radiothérapie, CGFL, Dijon, France
3. Plateforme de transfert en biologie cancérologique (PTBC), INSERM 1231, CGFL, Dijon, France

Introduction :

L'efficacité de la radiothérapie (RT) peut être améliorée en l'associant avec des traitements restaurant l'activité des lymphocytes T CD8+, tels que les inhibiteurs de programmed cell death protein ligand 1 (PD-L1). Récemment, Natural Killer (NK) group 2A (NKG2A), un récepteur inhibiteur principalement présent à la surface des cellules NK, est apparu comme une autre cible thérapeutique prometteuse pour stimuler l'activité antitumorale de ces cellules. Toutefois, l'impact de la RT sur les cellules NK reste flou. Notre but était de caractériser les effets de la RT et de son fractionnement sur les cellules NK au sein de la tumeur, mais aussi d'évaluer l'efficacité d'une combinaison RT + anti-NKG2A ± anti-PD-L1.

Méthodes :

Nous avons étudié in vivo l'influence de la RT normofractionnée (RTN, 2 Gy par fraction) et hypofractionnée (RTH, _ Gy par fraction) sur les cellules NK au sein de tumeurs colorectales murines (CT26) par cytométrie en flux. Nous avons évalué dans un second temps l'efficacité de la combinaison RTN ou RTH + anti-NKG2A ± anti-PD-L1 chez des souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26.

Résultats :

La RT augmentait transitoirement la proportion de cellules NK dans la tumeur et modulait leur activité, leur statut d'activation et leur maturité en fonction du fractionnement. La proportion de cellules NK NKG2A+ était augmentée de façon transitoire après la RT, principalement avec la RTN. Par ailleurs, seule la combinaison RTN + anti-NKG2A + anti-PD-L1 a permis de retarder la croissance tumorale et d'améliorer la survie des BALB/c.

Conclusion :

La RT module quantitativement et qualitativement les cellules NK intratumorales et en particulier l'expression de NKG2A à leur surface de manière dépendante du fractionnement. De plus, l'effet synergique de la triple combinaison avec la RTN pourrait justifier l'évaluation de cette combinaison en clinique.

Mots clés : Natural Killer ; NKG2A ; Fractionnement ; Immunothérapie

Irradiation par photons ou protons : quel impact sur la réponse immunitaire radio-induite ?

Auteurs : Hélène Burckel^{1,2}, Anaïs Nicol^{1,2}, Carole Mura^{1,2}, Lisa Froidurot³, Véronique Morgand³, Pierre-Antoine Laurent³, Emeric Limagne^{4,5}, Romain Boidot⁵, Marc Rousseau⁷, Georges Noël^{1,2,8}, Céline Mirjolet^{3,4}

1. Équipe de Radiobiologie, ICANS, Strasbourg ;
2. Équipe Imagerie Multimodale Intégrative en Santé, ICube, UMR7357 ;
3. Unité X-RAIN de recherche en Radiothérapie combinée aux Immunothérapies et Nanoparticules, Plateforme, IMATHERA, Département de Radiothérapie, CGFL, Dijon ;
4. Équipe Tirecs, CTM INSERM1231, Dijon ;
5. PTBC, CGFL, Dijon ;
6. Département de Biologie moléculaire, CGFL, Dijon ;
7. CNRS, IPHC, UMR 7178, Strasbourg University, Strasbourg, France
8. Département de Radiothérapie, ICANS, Strasbourg.1xx

Introduction :

Les radiations ionisantes (RI), au-delà de leur effet cytotoxique, modulent la réponse immunitaire antitumorale, pouvant induire des effets immunoactivateurs et/ou immunosuppresseurs selon le type de tumeur et la modalité de radiothérapie. Certains mécanismes d'immunosuppression peuvent être inhibés par les immunothérapies (IT), rendant l'association des RI et des IT prometteuse, comme démontré dans des études précliniques avec des photons (RT) et en cours d'évaluation dans des essais cliniques.

En Parallèle, les protons (PT) présentent des avantages radiobiologiques et balistiques, mais leur impact sur la réponse immunitaire reste insuffisamment documenté malgré des essais cliniques en cours sur les combinaisons PT/IT.

Pour approfondir les mécanismes immunologiques induits par les PT et optimiser leurs combinaisons avec l'IT, nous avons étudié in vivo le microenvironnement tumoral (MET) et l'activation de voies moléculaires après irradiation par RT ou PT. L'efficacité des combinaisons des RI avec un anti-PD-L1 a également été évaluée.

Méthodes :

Des souris Balb/c portant des tumeurs du côlon CT26 ont été irradiées avec 3 x 8Gy par RT ou PT. Des analyses transcriptomiques (RNAseq) ont été réalisées 2 et 7 jours après RI, et la réponse immunitaire a été évaluée par cytométrie en flux 7 jours après RI pour caractériser les cellules lymphoïdes, myéloïdes, et l'expression de PD-L1. L'efficacité thérapeutique a été mesurée par le suivi de la croissance tumorale après combinaison avec un anti-PD-L1.

Résultats :

L'analyse d'enrichissement a révélé une activation des voies de l'interféron α , β et γ pour les deux modalités de RI. L'étude du MET a mis en évidence un réchauffement tumoral après RI, avec une infiltration des LTCD8⁺ avec les deux types d'IR. L'infiltration par les cellules NK et TAM1 était spécifique aux RT, tandis que les PT induisaient une infiltration par les MDSC et les neutrophiles. Les Treg étaient présents après RI, et l'expression significative de PD-L1 était spécifique aux RT. Enfin, la combinaison d'un anti-PD-L1 avec le fractionnement de 3x8Gy délivré par RI a permis un retard de croissance tumorale par rapport aux RI seules.

Conclusion :

Nos travaux démontrent que la réponse immunitaire induite par un fractionnement de 3 x 8Gy de RT et PT diffère, avec une réponse immunosuppressive plus marquée après PT. Comme pour l'irradiation par RT, les combinaisons de PT et d'IT nécessiteront une optimisation pour une efficacité accrue.

Mots clés : photon, proton, réponse immunitaire, immunothérapie

Rôle de DDB2 dans la résistance à la radiothérapie des cellules de PDAC

Auteurs. Julie Dardare^{1,2}, Andréa Witz^{1,2}, Margaux Betz^{1,2}, Aurélie François^{1,2}, Laureline Lamy^{1,2}, Marie Husson², Jessica Demange², Marie Rouyer², Jean-Louis Merlin^{1,2}, Pauline Gilson^{1,2} and Alexandre Harlé^{1,2}

1. Université de Lorraine, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7039 Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy, France
2. Service de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction :

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), qui représente 90 % des cas de cancer du pancréas, est l'un des cancers les plus mortels avec un taux de survie relative à 5 ans d'environ 12 %. Les options thérapeutiques se limitent principalement à la chirurgie dans les stades précoces de la maladie ou à la chimiothérapie dans les stades avancés. Seul un sous-groupe de patients présentant des anomalies germinales des gènes BRCA1/2 peut potentiellement bénéficier d'une thérapie personnalisée, l'olaparib, un inhibiteur de PARP. Bien que le rôle de la radiothérapie dans le PDAC reste controversé, l'utilisation d'agents radiosensibilisants permet d'espérer une amélioration de sa prise en charge. Nous avons montré précédemment que la protéine DDB2 (Damage specific DNA Binding protein 2) était un biomarqueur pronostique et prédictif potentiel de la réponse à la chimiothérapie dans le PDAC. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine DDB2 dans la réponse à la radiothérapie, avec et sans radiosensibilisation par l'olaparib dans des lignées cellulaires de PDAC.

Méthodes :

Les lignées cellulaires de PDAC T3M4 et Capan-2 ont été utilisées pour cette étude. Le niveau d'expression de DDB2 a été sous-exprimé dans les cellules T3M4 (T3M4 DDB2-low) et sur-exprimé dans les cellules Capan-2 (Capan-2 DDB2-high). Les cellules ont été irradiées à des doses uniques de 2 Gy ou 8 Gy avec ou sans pré-traitement par olaparib. La survie cellulaire après radiothérapie a été évaluée par essais clonogéniques et la mort cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux avec un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP). L'induction des cassures double-brins a été analysée par marquage immunofluorescent des foci γ H2AX. Le cycle cellulaire des cellules après irradiation a été analysé par cytométrie en flux avec un marquage à l'IP. L'expression des effecteurs de la réparation de l'ADN (ATM, ATR, Chk1, Chk2 et PARP1) a été analysée par RT-qPCR et par Western Blot.

Résultats :

DDB2 favorise la radiorésistance en promouvant la réparation des cassures double-brin de l'ADN induites par les radiations ionisantes et en améliorant la survie cellulaire. De plus, l'expression de DDB2 renforce l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 grâce à une augmentation de la phosphorylation des points de contrôle du cycle cellulaire Chk1 et Chk2. Enfin, nous avons identifié un nouveau lien entre DDB2 et PARP1 dans le contexte de la radiothérapie, permettant de renforcer l'expression et l'activité de PARP1.

Conclusion :

Collectivement, ces résultats mettent en avant une utilisation de DDB2 en tant que biomarqueur potentiel pour prédire la résistance à la radiothérapie. Cette utilisation de DDB2 représenterait une avancée significative dans la radiothérapie de précision en élargissant le champ des patients qui peuvent bénéficier de l'olaparib en tant qu'agent radiosensibilisant.

Mots clés : Cancer du pancréas, DDB2, Radiothérapie, Olaparib

Exploring the expression and secretion of galectin-9 isoforms in triple-negative breast cancer cells following radiotherapy and chemotherapy

Auteurs : Nour Kotaich ¹, Manon De Boni ², Lucille Cartier ², Yacine Merrouche ^{1,2}, Stéphane Vignot ^{1,2}, Stéphane Potteaux ^{1,2},

1. Université de Reims Champagne Ardenne, IRMAIC UR 7509, Reims, France
2. Département de Recherche, Institut Godinot, Reims, France
3. Inserm, Délégation régionale paris Île-de-France Centre Nord, Paris, France

Introduction :

Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive subtypes of breast cancer, characterized by the absence of well-defined molecular markers. Our previous work revealed elevated levels of galectin-9 (Gal-9), an immune checkpoint molecule, in tumor resections from TNBC patients who did not respond to neoadjuvant radiotherapy. The LGALS9 gene, which encodes Gal-9, undergoes complex splicing to produce several isoforms, but their specific roles, particularly in cancer, remain poorly understood. This study aims to explore the expression patterns of Gal-9 isoforms in breast cancer cell lines following chemotherapy and radiotherapy treatments.

Méthodes :

We conducted experiments on three breast cancer cell lines: MDA-MB-231 (TNBC), MCF-7 (luminal), and MDA-MB-436 (TNBC). Cells were treated with 10 Gy radiotherapy or paclitaxel chemotherapy. Quantitative RT-PCR was first used to quantify the overall mRNA expression of Gal-9, followed by an analysis of various Gal-9 isoforms, including the full-length form and six truncated isoforms. Western blotting was then performed on MDA-MB-231 cell lysates and supernatants to assess the protein expression and secretion patterns of Gal-9 isoforms post-treatment. Due to the lack of antibodies specifically targeting individual isoforms, we used Western blot to differentiate isoforms based on molecular weight.

Résultats :

Our results demonstrated that radiotherapy induced a stronger Gal-9 response in the TNBC cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-436, with significantly higher expression compared to chemotherapy. In contrast, the luminal cell line MCF-7 exhibited higher Gal-9 expression following chemotherapy compared to radiotherapy. Furthermore, distinct variations in the distribution of Gal-9 isoforms were observed between the different cell lines. The full-length and medium-length isoforms showed higher expression levels following radiotherapy, particularly in TNBC lines, while isoforms truncated at the C-terminal domain displayed even higher expression under chemotherapy, especially in MCF-7 cells. Western blot analysis confirmed the presence of at least three distinct Gal-9 isoforms (≈35 kDa, ≈25 kDa, and ≈15 kDa) in MDA-MB-231 cell lysates, with overexpression especially following radiotherapy. Importantly, some isoforms were also actively secreted into the extracellular environment.

Conclusion :

These findings suggest that different Gal-9 isoforms may play distinct roles in the response to cancer treatments and highlight their potential as biomarkers or therapeutic targets. Ongoing research aims to elucidate the mechanisms behind the secretion of these isoforms and their specific roles in the tumor microenvironment, with the goal of improving therapeutic strategies for TNBC and other aggressive breast cancer subtypes.

Mots clés : TNBC – Tumor microenvironment – Radiotherapy – Galectin-9 – Galectin-9 isoforms

Therapeutic interest of an iron-based complex to improve treatments against pancreatic and triple negative breast cancers.

Auteurs : C. Neybecker ¹, V. Besançon ¹, E. Brunner ¹, R. Rouget ¹, G. Harlé ¹, A. Monari ², M. Bouche ³, P. Gros ³, N. Touche ¹, and S. Grandemange ¹

1. Université de Lorraine – Nancy and CNRS, CRAN UMR 7039, Nancy, France
2. Université de Paris and CNRS, ITODYS, Paris, France
3. Université de Lorraine – Nancy and CNRS, L2CM UMR 7053, Nancy, France,

Introduction

With 9,7 million people dying worldwide in 2022, cancer represents one of the leading causes of death, despite a better understanding of carcinogenesis and improved therapeutic strategies. In this context, our research field is focused in triple-negative breast cancers (TNBC) and pancreatic cancers, both of which are particularly aggressive and lack therapeutic solutions. Our current work is focused on highlighting the antitumor activity of new Iron-based complexes via their ability to bind DNA. Based on our preliminary data one complex called AIM3 has been selected.

Material and methods

Antitumour effects were evaluated on non-cancerous cell lines MCF10A (Breast epithelial cells) and several cancerous models of which three cancerous cell lines MDA-MB-231 (TNBC cell line) T3M4 and BXP-3 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell lines (PDAC lines). Proliferation and cytotoxic assay were performed. Moreover the coupling of AIM3 with common chemotherapeutic drugs used in the treatment of PDAC and TNBC (Gemcitabine® and Doxorubicine® respectively) were analyzed. Then, transcriptomic analyses were achieved to elucidate the action mechanism of these compounds.

Results and discussion

Our results indicate that iron-based complexes, and particularly AIM3 compound, have a strong antiproliferative effect on all cell lines tested. Interestingly, the treatment leads more or less quickly to an induction of apoptosis mainly in cancerous cells. Moreover, the antiproliferative effect observed was only reversible (when the treatment is removed after 72 h and replaced by normal medium) in the non-cancerous cells. The combined treatments realized in MDA-MB-231 and T3M4 cell lines demonstrate the therapeutic interest of AIM3 in combination with doxorubicin and gemcitabine respectively.

AIM3 effects are also observed in gemcitabine resistant T3M4 cells. Our molecular investigations highlighted the modulation of the transcript level of HIF1 related genes and genes involved in iron homeostasis regulation (NDRG1 and FERRITINE). To verify the involvement of these genes, we demonstrate that an addition of FeSO₄ can reverse the observed AIM3 effects. To characterize the antiproliferative effect of AIM3, we carried out cell cycle studies which showed that AIM3 induced accumulation of cancerous cells in G₀-G₁ and S phases which was not observed in non-cancerous cells.

Conclusion

Our results indicate that AIM3 could be a new antiproliferative option for aggressive cancers, but these effects have to be monitored in vivo. This antitumoral effect observed can be related to iron homeostasis as well as hypoxia regulation, a signaling that has to be clarified to clearly position AIM3 as a new therapeutic agent.

Key words: Breast; Pancreatic; Cancer; Iron-Based Compound; Therapeutic solution

Radiothérapie stéréotaxique des cancers de prostate localisés. Accélérateurs linéaires couplés à une IRM versus accélérateurs linéaires conventionnels toxicités et contrôle biochimique à 2 ans

Auteurs : Dr Manou RAKOTOSAMIMANANA ¹, Dr Magali QUIVRIN ¹, Dr Etienne MARTIN ¹, Pr Gilles CRÉHANGE ², Julien BOUDET ³

1. Centre Georges François Leclerc Dijon, département de Radiothérapie
2. Institut Curie Paris, département de radiothérapie et de physique médicale
3. Centre Georges François Leclerc Dijon, département de physique médicale

Introduction :

La radiothérapie stéréotaxique est actuellement une option thérapeutique validée dans la prise en charge des cancers de prostate localisés. La principale technique est celle utilisant un accélérateur linéaire avec un repérage scanographique à raison de 36,25 Gy en 5 fractions. L'arrivée des accélérateurs linéaires couplés à une IRM offre une précision dans la planification et la délivrance du traitement ouvrant la possibilité de schémas avec escalade de dose.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la contribution de la radiothérapie guidée par IRM et l'impact de l'escalade de dose dans la radiothérapie stéréotaxique des cancers de prostate localisés en termes de toxicité et de réponse biochimique sur les premiers dosages de PSA.

Méthodes :

Cette étude rétrospective a inclus 167 patients traités pour un adénocarcinome prostatique localisé dans 2 centres académiques : le Centre Georges-François Leclerc (Dijon) et l'Institut Curie (Paris, Orsay, Saint-Cloud). La catégorie A consistait en une comparaison entre un traitement sur accélérateurs linéaires classiques (n=99) et sur IRM-Linac (n= 30) à la dose de 36,25 Gy en 5 fractions (BED= 167 Gy, $\alpha/\beta = 2$). La catégorie B comparait un schéma avec escalade de dose à 38 Gy en 4 fractions correspondant à une **dose équivalente biologique de 218 Gy** ($\alpha/\beta = 2$) (n=38) avec un schéma à 36,25 Gy en 5 fractions (n=30) sur IRM-Linac.

Résultats :

Avec un suivi médian de 20 mois, aucune toxicité aiguë de grade 3 n'a été rapportée. A une dose de 36,25 Gy en 5 fractions, les taux de toxicités urinaire et gastro-intestinale aiguës de grade ≥ 2 étaient de 30% et 7% dans le groupe traité sur accélérateurs conventionnels contre 23% et 3% dans le groupe traité sur IRM-Linac.

Aucune différence significative n'a été montrée en termes de taux de toxicité aiguë de grade ≥ 2 entre ces 2 groupes ($p= 0,46$ et $0,68$) avec une tendance à une meilleure tolérance dans le groupe traité par IRM-Linac. Seul un patient traité à 38 Gy en 4 fractions avec un boost sur la tumeur a développé une toxicité urinaire tardive de grade 3. Aucun patient traité sur IRM-Linac n'a présenté de toxicité digestive tardive de grade ≥ 2 contre 8% dans le groupe traité par accélérateurs conventionnels. Les facteurs prédictifs de toxicité génito-urinaire aiguë de grade ≥ 2 étaient une hormonothérapie concomitante (OR= 2,1- $p= 0,04$) et un V44Gy >0 (OR= 2,3- $p= 0,05$). Les taux de PSA à 24 mois n'étaient pas significativement différents entre les différents schémas de traitement.

Conclusion :

Au total, les taux toxicités de la radiothérapie stéréotaxique n'étaient pas significativement différents entre un traitement sur IRM-Linac et sur accélérateur classique à une dose de 36,25 Gy en 5 fractions avec une tendance à une meilleure tolérance sur IRM-Linac. L'utilisation d'une hormonothérapie et un V44Gy > 0 à l'urètre multiplient par deux le risque de développer une toxicité urinaire aiguë de grade ≥ 2 .

Mots clés : adénocarcinome, prostate, radiothérapie

Chemoradiation-induced immune system peripheral changes in patients with non-small cell lung cancer

Auteurs : Yaoyao Xie ^{1,2}, Babacar Ndao ¹, Benoît Lecoester ¹, Marine Malfroy ¹, Etienne Martin ³, Xushan Sun ⁴, Caroline Laheurte ¹, Jad Abi Kheir ¹, Junming Guo ², Olivier Adotevi ¹, Jihane Boustani ^{1,5}

1. Université de Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, F-25000 Besançon, France
2. Department of Biochemistry and Molecular Biology and Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Health Science Center, Ningbo University, Ningbo 315211, China
3. Department of Radiation Oncology, Unicancer-Georges-Francois Leclerc Cancer Center, F-21000 Dijon, France
4. Department of Radiation Oncology, Nord Franche-Comté Hospital, F-25200 Montbéliard, France
5. Department of Radiation Oncology, University Hospital of Besançon, F-25000 Besançon, France

Introduction :

Concurrent chemoradiation (CRT) represents a standard curative treatment for several locally advanced cancers including non-small cell lung cancer (NSCLC) based on its synergistic cytotoxic effects. CRT followed by durvalumab (anti-PD-L1 antibody) therapy has become standard maintenance therapy for locally advanced NSCLC. However, this combination is still ineffective in most patients, illustrating the need to better understand the immunological effects driven by CRT, which are less known. This study aims at investigating the CRT-induced tumor reactive T cell responses as well as transcriptomic changes.

Methods:

Blood samples were collected from 43 NSCLC patients at baseline, during CRT, and three months after CRT. For patients receiving durvalumab after CRT, additional samples were taken at three months and one year post-durvalumab. Multiparametric immunologic analyses were conducted using IFN- γ ELISpot, RNA-Seq, and qRT-PCR.

Results:

A transient decrease in specific T-cell responses against TERT and NY-ESO-1 was observed during CRT in 26.8% and 28.6% patients, followed by an increase after CRT in 60.0% and 40.0% patients, respectively. There was no significant change in antiviral T-cell responses before and during CRT. T-cell transcriptomic analysis revealed that 105 and 422 genes were up-regulated during and after CRT compared to baseline, respectively, and 81 and 60 genes were down-regulated at these same time points. Genes downregulated during CRT but up-regulated after were enriched in immune response and cytokine-cytokine receptor interactions. Analysis of immune-related genes showed that T-cell activation, cytolytic, and exhaustion markers were downregulated during CRT but upregulated afterward. CRT also induced a significant increase in regulatory T cells in 77% patients after CRT. RNA-Seq findings were corroborated by qRT-PCR, which also identified significant relationships between CD8a expression and cytotoxic genes (PRF1, NKG7) as well as activation markers (ICOS, CD39, CD40L). TCR-Seq analysis demonstrated that CRT induced changes in specificity and diversity of the T-cell repertoire, with reduced clonotype sharing between patients and an expansion of T-cell clones after CRT, some of which were not detectable before CRT.

Conclusions:

These findings indicate that the systemic immunological changes induced by CRT in NSCLC patients might support the rationale to use checkpoint inhibitors as adjuvant therapy post CRT.

Key words: Chemoradiation, non-small cell lung cancer, systemic antitumor T cell responses, transcriptomic analysis



ABSTRACTS

SESSION 4

**RADIOTHÉRAPIE INTERNE
VECTORISÉE ET DÉVELOPPEMENT
DE NOUVEAUX TRACEURS
EN MÉDECINE NUCLÉAIRE**

Targeted radionuclide therapy against GARP expressing T regulatory cells after tumour priming with external beam radiotherapy in a murine syngeneic model

Auteurs : Pierre-Simon Bellaye ¹, Alexandre MM Dias ¹, Jean-Marc Vrigneaud ¹, Mathieu Moreau ², Camille Petitot ¹, Alexanne Bouchard ^{1,3}, Claire Bernhard ², Michael Claron ², Lisa Froidurot ¹, Véronique Morgand ¹, Mélanie Guillemain ¹, Marie Monterrat ¹, Céline Mirjolet ¹, Carmen Garrido ³, Evelyne Kohli ^{3,4} and Bertrand Collin ^{1,2}.

1. Centre George-François Leclerc, Service de Médecine Nucléaire, IMATHERA UMS INSERM BioSanD US58, 21079 Dijon, France
2. Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR CNRS/uB 6302, 21079 Dijon, France
3. UMR INSERM/uB/AGROSUP 1231, Labex LipSTIC, Faculty of Health Sciences, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21079 Dijon, France
4. University Hospital Centre François Mitterrand, 21000 Dijon, France

Introduction :

Radiation therapy (RT) exerts its anti-tumour efficacy by inducing direct damage to cancer cells but also through modification of the tumour microenvironment (TME) by inducing immunogenic antitumor response. Conversely, RT also promotes an immunosuppressive TME notably through the recruitment of regulatory T cells (Tregs). Glycoprotein-A repetitions predominant (GARP), a transmembrane protein highly expressed by Tregs, plays a key role in the activation of TGF- β and thus promotes the immunosuppressive action of Tregs. The development of a theranostic approach targeting GARP combining imaging and targeted radionuclide therapy (TRT) was carried out.

Méthodes :

We demonstrate in a preclinical model of 4T1 triple negative breast tumour-bearing BALB/c mice that GARP expression is increased after external beam radiation in the TME of our cancer model. We generated a theranostic probe through the bioconjugation of the chelating agent DOTAGA onto an anti-GARP monoclonal antibody. The bioconjugation with DOTAGA allows the radiolabelling of the DOTAGA-GARP conjugate with both Indium-111 for SPECT imaging and Lutetium-177 for TRT purposes.

Résultats :

We demonstrate that GARP expression is increased following RT in vivo and can be specifically detected and quantified using in vivo SPECT imaging with ¹¹¹In-DOTAGA-GARP. In addition, ¹⁷⁷Lu-DOTAGA-GARP limits tumour growth in our cancer model.

Conclusion :

This theranostic strategy may allow for the personalization of cancer treatments by early detection of Tregs infiltration following RT and identification of patients likely to respond to Tregs-targeted therapy via TRT.

Mots clés : GARP, targeted radionuclide therapy, T regulatory cells, external beam radiotherapy, SPECT imaging

Évaluation de la Tomographie par Emission de Positron (TEP) au 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) et à la 18F-Fluorocholine (FCH) comme marqueur prédictif précoce de la survie globale chez les patients suivis pour un carcinome hépatocellulaire avancé traité par Sorafenib : une étude prospective et multicentrique

Auteurs : Victor Besson ¹, Alexandre Cochet ^{1,2}, Anais Fouquier ³, Claire Tabouret-Viaud ¹, Jean-Pierre Bronowicki ⁴, Elodie Chevalier ⁵, Alexandra Heurgue ⁶, Dimitri Papathanassiou ⁷, Jean-Frédéric Blanc ⁸, Jean-Baptiste Pinaquy ⁹, Julie Vincent ¹⁰, Xavier Palard ¹¹, Héroïse Bourien ¹², Aurélie Bertaut ³, Sylvain Manfredi ¹³

1. Department of Nuclear Medicine, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. ICMUB, UMR CNRS 6302, University of Burgundy, Dijon, France
3. Department of Statistics, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
4. Department of Gastro-Enterology and Hepatology, University Hospital of Nancy, France
5. Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Nancy, France
6. Department of Hepato-Gastro-Enterology, University Hospital of Reims, France
7. Department of Nuclear Medicine, Institut Jean Godinot, Reims, France
8. Department of Hepato-Gastro-Enterology, University Hospital of Bordeaux, France
9. Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Bordeaux, France
10. Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
11. Department of Nuclear Medicine, Centre Eugene-Marquis, Rennes, France
12. Department of Medical Oncology, Centre Eugene-Marquis, Rennes, France
13. Department of Hepato-Gastro-Enterology, Dijon, France

Introduction : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de mortalité liée au cancer et est le plus souvent diagnostiqué à un stade avancé. Le sorafenib reste l'un des traitements recommandés pour le CHC avancé ; cependant, son efficacité reste inconstante et l'incidence des effets indésirables liés au traitement est élevée. Le développement de biomarqueurs permettant de déterminer précocement l'efficacité du traitement, en termes de gain de survie, est donc un enjeu majeur, en particulier dans un contexte de développement d'alternatives thérapeutiques potentielles.

Méthodes : Les patients atteints de CHC avancé et éligibles à un traitement par Sorafenib ont été recrutés dans le cadre de l'essai multicentrique prospectif ouvert et non randomisé PREMETH (NCT02847468 ; 6 centres de recrutement). Les patients ont réalisé des TEP au 18F-FDG et à la 18F-FCH avant le début du traitement et un mois après, afin d'évaluer le métabolisme tumoral initial et résiduel. Les paramètres suivants ont été extraits de chaque examen : SUVmax, SUVmoy et SUVratio, ainsi que des paramètres volumétriques de la charge tumorale intra-hépatique : Volume tumoral métabolique (MTV), Glycolyse totale de la lésion (TLG) pour la 18F-FDG-TEP, Activité totale de la choline kinase de la lésion (TLCK) pour la 18F-FCH-TEP. La réponse métabolique tumorale (Δ SUVmax, Δ SUVmoy, Δ SUVratio, Δ TNR, Δ MTV, Δ TLG et Δ TLCK) a également été calculée. Les patients ont été suivis pendant un an après le début du traitement. Des régressions logistiques avec des courbes ROC ont été utilisées pour déterminer les paramètres associés au statut de survie à un an. Les seuils optimaux pour les paramètres quantitatifs ont été déterminés à l'aide de la méthode de l'indice de Youden. Des analyses univariées et bivariées de Cox ont été réalisées pour déterminer les facteurs prédictifs de décès.

Résultats : Cinquante patients (âge moyen 70 $\pm$ 7 ans) ont été inclus. Tous les patients ont reçu un traitement au Sorafenib pendant au moins un mois. Le suivi médian était de 12 mois. Vingt-deux patients sont décédés au cours du suivi. En analyse univariée, seuls les paramètres reflétant un métabolisme glucidique élevé sur la 18F-FDG-TEP initiale étaient significativement associés au décès à un an : TNR>1,5 (Hazard Ratio [HR]:7,2, Intervalle de Confiance à 95% [95%CI]:2,1-24,7, p=0,002), MTV>18 mL (HR:11,2, 95%CI:3,6-38,4, p<0,001 ; sensibilité=86%, spécificité=78%), TLG>53g (HR:10,7, 95%CI:2,5-46,3, p=0,002) et présence de lésions extra-hépatiques (HR:2,5, 95%CI:1,1-6,1, p=0,04). En revanche, ni les paramètres de la 18F-FDG-TEP de suivi, ni les paramètres des 18F-FCH-TEP (initiale ou de suivi), ni les données cliniques et biologiques n'avaient de signification pronostique. Après ajustement sur l'âge, le MTV>18 mL sur la 18F-FDG-TEP initiale restait un facteur prédictif indépendant de décès (HR:9,6, 95%CI:2,7-33,8, p<0,001).

Conclusion : L'activité métabolique tumorale avant traitement évaluée par 18F-FDG-TEP est un facteur pronostique indépendant chez les patients atteints d'un CHC avancé recevant une monothérapie par sorafenib. En revanche aucun paramètre métabolique évalué sur la 18F-FCH-TEP avant traitement ou lors des examens de suivi (18F-FDG-TEP et 18F-FCH-TEP) ne s'avère être prédictif de la survie.

Mots clés : CARCINOME HEPATOCELLULAIRE, TEP-TDM AU 18F-FLUORODEOXYGLUCOSE, TEP-TDM A LA 18F-FLUOROCHOLINE, SORAFENIB, MARQUEURS PRONOSTIQUES



Développement d'agents chélatants bifonctionnels pour les radiométaux émetteurs alpha

Auteurs : Maxime Cheveau ^{1,2}, Mathieu Moreau ¹, Bertrand Collin ^{1,3}, Alexandre Cochet ^{1,3}, Frédéric Boschetti ², Sophie Poty ¹, Franck Denat ¹

1. Université de Bourgogne, ICMUB UMR CNRS 6302, Dijon, 21000, France
2. Chematech, Dijon, 21000, France
3. Centre Régional De Lutte Contre Le Cancer Georges-François Leclerc, service de médecine nucléaire – IMATHERA UMS INSERM BioSanD 58, Dijon, 21000, France

Introduction :

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) alpha (α) fait l'objet d'un intérêt croissant, lié aux résultats extrêmement prometteurs rapportés lors de traitements compassionnels à l'aide de radiopharmaceutiques à base d'actinium-225 (²²⁵Ac), réalisés chez des patients atteints de cancer métastatique de la prostate ou de tumeurs neuroendocrines, ne répondant pas aux traitements avec les analogues radiomarqués au lutetium-177 (¹⁷⁷Lu) (Pluvicto®, Lutathera®). Un des verrous au développement de la RIV- α est la difficulté de disposer d'agents chélatants permettant de coordonner efficacement le radiométal. En effet, la plupart des radionucléides émetteurs α n'existent pas sous forme d'isotope stable et leur chimie de coordination est encore méconnue. Pour la coordination de l'²²⁵Ac, les agents chélatants, DOTA et Macropa, sont les plus utilisés malgré des propriétés de coordination sous-optimales. La coordination du radium-223 (²²³Ra), utilisé en médecine nucléaire sous forme de chlorure (Xofigo®), est un défi encore plus ambitieux puisqu'il n'existe pas d'agent chélatant stable in vivo pour ce radionucléide. Sur la base de notre expertise en design d'agents chélatants, nous avons évalué un large panel pour la coordination de l'²²⁵Ac et du ²²³Ra.

Méthodes :

Une série d'agents chélatants à base de molécules cycliques polyaminocarboxyliques ou d'éthers couronnes, comportant des groupes coordinants tels que des pyridines, a été synthétisée. Des radiomarquages et des études de stabilité de ses agents chélatants modèles avec l'²²⁵Ac ont permis d'identifier les plus prometteurs. Sur la base de ces premiers tests, nous avons préparé des analogues bifonctionnels, porteurs d'une fonction permettant leur conjugaison à un vecteur biologique. Des dérivés d'inhibiteurs de la PSMA et des bioconjugués du panitumumab (anticorps anti-EGFR) et du daratumumab (anticorps anti-CD38) ont par la suite été obtenus. Les radiomarquages des agents chélatants bifonctionnels et des bioconjugués ont été optimisés avec l'²²⁵Ac. La stabilité des radiocomplexes a été évaluée dans le PBS et le serum. Des tests de radiomarquages avec du ²²³Ra ont également été réalisés.

Résultats :

Les agents chélatant modèles, PYTA et H4Crown, montrent d'excellentes propriétés de radiomarquage à l'²²⁵Ac avec des activités molaires > 300 MBq/ μ mol comparables au Macropa et largement supérieures au DOTA. Les agents bifonctionnels présentent des propriétés comparables. Des dérivés PSMA à une activité molaire de 130 MBq/ μ mol et des dérivés Panitumumab/Daratumumab à une activité spécifique de 1 MBq/mg, compatibles avec des applications in vivo préclinique de RIV- α , ont été préparés. Les études de stabilités in vitro de ces conjugués soulignent la supériorité du PYTA et du Macropa. Le PYTA et H4Crown montrent des propriétés de coordination intéressantes pour le ²²³Ra, avec des activités spécifiques ~ 48 MBq/ μ mol.

Conclusion : Des agents chélatants bifonctionnels pour la coordination de l'²²⁵Ac et du ²²³Ra ont été synthétisés, conjugués à des inhibiteurs de la PSMA et à deux anticorps, radiomarqués et évalués in vitro pour leur stabilité. Ces conjugués extrêmement prometteurs seront évalués in vivo très prochainement.

Mots clés : α -thérapie, RIV, chélateur, ²²⁵Ac, ²²³Ra

Cancers hématologiques surexprimant IL-1RAP : utilisation d'un anticorps radiomarqué pour une approche théranostique

Auteurs : J. Frenay^{1,2}, P-S. Bellaye¹, M. Moreau³, M. Claron³, L. Ringenbach⁴, C. Ferrand^{5,6}, F. Denat³, A. MM. Dias¹, B. Collin¹⁻³

1. Plateforme ImaThera, Centre Georges-François Leclerc, Dijon ; UMS 58 Inserm BioSanD.
2. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) – CNRS UMR 6303, Université de Bourgogne, Dijon ;
3. Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) – CNRS UMR 6302, Université de Bourgogne, Dijon ;
4. Diaclone, Besançon ;
5. EFS BFC – INSERM UMR 1098 RIGHT, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon ;
6. Advesya, Besançon.

Introduction :

Les hémopathies malignes sont des maladies hétérogènes dont le pronostic est très variable. De ce fait, la résistance aux thérapies actuellement disponibles est une caractéristique majeure des leucémies et lymphomes, et explique en grande partie l'échec de ces traitements. Ainsi, la découverte de thérapies innovantes en association avec de nouveaux biomarqueurs compagnons est cruciale pour promouvoir la médecine personnalisée et améliorer les résultats des traitements pour les patients. Nos travaux précliniques visent donc à développer une sonde dotée de capacités théranostiques, basée sur un anticorps monoclonal radiomarqué ciblant la protéine IL-1RAP, un biomarqueur surexprimé dans plusieurs tumeurs malignes, telles que la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et certains lymphomes.

Méthodes :

Les lignées cellulaires tumorales MonoMac-6 (MM6) et Karpas-299 ont été utilisées comme modèles sous-cutanées, respectivement de leucémie et de lymphome, surexprimant IL-1RAP+. Un total de 10x10⁶ de cellules MM6 ou Karpas-299 ont été implantées en sous-cutanée dans le flanc droit de souris NOD-SCID préalablement irradiées. Un anticorps anti-IL-1RAP a été bioconjugué avec du DTPA pour le radiomarquage à l'indium-111 ([¹¹¹In]In-DTPA-IL1RAP). Un test de binding in vitro a été réalisé pour s'assurer que la bioconjugaison n'impacte pas négativement l'affinité de l'anticorps pour sa cible. L'agent [¹¹¹In]In-DTPA-IL1RAP a été injecté en i.v. aux souris porteuses de tumeur MM6 ou Karpas-299 (10MBq par souris dans 100µL, n=6). Pour chaque étude, une expérience de déplacement a été réalisée (souris recevant l'anticorps anti-IL-1RAP froid en excès x100). Les souris ont subi une série d'imagerie SPECT/CT à 24h, 48h, 72h (et 144h pour le modèle MM6) post-injection, et un comptage gamma ex vivo a été effectué à la suite des dissections terminales.

Résultats :

Les imageries SPECT sur le modèle MM6 montrent une accumulation tumorale croissante optimale de l'agent [¹¹¹In]In-DTPA-IL1RAP à 144h post-injection (29,7 ± 1,6 %ID/g), face à une accumulation significativement plus basse au niveau des tumeurs du groupe déplacement, ayant reçu l'anticorps froid en excès (9,2 ± 1,0 %ID/g).

Concernant le modèle Karpas-299, les imageries SPECT montrent une accumulation tumorale croissante optimale de l'agent [¹¹¹In]In-DTPA-IL1RAP à 72h post-injection (41,0 ± 1,6 %ID/g). A nouveau, le groupe déplacement laisse apparaître une accumulation tumorale significativement plus basse (17,3 ± 0,8 %ID/g).

Ces résultats ont également été confirmés par le comptage gamma ex vivo des différents organes et tumeurs.

Conclusion :

Notre sonde d'imagerie ciblant la protéine IL-1RAP a démontré être un agent d'imagerie prometteur pour la détection des tumeurs surexprimant IL-1RAP. Dans le cadre du développement de thérapies innovantes ciblant IL-1RAP, comme la thérapie CAR-T cells actuellement en essai clinique, cette sonde d'imagerie pourrait se placer comme un compagnon de diagnostic efficace pour une meilleure sélection des patients. De plus, la capacité du DTPA à chélater d'autres radionucléides, notamment pour la TEP (e.g. cuivre-64) ou pour la radiothérapie interne vectorisée (e.g. lutétium-177), fait de cette sonde un potentiel excellent agent théranostique.

Mots clés : IL-1RAP ; Théranostique ; SPECT/CT ; Hémopathies malignes.

Évaluation de la performance du [18F]-FES en imagerie TEP dans la détection des mutations du récepteur des œstrogènes dans les cancers du sein ER+

Auteurs : Chloé Jean ^{1,3}, Alicia Chateau ⁴, Lucille Cartier ², Stéphane Potteaux ², Hélène Dumond ⁴, Yacine Merrouche ², Sophie Pinel ⁴, Emilie Roeder ⁵, Gilles Karcher ⁵, Fatiha Maskali ⁵, Nicole Boulard ^{1,6}, Nicolas Etique ¹, Dimitri Papathanassiou ³, Jérôme Devy ¹

1. MEDyC CNRS 7369, Reims, France
2. EA 7509 IRMAIC, Institut Godinot, Reims, France
3. EA 3804 CRESTIC, Reims, France
4. UMR 7039 CRAN, Nancy, France
5. Nancyclotep Plateforme d'imagerie moléculaire, Nancy, France
6. Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Faculté de médecine, Reims, France

Introduction :

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent dans le monde et le plus mortel chez les femmes en France (OMS 2020). Il peut être classé en sous-types moléculaires en fonction de l'expression de trois récepteurs : le récepteur du facteur de croissance épidermique de type 2 (HER2), le récepteur de la progestérone (PR) et le récepteur des œstrogènes (ER). 70 % des cas de cancer du sein expriment l'ER, et sont liés à un taux de survie à cinq ans de 94 %. Cependant, lorsque le cancer récidive, le taux de survie chute à 23 %, avec 36 % des cas montrant des mutations ESR1, principalement dans le domaine de liaison au ligand (LBD), induisant une résistance endocrinienne.

Méthodes :

Une méthode pour étudier ces mutations est la tomographie par émission de positons (TEP) utilisant le radiotracer 18fluoroestradiol ([18F]-FES), capable de se lier au LBD de l'ER. Cependant, sa capacité à se lier aux mutants de l'ER reste incertaine. Le but de cette étude est d'examiner l'affinité du [18F]-FES pour les mutants de l'ER afin de déterminer son potentiel pour un usage diagnostique et un suivi thérapeutique des patients. Pour cela, six clones exprimant les mutations les plus fréquemment observées chez les patients au stade métastatique ont été générés (Y537S/C/N, D538G, E380Q et L536H). Des études de caractérisation de l'inductibilité de ce modèle Tet-ON et de sa fonctionnalité ont été réalisées in vitro et in vivo. Enfin, la liaison du radiotracer [18F]-FES à l'ER de type sauvage exprimé par notre modèle a été étudiée.

Résultats :

Toutes les analyses in vitro ont confirmé l'inductibilité de notre modèle par la doxycycline (1000 ng/ml pendant 24h). L'inductibilité in vivo a également été validée par injection orthotopique chez des souris SCID. De plus, nous avons démontré que la protéine ER exprimée est pleinement fonctionnelle, et que les mutants Y537 sont constitutivement actifs, comme décrit dans la littérature (Albert Grinshpun et al. 2023). La micro TEP a confirmé la liaison du [18F]-FES à l'ER induit après injection orthotopique. L'étude de la valeur de fixation normalisée (SUV) du [18F]-FES sur les mutants de l'ER est actuellement en cours d'analyse par micro TEP. Des études d'affinité utilisant la thermophorèse micro-échelle pour évaluer l'interaction moléculaire des mutants de l'ER avec l'estradiol sont en cours.

Conclusion :

Toutes ces données devraient nous permettre de préciser la capacité de liaison du [18F]-FES aux différents récepteurs ER mutés conférant une résistance endocrinienne. Cela renforcerait l'intérêt de l'examen FES, en montrant non seulement si les cellules n'expriment plus l'ER, mais aussi si celles qui restent ER+ sont mutées et/ou si le traitement proposé favorise l'apparition de ces mutations.

Mots clés : Cancer du sein, Récepteur aux œstrogènes, Imagerie TEP, [18F]-FES, Mutations.

Imagerie préclinique SPECT des cancers HER2 positifs avec [111In]In-DOTAGA-trastuzumab et [111In]In-DOTAGA-pertuzumab

Auteurs : Agnieszka Kownacka ¹, Pierre-Simon Bellaye ¹, Mathieu Moreau ², Camille Petitot ^{1,3}, Sarah Jedidi ¹, Michael Claron ², Mélanie Guillemain ¹, John Simonet ¹, Marie Monerrat ¹, Alex Helbling ¹, Alexandra Oudot ¹, Romain Douhard ¹, Alexandre Cochet ^{1,2}, Alan Courteau ^{1,2}, Bertrand Collin ^{1,2}, Sylvain Ladoire ^{1,3}, Alexandre M. M. Dias ¹

1. CGFL, Service de médecine nucléaire, plateforme IMATHERA (BiosanD – UMS INSERM 58, Dijon)
2. ICMUB UMR CNRS 6302, Université de Bourgogne, Dijon
3. CTM UMR INSERM 1231, Dijon

Introduction :

La protéine HER2 est un récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR). Elle est directement impliquée dans la croissance tumorale et représente une cible théranostique attrayante car surexprimée dans un grand nombre de cancers (e.g. sein, estomac, glandes salivaires, utérus, pancréas). Parmi les 2 millions des nouveaux cas de cancer du sein diagnostiqués chaque année chez la femme, environ 20% sont HER2-positifs. Malgré une amélioration significative du pronostic de ces patientes grâce à la thérapie ciblée anti-HER2 fondée sur les anticorps monoclonaux (mAb, e.g. trastuzumab, pertuzumab), il reste une proportion significative de patient non-répondeurs ou développant des mécanismes résistance. Dans une perspective théranostique, le radiomarquage des mAb cliniques anti-HER2, pourrait s'avérer pertinente pour la tomographie par émission monophotonique (SPECT, avec Indium-111) et la radiothérapie interne vectorisée (RIV, avec Lutetium-177). Ainsi, l'objectif de cette étude est de construire les versions radiomarquées de Trastuzumab et Pertuzumab pour l'imagerie SPECT d'un modèle préclinique de cancer du sein surexprimant HER2.

Méthodes :

Les anticorps ont été conjugués de façon aléatoire à un agent bifonctionnel chélatant (DOTAGA) adapté pour le radiomarquage avec de l'indium-111 (¹¹¹In) et du lutétium-177 (¹⁷⁷Lu). La pureté radiochimique (PRC) a été évaluée par chromatographie sur couche mince instantanée. Des essais de cytométrie sur cellules surexprimant HER2 ont été réalisés au préalable pour s'assurer que la bioconjugaison ne modifiait pas l'affinité des anticorps pour leur cible. In vivo, un total de 106 cellules (HCC1954) a été implanté par voie sous-cutanée dans le flanc droit des souris Swiss Nude préalablement irradiées (n=25). Enfin, le [111In]In-DOTAGA-trastuzumab et le [111In]In-DOTAGA-pertuzumab (30 µg, 10 MBq par souris dans 100 µL, n = 6) ont été injectés par voie intraveineuse (volume tumoral cible : 100-300mm³). Les animaux ont été imagés en SPECT à 30min, 24h, 48h, 96h, 120h, 144h et 192h après l'injection.

Résultats :

Après purification, la PRC était supérieure à 99 %. Les essais de cytométrie en flux ont montré une fixation des radioconjugués comparable à celle des anticorps natifs. Les imageries SPECT du [111In]In-DOTAGA-trastuzumab et [111In]In-DOTAGA-pertuzumab ont montré une fixation tumorale croissante jusqu'à 144 heures après l'injection (34.2 ± 8.65 %ID/cc et 39.1 ± 7.47 %ID/cc respectivement).

Conclusion :

Notre étude démontre que les deux anticorps étudiés pourraient être des compagnons diagnostiques SPECT dans le cadre des cancers HER2 positifs. La versatilité du chélate DOTAGA ouvre la voie à la RIV après radiomarquage avec le ¹⁷⁷Lu. Cette stratégie théranostique s'inscrit comme une approche innovante personnalisée permettant de compléter les stratégies existantes et répondre aux besoins médicaux non-satisfaits, en particulier en situation métastatique.

Mots-clés : SPECT préclinique, compagnon diagnostique, cancer du sein, ¹¹¹In, théranostique

Is pre-therapeutic dosimetry on dynamic 68Ga-PSMA-11 PET/CT imaging a good estimate of post- 177Lu-PSMA-617 therapy absorbed dose in metastatic, castration-resistant prostate cancer?

Auteurs : N.Payan ^{1,2}, C.Drouet ¹, A.Jougla ¹, A.Cochet ^{1,2}, J-M.Vrigneaud ^{1,2}

1. Centre George François Leclerc, Dijon, FRANCE

2. ICMUB laboratory, UMR CNRS 6302, University of Burgundy, Dijon, FRANCE

Introduction :

In 177Lu-PSMA-617 targeted radionuclide therapy, predicting the absorbed dose based on pre-treatment scans could be a step forward in personalised medicine, by improving patient selection and adjusting the therapeutic dose. The aim of this study was to assess the agreement between mean absorbed dose coefficients extracted from diagnostic dynamic 68Ga-PSMA-11 PET/CT and after the first cycle of 177Lu-PSMA-617 therapy in healthy organs in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer (mCRPC).

Méthodes :

Seven patients (mean age of 72y) with mCRPC who underwent diagnostic 68Ga-PSMA-11 PET/CT scans followed by a 7.4 (+/-10%) GBq 177Lu-PSMA-617 therapy were included. Pre-therapeutic mean absorbed dose coefficients in healthy organs (kidneys, liver, spleen, salivary glands and red bone marrow extracted from L2 to L4) were obtained from six passes of 68Ga-PSMA-11 whole-body PET/CT scans performed in continuous bed motion, for approximately one hour. Post-therapeutic mean absorbed dose coefficients of the same organs were extracted from SPECT/CT scans acquired 5h, 24h, 4 days and 8 days after the first injection of 177Lu-PSMA-617 therapy. Healthy organs were manually delineated on the CT images using MIM® software (v.7.3 MIM Inc., Cleveland, OH, USA) and the corresponding organ-specific time-activity curves were generated. Cumulated activities were fitted using a trapezoidal method and considering only physical decay after the last imaging time point. S-value based dosimetry was performed in IDAC-Dose v2.1 using organ time integrated activity coefficients and adjusted masses. Spearman correlation coefficients were calculated between pre- and post-therapeutic mean absorbed dose coefficients.

Résultats :

Two patients had diffuse metastatic bone disease for which red bone marrow analysis could not be performed. The mean (+/-SD) absorbed doses before and after treatment were 0.35 (+/-0.17), 0.07 (+/-0.05), 0.02 (+/-0.002), 0.11 (+/-0.04) and 0.11 (+/-0.03) mGy/MBq and 0.54 (+/-0.21), 0.17 (+/-0.18), 0.04 (+/-0.05), 0.34 (+/-0.20) and 0.09 (+/-0.05) mGy/MBq for kidney, liver, red bone marrow, salivary glands and spleen respectively. Strong significant correlations were observed between the mean absorbed dose coefficients before and after treatment for kidney ($\rho=0.93$, $p\text{-value}=0.007$), liver ($\rho=0.82$, $p\text{-value}=0.034$), salivary glands ($\rho=0.93$, $p\text{-value}=0.007$) and spleen ($\rho=0.86$, $p\text{-value}=0.024$).

Conclusion :

Strong correlations between pre- and post-therapeutic mean absorbed dose coefficients were observed for kidneys, liver, salivary glands and spleen. These results highlight the potential of a predictive pre-therapeutic dosimetry based on diagnostic imaging. Only red active bone marrow showed no significant agreement between pre- and post-treatment dosimetry. To confirm these results, further investigations are underway by recruiting additional patients, and an extended analysis of tumours dosimetry will be carried out.

Mots clés : Prostate, Targeted Radionuclide Therapy, dosimetry, 177Lu PSMA

Imagerie TEP théranostique préclinique des cancers CD38 positifs avec les sondes [Zr89]Zr-DFO/DOTA-GA-Isatuximab et [Zr89]Zr-DFO/DOTAGA-Daratumumab.

Auteurs : Camille Petitot ^{1,2}, Alexandre M. M. Dias ¹, Delphine Vivier ³, Mathieu Moreau ³, Agnieszka Kownacka¹, Michael Claron ³, Mélanie Guillemain ¹, John Simonet ¹, Jame Frenay ^{1,2}, Alex Helbling ¹, Alan Courteau ^{1,3}, Alexandre Cochet ^{1,3}, Franck Denat ³, Pierre-Simon Bellaye ¹, François Girodon ^{1,4}, Bertrand Collin^{1,3}

1. CGFL, Service de médecine nucléaire, plateforme IMATHERA, Dijon
2. UB, Dijon
3. ICMUB, Université de Bourgogne, Dijon
4. CHU, Dijon

Introduction :

CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type 2, exprimée à la surface des cellules immunitaires. Elle interagit avec la protéine CD19 entraînant la prolifération et la différenciation de certaines cellules leucémiques de type myéloïde. La protéine CD38 représente une cible théranostique attrayante car elle est surexprimée dans le myélome multiple, certains lymphomes et leucémies. Dans une perspective théranostique, le radiomarquage des anticorps monoclonaux cliniques anti-CD38 (Daratumumab - DARA et Isatuximab - ISA), pourrait s'avérer pertinente pour l'imagerie de tomographie d'émission de positons (TEP) et la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Ainsi, l'objectif de cette étude était de construire les versions radiomarquées de DARA et ISA pour l'imagerie TEP d'un modèle de lymphome CD38 positif.

Méthodes :

DARA et ISA ont été conjugués de façon spécifique à un bischélate combinant déféroxamine (DFO) et DOTAGA pour être radiomarqués avec du zirconium 89 (⁸⁹Zr) et le lutétium 177 (¹⁷⁷Lu), respectivement. La pureté radiochimique (PRC) a été évaluée par chromatographie sur couche mince instantanée. Des essais de liaison in vitro ont été réalisés pour s'assurer que la bioconjugaison ne modifiait pas l'affinité du radioconjugué pour sa cible. In vivo, un total de 106 cellules (Ramos, lymphome de Burkitt) ont été implantées par voie sous-cutanée dans le flanc droit de souris Swiss Nude préalablement irradiées (n = 12). Enfin, le [⁸⁹Zr]Zr-DFO/DOTAGA-DARA et le [⁸⁹Zr]Zr-DFO/DOTAGA-ISA (50 µg, 5 MBq par souris dans 100 µL, n = 6) ont été injectés par voie i.v. (volume tumoral cible : 100-300 mm³). En parallèle, un groupe contrôle (déplacement, n = 3) de souris a reçu les radioconjugués plus un excès de 100x de DARA et ISA non-radiomarqués, respectivement. Ensuite, les souris ont subi une imagerie TEP à 6h, 24h, 48h, 72h et 96h après l'injection. Un comptage gamma ex vivo des tissus a été réalisé à 96h.

Résultats :

Après purification, la PRC était systématiquement supérieure à 95 % (activité spécifique de 150MBq/mg) pour les deux anticorps. Les essais in vitro ont montré une bonne fixation des sondes via cytométrie en flux, comparable à celle des anticorps natifs (98% vs 100% cellules CD38+). Les imageries TEP du [⁸⁹Zr]Zr-DFO/DOTAGA-DARA et du [⁸⁹Zr]Zr-DFO/DOTAGA-ISA ont montré une fixation tumorale croissante jusqu'à 96 heures après l'injection (26,4 ± 1,5 %ID/g et 24,7 ± 1,5 %ID/g respectivement). Une bonne spécificité de fixation des sondes a été démontrée par une fixation significativement diminuée d'environ 3,5 fois dans le groupe déplacement (7,9 ± 1,5 %ID/g et 6,9 ± 1,5 %ID/g respectivement). L'ensemble de ces données a été confirmé par les données de comptage ex vivo à 96h après injection.

Conclusion :

Notre étude démontre que DARA et ISA pourraient tous deux être des compagnons diagnostiques TEP appropriés dans le cadre des cancers CD38 positifs. La versatilité du bischélate ouvre la voie à la réalisation de la RIV par radiomarquage au ¹⁷⁷Lu en s'appuyant sur les données TEP pour la dosimétrie. Cette approche est un premier pas vers la personnalisation des traitements qui pourrait améliorer leur efficacité en limitant les effets indésirables associés.

Mots-clés : Imagerie TEP préclinique, compagnon diagnostic, lymphomes, ⁸⁹Zr, théranostique

Stratégie bischélate pour « paire théranostique » (TEP et RIV) : synthèse du premier immunoconjugué DFO/DO-TAGA en version site-spécifique

Auteurs : Delphine Vivier ¹, Mathieu Moreau ¹, Michael Claron ¹, Franck Denat ¹

1. Université de Bourgogne, ICMUB UMR CNRS 6302, Dijon, 21000, France

Introduction :

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) a récemment connu un essor significatif, notamment grâce à la commercialisation du Lutathera® et du Pluvicto®. Consistant à acheminer un radioisotope directement aux cellules cancéreuses grâce à un vecteur ciblant une protéine sur-exprimée par ces dernières, la RIV permet ainsi de réduire l'exposition des tissus sains aux radiations et diminue les effets secondaires par rapports aux traitements non ciblés tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie externe. En la combinant avec une technique d'imagerie comme la tomographie par émission de positons (TEP), il devient possible de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier du traitement mais également de suivre son efficacité. Le concept de "radiothéranostique" a été développé autour des molécules précitées. Cependant, la nécessité d'utiliser deux radionucléides différents pour l'agent thérapeutique et le "compagnon diagnostique" (e.g. ¹⁷⁷Lu et ⁶⁸Ga) peut s'avérer un verrou dans la conception d'une molécule unique dans laquelle l'agent chélatant sera inévitablement mieux adapté à l'un ou l'autre des radiométaux. Nous proposons ici la synthèse d'une sonde composée d'une plateforme bischélate DOTAGA/DFO pour la "paire théranostique" ¹⁷⁷Lu/⁸⁹Zr, conjuguée de manière site-spécifique à un anticorps.

Méthodes :

Pour augmenter la polyvalence de notre sonde, nous avons adopté une approche de chimie click post-conjugaison pour introduire le chélateur dédié à la RIV. En partant de la lysine commerciale Boc-L-Lys(Fmoc)-OH, nous avons obtenu, en quatre étapes, la sonde DFO-Lys-DBCO, intégrant la déféroxamine (DFO, pour l'imagerie TEP) et une fonction de chimie click (DBCO). Cette sonde a ensuite été conjuguée de manière site-spécifique à l'anticorps Trastuzumab (Tzb) par une réaction enzymatique avec la transglutaminase (MTGase). Après purification, la cycloaddition SPAAC (Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition) entre le DBCO et un dérivé azoture du DOTAGA a permis d'obtenir le premier immunoconjugué bischélate site-spécifique (ss-Tzb-DFO-DOTAGA). Les réactions de bioconjugaison et de chimie click ont été suivies par spectrométrie de masse. Le conjugué obtenu a été radiomarké avec ⁸⁹Zr ou ¹⁷⁷Lu, et sa stabilité a été évaluée dans le PBS et le plasma par chromatographie sur couche mince instantanée pendant 7 jours. Une compétition avec un excès d'EDTA a également été réalisée.

Résultats :

La sonde DFO-Lys-DBCO a été synthétisée avec un rendement total de 39%. La conjugaison enzymatique à partir du trastuzumab déglycosylé a conduit à l'obtention du conjugué ss-Tzb-DFO-DBCO avec un taux de greffage de 2. La cycloaddition SPAAC a permis d'introduire en moyenne 1,8 DOTAGA par anticorps. Les radiomarkages du conjugué ss-Tzb-DFO-DOTAGA et des contrôles ss-Tzb-DFO-DBCO, ss-Tzb-DFO, et ss-Tzb-DOTAGA ont montré une excellente sélectivité de la DFO et du DOTAGA pour le ⁸⁹Zr et le ¹⁷⁷Lu respectivement. Les puretés radiochimiques sont supérieures à 94 % avant purification et le conjugué bischélate présente une stabilité comparable à celle des contrôles monochélate (≥ 95 % après 7 jours dans le plasma et le PBS).

Conclusion :

Le conjugué bischélate permet alternativement l'imagerie TEP et la RIV selon le radiométal utilisé, évitant le développement d'un compagnon diagnostique. De plus, sa synthèse en deux étapes offre une grande flexibilité, permettant notamment l'introduction d'autres chélateurs, tels que le MACROPA pour l'actinium-225 pour l' α -thérapie.

Mots clés : théranostique, imagerie TEP, radiothérapie interne vectorisée, conjugaison site-spécifique



ABSTRACTS

SESSION 5

**NANOPARTICULES
EN ONCOLOGIE**

The use of cfDNA follow-up to track resistance mutations in patient with advanced breast cancer treated with anti-aromatase and CDK4/6 inhibitors: first results of the CICLADES study.

Auteurs : Margaux Betz ¹, Andrea Witz ¹, Julie Dardare ², Marie Husson ², Priscillia Tosti ³, Jean-Louis Merlin ¹, Vincent Massard ⁴, Alexandre Harlé ¹

1. Institut de Cancérologie de Lorraine, Service de Biopathologie, CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
2. Institut de Cancérologie de Lorraine, Service de Biopathologie, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
3. Institut de Cancérologie de Lorraine, Cellule de Promotion des Essais Cliniques, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
4. Institut de Cancérologie de Lorraine, Département d'oncologie médicale, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Introduction :

In 2022, breast cancer (BC) represented 11.7% of overall cancer diagnosis in women, accounting for over 2 million cases. Hormone-dependent BCs are eligible to endocrine therapy including anti-aromatase inhibitors (AI) and/or anti-cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitors. However, AI can cause selective pressure of subclonal cancer cells harboring resistance mutations within of ESR1, PIK3CA and/or AKT1 genes. The objective of CICLADES study is to monitor these mutations within cfDNA of patients with advanced or metastatic BC treated with AI and CDK4/6 inhibitors to try and detect early resistance during follow-up of clonal evolution.

Méthodes :

Twenty Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) samples as well as 840 plasma samples from the CICLADES patients were qualified and selected. After macrodissection, DNA was extracted using the AllPrep® DNA/RNA FFPE kit (Qiagen) for the FFPE samples and a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) was used for the plasma samples. Extracted FFPE DNA was sequenced with the NextSeq 550® (Illumina) using Hybridization Capture-based Target Enrichment and a 516-gene panel. The sequencing of cfDNA was performed with a similar technique, using a custom 33-gene panel with either a NovaSeq 6000® or a NextSeq 2000® (Illumina). Data obtained were then analyzed to identify highly mutated genes and specific mutations in genes of interest.

Résultats :

Among the 20 FFPE samples, only 19 were sequenced. Our results showed that several genes involved in the PI3-Kinase pathway were mutated across several samples, including hotspot mutations of PIK3CA. No relevant mutations of AKT and ESR1 genes were identified. Three mutational signatures were extracted and matched to COSMIC signatures 5, 6 and 30, associated with DNA damage repair and deficiency of the base excision repair system. Out of the 840 extracted plasma samples, only 777 reached the criteria for sequencing. Hotspot mutations were identified in all three of the genes of interest.

Conclusion :

The results correlate with the origin of the samples and the type of fixation. The analysis of mutations provided enough information to create a new panel of genes specific to our cohort for cfDNA follow-up. This also created a clear baseline mutational landscape for the analysis of the remaining samples of the CICLADES cohort. The cfDNA follow-up sequencing results show expected frequency of hotspot mutations in the genes of interest and will be further analyzed in comparison to the clinical data of the CICLADES patients.

Mots clés : cfDNA, Breast Cancer, Mutational Signature, Endocrine Therapy

L'analyse RNAseq du sang total circulant détecte l'activation du système immunitaire et prédit la réponse à l'immunothérapie dans le cancer de la vessie.

Auteurs : Romain Boidot ¹, Corentin Richard ¹, Sandy Chevrier ¹, Aurélien Marabelle ²,

1. Unité de Biologie Moléculaire, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Laboratoire de recherche translationnelle en immunothérapie, INSERM U1015, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Introduction :

Les immunothérapies anti-PD(L)1 ont révolutionné l'oncologie en obtenant des réponses tumorales durables dans les cancers avancés. Néanmoins, les biomarqueurs actuellement approuvés (PD-L1, MSI, TMB) ont des valeurs prédictives positives/négatives sous-optimales pour les réponses tumorales et la survie.

Méthodes :

Nous avons cherché à évaluer la valeur de l'expression génique dans le sang circulant pour prédire les réponses à l'immunothérapie. Nous avons réalisé une analyse RNAseq total (20 millions de reads paired-end) du sang total circulant et analysé les expressions géniques différentielles en fonction de la réponse clinique et de la survie des patients d'une cohorte de 186 patients de l'étude IOPREDI, cohorte ancillaire française de l'essai international multicentrique de phase III STRONG testant l'anti-PD-L1 durvalumab dans les cancers avancés de la vessie (NCT03084471).

Résultats :

Cent soixante-quatre des 186 échantillons ont généré des données exploitables sur le transcriptome sanguin. Grâce à des corrections mathématiques, tous les échantillons ont été normalisés et l'analyse a été possible sans introduire de biais malgré l'origine des échantillons provenant de 16 sites de recrutement. Nous avons tout d'abord observé que les patients présentant une réponse complète ou partielle ou une maladie stable surexprimaient 19 gènes, dont 5 sont des marqueurs de l'activation des cellules immunitaires : CXCL8, EOMES, GBP5, GZMA et GZMH. A l'inverse, les patients avec une maladie progressive surexpriment 11 gènes dont CD177, un marqueur des cellules neutrophiles, récemment associé à la résistance à l'immunothérapie. Ensuite, les patients avec une survie sans progression supérieure à 3 mois ont montré une surexpression de 25 gènes associés à l'activation des cellules immunitaires tels que les gènes CD8A, CXCL8, EOMES, FASLG et GZM, alors que les patients avec une survie sans progression plus courte exprimaient fortement des gènes d'inhibition des cellules immunitaires : CD177, CD300LG, CD99 et CST7. Enfin, les patients avec une survie globale supérieure à 7 mois avaient également une expression plus élevée des mêmes gènes complétés par 6, toujours indicateurs de l'activation de l'immunité (CD3D, CD3E, CD3G, GZMM, IL2RB, et PTGDS).

Conclusion :

L'analyse RNAseq total à partir de l'ARN directement extrait du sang total circulant peut détecter l'activation de base des cellules T chez les patients qui bénéficieront ultérieurement de l'immunothérapie anti-PD-L1. Ce travail montre que l'analyse RNAseq peut détecter un état d'activation immunitaire dans le sang circulant sans sélection cellulaire spécifique. Cette technique pourrait être expérimentée dans les essais cliniques pour sélectionner les patients susceptibles de bénéficier d'immunothérapies anticancéreuses.

Mots clés : RNAseq, sang total circulant, biomarqueur de réponse à l'immunothérapie, activation des cellules immunitaires

Effet de la radio-chimiothérapie sur la réponse immunitaire périphérique dans le glioblastome

Auteurs : Susy Daumoine ^{1,2,3}, Léa Hampe ^{1,2,3}, Emeric Limagne ^{1,2,3}, Nicolas Roussot ^{1,2,3,4}, François Borsotti ⁵, Julie Vincent ⁴, Sylvia Ilie ⁴, Caroline Truntzer ^{1 2 3 6}, François Ghiringhelli ^{# 1 2 3 4 6}, Marion Thibaudin ^{# 1 2 3 6}

1. Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.
2. Plateforme de transfert en biologie du cancer, Département Biologie et pathologie des tumeurs, Centre Anticancer Georges-François Leclerc, UNICANCER, 1 rue Professeur Marion, 21000, Dijon, France.
3. Centre de Recherche INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France.
4. Département d'oncologie médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France.
5. Département de neurochirurgie, Hôpital Universitaire François Mitterrand, Dijon, France.
6. Genetic and Immunology Medical Institute, Dijon, France.

Introduction :

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale primaire au pronostic sombre, souvent résistante à l'immunothérapie et associée à une immunosuppression. Cette étude vise à évaluer l'impact des stéroïdes et du traitement par radio-chimiothérapie (protocole de Stupp) sur les paramètres immunitaires du sang chez des patients atteints d'un glioblastome et leur lien avec les résultats cliniques.

Méthodes :

En utilisant des panels de cytométrie en flux et des dosages de cytokines/chimiokines via une technique luminex, nous avons analysé le phénotype immunitaire et les cytokines sériques de 54 patients atteints de glioblastome avant et pendant le protocole de radio-chimiothérapie et de 21 volontaires sains.

Résultats :

Les patients atteints de GBM présentent une diminution du nombre de cellules lymphoïdes (cellules T CD4, CD8, cellules NKT) avec une augmentation de l'expression des points de contrôle immunitaire à leur surface et une augmentation du nombre de cellules myéloïdes (en particulier les neutrophiles), ainsi qu'une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires par rapport à des volontaires sains. L'utilisation de stéroïdes diminue le nombre de cellules T et NK, tandis que la radio-chimiothérapie a entraîné une diminution du nombre de cellules lymphoïdes, une augmentation du nombre de cellules myéloïdes et une augmentation de l'expression des points de contrôle immunitaire. Certains sous-ensembles de cellules immunitaires ont été identifiés comme des prédicteurs potentiels de la réponse au traitement.

Conclusion :

Ces résultats mettent en lumière le paysage immunitaire périphérique dans le GBM, en soulignant les effets immunosuppresseurs du traitement standard. Les paramètres immunitaires de base peuvent servir d'indicateurs pronostiques pour la réponse au traitement.

Mots clés : Glioblastome, Réponse immunitaire, Stéroïdes, Temozolomide, Biomarqueurs

Classification morphologique et histopronostique automatisée par deep learning de métastases hépatiques d'origine colorectal.

Auteurs : Valentin Derangère^{1,3,5}, Théo Fourier^{1,2}, Léo Elola¹, Titouan Huppé¹, Alis Ilié¹, David Rageot^{1,3}, Peter Vermeulen⁴, François Ghiringhelli^{1,2,3}, Caroline Truntzer^{1,3},

1. Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Service d'oncologie médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
3. Centre de recherche INSERM CMT, Université de Bourgogne, Dijon, France
4. GZA Hospital St. Augustinus, Anvers, Belgique
5. Département de Biologie et de Pathologie des Tumeurs, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

Introduction :

Les patients atteints de cancer colorectal métastatique ont un pronostic sévère avec une survie à 5 ans inférieure à 20%. Le foie est le principal site métastatique et ces métastases hépatiques sont en grande partie responsables de la mortalité des patients. Certains patients peuvent bénéficier d'une chirurgie de résection des métastases hépatiques, permettant un traitement potentiellement curatif. Le taux de rechute post-opératoire reste cependant élevé, entre 60 et 80%, justifiant la recherche de facteurs pronostiques de rechute et de survie. La morphologie des métastases hépatiques a récemment suscité un regain d'intérêt, et notamment son interface avec le foie sain. Plusieurs phénotypes d'interface, appelés Histopathological Growth Patterns (HGP) ont été décrits et ont une valeur pronostique de rechute et de survie. Cependant, la classification des HGPs, réalisée sur coloration standard en hématoxyline – éosine (HE), s'avère difficile et chronophage et n'est pas réalisée en routine clinique. Notre groupe propose de mettre au point une classification automatique par intelligence artificielle (IA) des HGPs.

Méthodes :

Sur une cohorte de 163 patients pris en charge au Centre Georges-François Leclerc de Dijon entre 2000 et 2020, les HGPs ont été caractérisées sur les lames HE. Nous avons également réalisés un triple marquage chromogénique mettant en valeur les hépatocytes (marqueur Hepatocyte), les cellules tumorales coliques (marqueur SATB2) et les cellules d'origine mésenchymateuse composant la fibrose (marqueur Vimentine). Ce triple marquage a permis d'entraîner un modèle de deep learning de classification des HGPs.

Résultats :

La classification des HGPs sur l'HE s'est avérée pronostique sur la survie globale des 163 patients de notre cohorte ($p=0.005$; HR = 2 [1.2 – 3.2]) confirmant les données de la littérature. Le modèle de deep learning entraîné à partir des données morphologiques du triple marquage permet de classer les HGPs avec une précision de 95%. La classification de l'HGP issue du triple marquage est tout aussi pronostique que la classification issue de l'HE ($p=0.01$; HR = 1.7 [1.1 – 2.7]).

Conclusion :

Le modèle de classification des HGPs à partir de notre triple marquage chromogénique, ainsi que sa valeur pronostique vont être prochainement évalués sur une plus large cohorte de patients. Si nous confirmons ces résultats, une utilisation en routine pourrait être envisagée pour la stratification histopronostique des patients atteints de métastase hépatiques d'origine colorectale et améliorera leur prise en charge.

Mots clés : Cancer colorectal, métastases hépatiques, Histological Growth Pattern, intelligence artificielle.

Frequency of HPV DNA detection below the clinical decision threshold of the Alinity m HR-HPV technique (Abbott) and context of occurrence

Auteurs : Di Domizio Nolwen ³, Node J^{1,2}, Dor F⁴, Puget L^{1,2}, Ramanah R⁵, Cot S⁵, Bibeau F⁶, Prétet J-L^{2,3,4}, Lepiller Q^{1,2,3}

1. Laboratoire de virologie, CHU de Besançon, Besançon, France ;
2. CNR Papillomavirus, CHU Besançon, France ;
3. UMR 6249 Laboratoire Chrono-environnement, CNRS, Université de Franche-Comté, France ;
4. Laboratoire de biologie cellulaire, CHU Besançon, France ;
5. Service de gynécologie-Obstétrique, CHU Besançon, France ;
6. Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU Besançon, France.

Introduction :

The clinical decision threshold for HPV testing aims to get the best balance between sensitivity and specificity for cervical cancer screening. However, there may be a "grey zone" (GZ) between the test's analytical sensitivity threshold (detection of HPV DNA) and the clinical decision threshold (test positivity). This study aims to determine the frequency of GZ results and the context in which they occur in routine practice.

Method.

Cervico-uterine smears taken over a 22-month period at Besançon University Hospital as part of the organized cervical cancer screening were tested using the Alinity m HR-HPV technique (Abbott). The clinical and biological data were collected and analyzed retrospectively.

Results.

Of the 6 101 samples analyzed, 102 (1.7%) had a GZ result. The proportion of GZ results varied according to the genotype (up to 11.8% of samples containing HPV 31/33/52/58). Reflex cytology was normal or classified as ASC-US in 74.6% and 17.9% of cases. Previous or subsequent detection of a possibly-same-genotype HPV was observed in 58% and 38% of cases respectively. Two women, known for a persistent HPV detection and who presented a GZ result, were diagnosed with a precancerous lesion (CIN2+) 1 year after this GZ result.

Conclusion :

GZ HPV test results are frequent with the Alinity m HR-HPV technique (Abbott), and this frequency varies according to the genotypes. In the majority of cases, cytology is normal or shows minor abnormalities. Some rare women, known for a persistent HPV infection, should nevertheless be followed more closely in case of a transitory detection of HPV in the GZ of the test used.

Key words: HPV, cervical cancer, screening, Alinity m HR-HPV technique, grey zone

Apprentissage supervisé d'images spectrales infrarouge pour le diagnostic des différents sous-types de cancer du sein

Auteurs : Hayat EL TAHECH¹, Seydou KANE¹, Cédric LEREVEREND², Caroline FICHEL², Jawaheer HASSANI¹, Sandrine TREVOUX¹, Valérie UNTEREINER³, Jacqueline LEHMANN-CHE⁴, Eva BRABENCOVA⁵, Vincent VUIBLET^{1,6}, Loïs BOLKO⁷, Jean-Hugues SALMON⁷, Olivier PIOT¹, Stéphane POTTEAUX², Cyril GOBINET¹

1. Université de Reims Champagne-Ardenne, BIOSPECT, Reims, France
2. Université de Reims Champagne-Ardenne, IRMAIC, Reims, France
3. Université de Reims Champagne-Ardenne, URCATech, PICT, Reims, France
4. Pathophysiology of Breast Cancer Team, Université de Paris, INSERM U976, HIPI, Paris, France
5. Institut Godinot, Reims, France
6. Département de Néphro-Pathologie, Unité de Pathologie, CHU Reims, Reims, France
7. Service de Rhumatologie, CHU Reims, Reims, France

Introduction :

Le cancer du sein est le plus fréquent chez les femmes et la principale cause de décès par cancer dans cette population, d'où l'importance de son diagnostic précoce. L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel de l'imagerie spectrale infrarouge et de l'apprentissage automatique pour le diagnostic précoce des cancers du sein surexprimant le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2+) et des cancers du sein triple négatif (TNBC).

Méthodes :

Des images spectrales infrarouge ont été acquises à une résolution spatiale de 6,25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, dans la gamme spectrale 900-1800 cm^{-1} , sur des coupes tissulaires de 8 μm provenant de 33 patientes atteintes de cancer (18 HER2+ et 15 TNBC) et de 14 patientes bénignes ayant subi une chirurgie curative sans chimiothérapie néoadjuvante. Dans un premier temps, les images spectrales ont été corrigées atmosphériquement, débruitées, et enfin prétraitées pour neutraliser les effets de ligne de base et de contributions lipidiques parasites. Dans un second temps, les régions tissulaires de chaque image ont été automatiquement sélectionnées à l'aide d'un clustering. Par la suite, des algorithmes d'apprentissage supervisé récents et populaires, à savoir l'apprentissage profond et LightGBM, ont été optimisés d'abord pour différencier les échantillons bénins des échantillons cancéreux, puis pour différencier les sous-types HER2+ et TNBC parmi les échantillons cancéreux. A cette fin, 10 modèles différents ont été optimisés par validation croisée à partir d'une distribution aléatoire différente de patientes dans les ensembles d'entraînement et de validation. Afin d'évaluer les performances des modèles et d'exploiter la diversité de ces 10 modèles, une approche d'apprentissage ensembliste par vote majoritaire a été mise en œuvre pour classer les patientes dans l'ensemble de test.

Résultats :

Pour la classification entre bénin et cancer, 100% des échantillons bénins et 97% des échantillons cancéreux ont été correctement identifiés en test, prouvant l'efficacité de l'imagerie spectrale infrarouge combinée aux récentes méthodes de classification supervisée pour le diagnostic du cancer du sein à partir d'échantillons suspects. Pour la classification TNBC versus HER2+, 86% des échantillons HER2+ et 83% des échantillons TNBC ont été correctement identifiés en test, prouvant la capacité de l'imagerie spectrale infrarouge à exploiter les petites différences spectrales entre ces deux sous-types de cancer du sein. Quel que soit l'algorithme de classification supervisée utilisé, c'est-à-dire l'apprentissage profond ou LightGBM, les mêmes résultats ont été obtenus sur l'ensemble de test. Cependant, l'apprentissage profond étant beaucoup plus chronophage, LightGBM semble être un meilleur choix pour ce type d'application.

Conclusion :

La combinaison de l'imagerie spectrale infrarouge et d'un algorithme de classification supervisée récent et performant permet d'identifier automatiquement les échantillons cancéreux des échantillons bénins, et en plus de différencier les échantillons HER2+ des TNBC. Dans un travail futur, cette méthodologie sera étendue à l'identification d'un autre sous-type de cancer du sein, appelé tumeur luminale. Cependant, ce problème plus complexe nécessitera la construction d'un jeu de données plus conséquent, par l'acquisition de nombreuses images spectrales ou par la mise en œuvre de stratégies d'augmentation des données.

Mots clés : cancer du sein, imagerie infrarouge, intelligence artificielle

Mise en évidence d'une signature pronostique HERV dans le cadre du cancer du sein précoce

Auteurs : Julie Lecuelle ¹, Silvia Mihaela Ilie ², François Ghiringhelli ^{1,2}, Caroline Truntzer ¹, Sylvain Ladoire ^{1,2}

1. Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. Département d'Oncologie médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

Introduction :

Les Rétrovirus Endogènes Humains (HERV) sont des séquences terminales longues répétées contenant des éléments génomiques qui sont des reliquats d'infections ancestrales. Les séquences d'ERVs représentent approximativement 8% du génome humain et sont généralement présentes dans le tissu normal humain. Cependant, il arrive qu'elles se retrouvent dans les cellules tumorales, pouvant alors induire une réponse Interféron.

Dans le cadre du cancer du sein précoce, nous avons cherché à identifier si certains ERVs, associés aux signatures transcriptomiques de la réponse Interféron, étaient corrélés aux marqueurs de réponse à l'immunothérapie et à la survie des patients.

Méthodes :

L'étude concerne les patientes atteintes d'un cancer du sein précoce issues de la base de données du TCGA. Les patientes ont été réparties en 3 groupes en fonction de leurs sous-types histologiques basés sur les récepteurs hormonaux (RH) et le statut du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2): RH+/HER2-, HER2+ et Triple-Négatif (TN).

Les séquences des HERVs ont été détectées via le logiciel Telescope à partir du séquençage ARN des patientes. Seuls les HERVs sur-exprimés dans le tissu tumoral ont été retenus. Une signature, nommée « Breast HERV23 », a été estimée en calculant la moyenne des expressions par patient des HERVs significativement corrélés à trois voies de l'Interféron de type I.

Nous avons ensuite testé le rôle pronostique de cette signature sur la survie sans progression à 5 ans à l'aide d'un modèle de Cox.

Résultats :

Au total, 23 HERVs sont significativement corrélés avec chacune des trois voies de l'Interféron de type I. La signature « Breast HERV23 », composée de ces 23 HERVs, est associée à une meilleure survie sans progression chez les patientes RH+/HER2- (HR=0.54 [0.33, 0.88]; p=0.01). Après ajustement sur les variables cliniques (expression de KI67, âge et statuts N et T), notre signature reste significativement liée à une meilleure survie sans progression chez les patientes RH+/HER2- (HR=0.49 [0.28, 0.85]; p=0.01).

De plus, la signature est significativement corrélée à la quantité de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et à l'expression du PD-L1 (respectivement, coefficient de Pearson : r=0.63 et r=0.61; p<0.001) mais est inversement corrélée à l'expression du gène ESR1 (r=-0.25; p<0.001).

Conclusion :

Nous avons mis en évidence une signature basée sur l'expression de 23 HERVs sélectionnés pour leur corrélation avec les voies Interféron de type I dans le cancer du sein précoce.

Chez les patientes RH+/HER2-, cette signature est associée à une meilleure survie sans progression et aux marqueurs de réponse immunitaire anti-tumorale. Elle est aussi fortement corrélée à tous les biomarqueurs tumoraux prédictifs de la réponse à l'immunothérapie néo-adjuvante.

Ce nouveau biomarqueur est en cours de validation dans une cohorte indépendante.

Mots clés: Cancer du sein précoce, Rétrovirus endogènes humains, biomarqueurs, immunothérapie

L'évaluation de l'infiltrat immunitaire par intelligence artificielle permet de prédire la survie dans une analyse groupée de trois cohortes internationales de cancer du côlon de stade III

Auteurs : Julie Lecuelle ^{1,2*}, Caroline Truntzer ^{1,2,3*}, Debora Basile ⁴, Luigi Laghi ^{5,6}, Luana Greco ⁶, Alis Ilie ^{1,2}, David Rageot ^{1,2}, Jean-François Emile ⁷, Frédéric Bibeau ^{8,9}, Julien Taïeb ^{10,11,12}, Côme Lepage ^{1,13,14,15}, Valentin Derangere ^{1,2,3,13*}, François Ghiringhelli ^{1,2,3,13,16*}

1. Centre de Recherche INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France
2. Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
3. Institut Médical de Génétique et Immunologie, Dijon, France
4. Département d'oncologie médical, San Giovanni di Dio Hospital, Crotone, Italy
5. Département de Médecine et Chirurgie, Université de Parme, Parme, Italy
6. Laboratoire de Gastroenterologie moléculaire, IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Milan, Italy
7. Paris-Saclay Université, Versailles SQY Université (UVSQ), EA4340-BECCOH, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Ambroise Paré Hospital, Smart Imaging, Service de Pathologie, Boulogne, France
8. Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Côte de Nacre, Normandie Université, Caen, France
9. Département de Pathologie, Besançon Université, Besançon, France.
10. Institut du Cancer Paris Cancer Research for Personalized Medicine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
11. Centre de Recherche des Cordeliers, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique, Sorbonne Université, Université Sorbonne Paris Cité, Université de Paris, Paris, France
12. Département de Gastroenterologie et Oncologie digestive, Georges Pompidou European Hospital, AP-HP Centre, Université Paris Cité, Paris, France
13. Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
14. Fédération Francophone de Cancérologie Digestive, Centre de randomisation gestion analyse, EPICAD LNC 1231, Dijon, France
15. Service d'Hépatogastroentérologie et oncologie digestive, CHU de Dijon, France
16. Département d'Oncologie médicale, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
- *. Contribution équivalente

Introduction : Le niveau d'infiltrat immunitaire des cancers colorectaux est un marqueur pronostique robuste et bien évalué dans la littérature, mais peu évalué de manière automatisée.

A partir de lames histologiques marquées par une technique d'immunohistochimie visant les lymphocytes T-CD3, les zones tumorales ont été détectées automatiquement par un modèle d'intelligence artificielle. Le niveau d'infiltration de la tumeur en cellules immunitaires a ensuite été estimé grâce à un algorithme de machine learning. Nous avons évalué si l'utilisation de l'intelligence artificielle via cet algorithme améliorerait la prédiction de la survie sans progression des patients par rapport à l'analyse de l'infiltrat des cellules T, seule, ou en association avec des variables cliniques.

Méthodes : Nous avons utilisé les données de deux essais cliniques de phase III (Prodige-13 et PETACC08) ainsi qu'une base de données italienne rétrospective (HARMONY). Ces données ont été divisées en cohortes d'entraînement (N=692), de validation interne (N=297) et de validation externe (N=672). Les lames ont été marquées avec un anticorps anti-CD3. A l'aide d'un modèle d'intelligence artificielle nommé ColoClass développé dans le laboratoire (Reichling et al, Gut, 2020), la zone tumorale et le front d'invasion ont été détectés automatiquement sur les lames histologiques. En se restreignant aux zones tumorales, un score « CD3 Machine Learning » (CD3ML) a été estimé à partir des paramètres graphiques extraits du logiciel QuPath (Bankhead P et al, Sci Report, 2017).

Nous avons ensuite évalué l'association entre l'infiltrat en lymphocytes T-CD3, le score CD3ML et des biomarqueurs cliniques connus, avec la Survie Sans Progression (SSP) à 5 ans en utilisant des modèles de Cox univariés et multivariés.

Résultats : Notre score CD3ML est significativement associé à la SSP dans la cohorte d'entraînement (HR=0.55 [0.41; 0.72], p<0.001) et dans les cohortes de validation (interne : HR=0.47 [0.3; 0.75], p=0.001, et externe : HR=0.5 [0.37; 0.67], p<0.001) en utilisant les seuils adaptés à chacune des cohortes.

Par ailleurs, ce score a de meilleures qualités prédictives que la quantification des lymphocytes T-CD3 par des méthodes conventionnelles (test du Likelihood Ratio p<0.001).

Enfin, notre score CD3ML ajusté sur les variables cliniques améliore la prédiction de la SSP par rapport aux variables cliniques seules (test du Likelihood Ratio p=0.001). Les patients avec un faible score CD3ML ont une meilleure SSP qu'ils aient un score clinique faible ou élevé.

Conclusion : Notre algorithme a permis d'obtenir un score digital colligeant le degré d'infiltration et les caractéristiques digitales propres à la tumeur. Ce score permet de prédire la SSP des patients traités par chimiothérapie de manière robuste et plus efficace que les biomarqueurs connus.

Mots clés: lymphocytes T-CD3, cancer du côlon, intelligence artificielle, biomarqueurs pronostiques.



Le récepteur de la vitamine D limite la progression du cancer de la prostate en atténuant le stress oxydatif et le recrutement des neutrophiles

Auteurs : Kateryna Len^{1,2,3,4}, Justine Gantzer^{1,2,3,4}, Christelle Thibault-Carpentier^{1,2,3,4}, Daniel Metzger^{1,2,3,4}, Gilles Laverny^{1,2,3,4}

1. Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch-Graffenstaden, 67400, France
2. CNRS UMR 7104, Illkirch-Graffenstaden, 67400, France
3. Inserm U1258, Illkirch-Graffenstaden, 67400, France
4. Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, 67400, France

Introduction :

Les Rétrovirus Endogènes Humains (HERV) sont des séquences terminales longues répétées contenant des éléments génomiques qui sont des reliquats d'infections ancestrales. Les séquences d'ERVs représentent approximativement 8% du génome humain et sont généralement présentes dans le tissu normal humain. Cependant, il arrive qu'elles se retrouvent dans les cellules tumorales, pouvant alors induire une réponse Interféron.

Dans le cadre du cancer du sein précoce, nous avons cherché à identifier si certains ERVs, associés aux signatures transcriptomiques de la réponse Interféron, étaient corrélés aux marqueurs de réponse à l'immunothérapie et à la survie des patients.

Méthodes :

L'étude concerne les patientes atteintes d'un cancer du sein précoce issues de la base de données du TCGA. Les patientes ont été réparties en 3 groupes en fonction de leurs sous-types histologiques basés sur les récepteurs hormonaux (RH) et le statut du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2): RH+/HER2-, HER2+ et Triple-Négatif (TN).

Les séquences des HERVs ont été détectées via le logiciel Telescope à partir du séquençage ARN des patientes. Seuls les HERVs sur-exprimés dans le tissu tumoral ont été retenus. Une signature, nommée « Breast HERV23 », a été estimée en calculant la moyenne des expressions par patient des HERVs significativement corrélés à trois voies de l'Interféron de type I.

Nous avons ensuite testé le rôle pronostique de cette signature sur la survie sans progression à 5 ans à l'aide d'un modèle de Cox.

Résultats :

Au total, 23 HERVs sont significativement corrélés avec chacune des trois voies de l'Interféron de type I. La signature « Breast HERV23 », composée de ces 23 HERVs, est associée à une meilleure survie sans progression chez les patientes RH+/HER2- (HR=0.54 [0.33, 0.88]; p=0.01). Après ajustement sur les variables cliniques (expression de KI67, âge et statuts N et T), notre signature reste significativement liée à une meilleure survie sans progression chez les patientes RH+/HER2- (HR=0.49 [0.28, 0.85]; p=0.01).

De plus, la signature est significativement corrélée à la quantité de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et à l'expression du PD-L1 (respectivement, coefficient de Pearson : r=0.63 et r=0.61; p<0.001) mais est inversement corrélée à l'expression du gène ESR1 (r=-0.25; p<0.001).

Conclusion :

Nous avons mis en évidence une signature basée sur l'expression de 23 HERVs sélectionnés pour leur corrélation avec les voies Interféron de type I dans le cancer du sein précoce.

Chez les patientes RH+/HER2-, cette signature est associée à une meilleure survie sans progression et aux marqueurs de réponse immunitaire anti-tumorale. Elle est aussi fortement corrélée à tous les biomarqueurs tumoraux prédictifs de la réponse à l'immunothérapie néo-adjuvante.

Ce nouveau biomarqueur est en cours de validation dans une cohorte indépendante.

Mots clés: Cancer du sein précoce, Rétrovirus endogènes humains, biomarqueurs, immunothérapie

Intérêt d'un diagnostic moléculaire intégré par NGS incluant l'amplification ERBB2 dans les cancers du sein

Auteurs : Jean-Louis Merlin ^{1,2}, Marie Husson ¹, Pauline Gilson ^{1,2}, Vincent Massard ³, Alexandre Harlé ^{1,2}, Agnès Leroux ¹

1. Institut de Cancérologie de Lorraine, 1 Département de Biopathologie, 2CNRS UMR7039 CRAN
2. Université de Lorraine,
3. Département d'Oncologie Médicale, Nancy

Introduction :

Le statut HER2 des cancers du sein (BC) est déterminé sur la base de niveau d'expression de la protéine HER2 par immunohistochimie (IHC) et de l'amplification du gène ERBB2 par hybridation in situ (ISH). Les BC sont alors classés en HER2 positif (IHC 3+ ou IHC 2+/ISH+) et HER2 négatif (IHC 0, IHC 1+ ou IHC 2+/ISH-). Récemment, les cancers du sein HER2-low (HER2-low BC) sont apparus comme un nouveau sous-type. Ils sont définis comme des tumeurs IHC1+ ou IHC2+/ISH- et représentent plus de la moitié de tous les BC. Ce sous-type doit maintenant être identifié pour permettre la mise en place précoce d'un traitement par chimiothérapie couplée à un anticorps anti-HER2 (ADC). Étant donné que l'identification des BC HER2-low, basée sur l'IHC et l'ISH, peut demeurer équivoque, nous avons évalué les performances du NGS, en complément de l'IHC, pour permettre un diagnostic moléculaire intégré, comprenant le statut HER2-low par l'analyse de l'amplification du gène ERBB2 mais également à partir de la même analyse, la recherche de mutations d'un panel de gènes activables, et la détermination du statut MSI.

Méthodes :

Les échantillons de BC ont été analysés à l'aide d'IHC et d'ISH, selon les procédures standards. Le NGS a été réalisé à l'aide d'un panel personnalisé de 51 gènes, comprenant des cibles moléculaires pour les BC tels que ESR1, PIK3CA, AKT1, ERBB2, TP53, BRCA1 et BRCA2. Les mutations génétiques ainsi que la variation du nombre de copies (CNV) et l'instabilité des microsatellites (MSI) ont été simultanément déterminées.

Résultats :

Trente et un échantillons de tumeurs FFPE ont été classés à l'aide de l'IHC et de l'ISH en 11 cancers HER2 positifs (IHC2+ ISH+ et IHC3+), 10 cancers HER2 négatifs (IHC 0) et 10 cancers HER2-low (IHC1+ et IHC2+ ISH-). En utilisant le NGS, les valeurs de CNV pour le gène ERBB2 étaient significativement différentes ($p < 0,001$) entre les tumeurs HER2 négatives, HER2-low et HER2 positives avec des valeurs moyennes de CNV de 2,0 (SD = 0,3), 1,9 (SD = 0,3) et 7,8 (SD = 6,8), respectivement. En utilisant 3,25 comme valeur seuil pour le CNV, une concordance de 90 % du statut d'amplification du gène ERBB2 a été obtenue entre ISH et NGS. Grâce au NGS, des mutations activables ainsi que des amplifications ont été détectées dans 68 % (21/31) et 19 % (6/31) des cas, respectivement. Un cas de MSI a été détecté dans un cas HER2 négatif et ISH non amplifié.

Conclusion :

Ces résultats montrent que dans les BC HER2 IHC positifs (scores 1+ à 3+), la détermination du CNV ERBB2 par NGS peut représenter une alternative à l'ISH, notamment pour l'identification du statut HER2-low. Cette approche permet de plus la détection simultanée de nombreuses cibles moléculaires activables.

Référence : Merlin JL, Husson M, Sahki N, Gilson P, Massard V, Harlé A, Leroux A. Integrated Molecular Characterization of HER2-Low Breast Cancer Using Next Generation Sequencing (NGS). Biomedicine. 2023 Nov 28;11(12):3164.

Mots clés : cancer du sein, statut HER2, NGS, diagnostic moléculaire

Détermination du déficit en recombinaison homologue par l'étude de la méthylation des promoteurs de BRCA1 et RAD51C chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire séreux de haut grade : résultats de l'étude BOVARY-Pilot et de la cohorte de l'ICL

Auteurs : Cassandra Michel¹, Andréa Witz¹, Idrissia Hanriot², Julie Dardare¹, Margaux Betz¹, Marie Rouyer³, Marie Husson³, Maxime Brun², Magali Lefebvre³, Céline Gavoille⁴, Pauline Gilson¹, Jean Louis Merlin¹, Alexandre Harlé¹

1. Département de Biopathologie – Service de Biologie Moléculaire des Tumeurs, Institut de Cancérologie de Lorraine - Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France
2. Département de Biopathologie, CHRU Nancy, Vandœuvre-Lès- Nancy, France
3. Département de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine - Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France
4. Département d'Oncologie Médicale, Institut de Cancérologie de Lorraine - Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction :

Le cancer de l'ovaire (OC) est la neuvième cause de décès par cancer chez les femmes et le cancer gynécologique le plus répandu dans le monde. Les patientes présentant des mutations délétères des gènes BRCA1/2, ainsi qu'un déficit en recombinaison homologue (HRD) sont plus susceptibles de bénéficier d'un inhibiteur de PARP. Environ 40 à 50 % des cancers séreux de haut grade de l'ovaire sont HRD. Des mutations germinales ou somatiques des gènes BRCA1/2 sont retrouvés dans 15 à 20 % des OC HRD. Cependant, la totalité des tumeurs HRD ne sont pas expliquées par la présence de ces mutations. En effet, de récentes études ont révélé que la méthylation des promoteurs de BRCA1 et RAD51C est également responsable du phénotype HRD chez environ 19 % et 2 % des patientes, respectivement.

Méthodes :

Deux cent vingt-quatre patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ont été incluses dans la cohorte de l'ICL et 20 dans la cohorte BOVARY. Toutes les patientes ont donné leur consentement. L'ADN a été extrait de tissu FFPE et le cfDNA du plasma. Le séquençage du génome entier low-pass a été utilisé pour déterminer le statut HRD. La méthylation des promoteurs de BRCA1 et de RAD51C a été analysée par droplet digital PCR (ddPCR) après conversion enzymatique. Un seuil de 10 % a été fixé pour définir un échantillon comme étant méthylé.

Résultats :

Le statut HRD a été déterminé pour 193 des 224 patientes. Parmi les 77 patientes HRD, 25 présentaient une mutation délétère de BRCA1/2 et 3 une mutation délétère de RAD51C. L'analyse de la méthylation a permis d'identifier 32 patientes méthylées pour BRCA1 et 1 méthylée pour RAD51C. La majorité des patientes méthylées étaient HRD. Dans la cohorte BOVARY, la méthylation du promoteur de BRCA1 n'a été détectée que dans un seul échantillon HRD, avec une méthylation concordante trouvée dans l'échantillon cfDNA apparié. Aucune méthylation du gène RAD51C n'a été trouvée.

Conclusion :

Nous démontrons la possibilité d'utiliser la ddPCR pour déterminer la méthylation des promoteurs de BRCA1 et RAD51C afin d'identifier les patientes avec une déficience en recombinaison homologue. De plus, bien que le nombre d'échantillons de cfDNA analysés reste modeste, nos résultats suggèrent que la biopsie liquide pourrait également être utilisée pour déterminer les statuts de méthylation de BRCA1 et RAD51C.

Mots clés : Cancer de l'ovaire, HRD, ddPCR, méthylation, iPARP

Identification of immune cells in PBMCs and tumors from a cohort of Tunisian CRC patients

Auteurs : Fadoua Missaoui^{1,2,3,4,5}, Ines Zemni^{3,4}, Lamia Charfi^{3,4}, Mrad Karima^{3,4}, Susy Daumoine^{2,6}, Léa Hampe^{2,6}, François Ghiringhelli^{2,5,6}, Marion Thibaudin^{2,6}, Catherine Paul^{1,2,5,#} & Raja Triki Marrakchi^{3,4,#}

1. Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, EPHE, PSL Research University, 75006 Paris, France.
2. CRI UMR INSERM1231, TIRECS team, 21000 Dijon, France.
3. Laboratory of Genetics Immunology and Human Pathology, University of Tunis El Manar, LR05ES05, Tunis 2092, Tunisia.
4. University of Tunis EL MANAR, Tunis 1007, Tunisia.
5. University of Burgundy, 21000 Dijon, France.
6. Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre GFL Leclerc, 21000 Dijon, France.
5. Institut Salah Azaiz, 1006 Tunis, Tunisia.
- #. Contributed equally

Introduction :

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale primaire au pronostic sombre, souvent résistante à l'immunothérapie et associée à une immunosuppression. Cette étude vise à évaluer l'impact des stéroïdes et du traitement par radio-chimiothérapie (protocole de Stupp) sur les paramètres immunitaires du sang chez des patients atteints d'un glioblastome et leur lien avec les résultats cliniques.

Méthodes :

En utilisant des panels de cytométrie en flux et des dosages de cytokines/chimiokines via une technique luminex, nous avons analysé le phénotype immunitaire et les cytokines sériques de 54 patients atteints de glioblastome avant et pendant le protocole de radio-chimiothérapie et de 21 volontaires sains.

Résultats :

Les patients atteints de GBM présentent une diminution du nombre de cellules lymphoïdes (cellules T CD4, CD8, cellules NKT) avec une augmentation de l'expression des points de contrôle immunitaire à leur surface et une augmentation du nombre de cellules myéloïdes (en particulier les neutrophiles), ainsi qu'une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires par rapport à des volontaires sains. L'utilisation de stéroïdes diminue le nombre de cellules T et NK, tandis que la radio-chimiothérapie a entraîné une diminution du nombre de cellules lymphoïdes, une augmentation du nombre de cellules myéloïdes et une augmentation de l'expression des points de contrôle immunitaire. Certains sous-ensembles de cellules immunitaires ont été identifiés comme des prédicteurs potentiels de la réponse au traitement.

Conclusion :

Ces résultats mettent en lumière le paysage immunitaire périphérique dans le GBM, en soulignant les effets immunosuppresseurs du traitement standard. Les paramètres immunitaires de base peuvent servir d'indicateurs pronostiques pour la réponse au traitement.

Mots clés : Glioblastome, Réponse immunitaire, Stéroïdes, Temozolomide, Biomarqueurs

Évaluation de l'intérêt du suivi longitudinal de l'ADN libre circulant de patients opérés d'un adénocarcinome canalaire pancréatique inclus dans la cohorte PANCREAS-CGE : étude PAN-CGE-BLISS Pilot.

Auteurs : Andréa WITZ ^{1,2}, Margaux BETZ ^{1,2}, Julie DARDARE ^{1,2}, Florence SCHAFFNER ³, Marie ROUYER ¹, Marie Husson ¹, Pauline GILSON ^{1,2}, Jean-Louis MERLIN ^{1,2}, Alexandre HARLÉ ^{1,2} ; PANCREAS-CGE Investigators (Bruno HEYD ⁴, Christophe BORG ⁴, Francine FEIN ⁴, Christelle D'ENGREMONT ⁴, Anne-Claire DUPONT-GOSSART ⁴, Philippe BACHELLIER ⁵, Pietro ADDEO ⁵, François FAITOT ⁵, Ahmet AYAV ⁶, Olivier BOUCHE ⁷, Sophie DEGUELTE ⁷, Tullio PIARDI ⁷, Patrick DUFOUR ⁸, François GHIRINGHELLI ⁹, Patrick RAT ¹⁰, Sylvain MANFREDI ¹⁰, Serge FRATTE ¹¹).

1. Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France
2. CNRS UMR 7039 CRAN Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France
3. Cancéropôle Est, Strasbourg, France
4. CHRU de Besançon, Besançon, France
5. CHU de Strasbourg Hautepierre, Strasbourg, France
6. CHU de Nancy – Hôpital Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy, France
7. CHU Robert Debré-Reims, Reims, France
8. Centre Paul Strauss, Strasbourg, France
9. Centre Georges-François Leclerc de Dijon (CGFL), Dijon, France
10. CHU de Dijon, Dijon, France
11. Hôpital Nord Franche-Comté (HNFC), Montbéliard, France

Introduction :

Le cancer du pancréas est une maladie difficile à traiter avec un pronostic parmi les plus sombres des tumeurs solides. La chirurgie reste à ce jour la seule option thérapeutique pouvant être curative. Néanmoins, la présence de maladie micro-métastatique au diagnostic affecte la survie des patients opérés. L'intérêt de l'ADN libre circulant (cfDNA) a largement été démontrée dans de nombreuses tumeurs solides pour le suivi de la maladie et en tant que facteur pronostic. Cependant, aucun biomarqueur n'est pour l'instant validé dans le cancer du pancréas. A partir de la cohorte PANCREAS CGE constituée de patients opérés d'un adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC), l'objectif de cette étude est de caractériser les tumeurs de 15 premiers patients et d'évaluer l'intérêt du suivi du cfDNA comme biomarqueur pronostic.

Méthodes :

L'ADN des prélèvements tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) des 15 patients a été extrait à l'aide du kit AllPrep® DNA/RNA FFPE (Qiagen). Le panel SureSelect Cancer CGP (Agilent) de 679 gènes a été utilisé pour séquencer ces ADN extraits des tissus sur NextSeq 2000® (Illumina). Le plasma était disponible pour ces 15 patients à quatre temps différents : au diagnostic, avant la chirurgie (après le traitement néoadjuvant), après la chirurgie (avant le traitement adjuvant) et à la fin du traitement adjuvant (ou 7 mois après la chirurgie). Le cfDNA de ces 60 plasmas a été extrait à l'aide du kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen). La quantification et la qualification des cfDNA extraits ont été réalisées à l'aide du fluorimètre Qubit (ThermoFisher Scientific) et du Fragment Analyzer (Agilent), respectivement.

Résultats :

Tous les échantillons ont pu être analysés. Au total, 67 % des patients présentent une mutation du gène KRAS, la mutation G12D étant retrouvée dans 27 % des cas. Une mutation pathogénique germinale de BRCA2 a été retrouvée pour l'un des 15 patients. Le profil génomique de ces 15 patients est similaire à ceux décrits dans la littérature. L'analyse des concentrations a permis de mettre en évidence qu'une concentration en cfDNA supérieure à 1,05 ng/μL après la chirurgie était corrélée une faible survie globale ($p = 0,014$, HR = 0,170), tout comme une concentration élevée au diagnostic ($p = 0,036$, HR = 0,154). Une concentration en cfDNA qui double en période per-opératoire est également de mauvais pronostic ($p = 0,0281$, HR = 0,2). Seule la concentration en cfDNA à la fin du traitement adjuvant permet de prédire la survie sans maladie ($p = 0,0247$, HR = 0,136).

Conclusion :

En conclusion, le profil des 15 patients sélectionnés est homogène et correspond à ceux déjà décrits dans la littérature. Le suivi longitudinal des concentrations en cfDNA a permis de mettre en évidence que la concentration en cfDNA au diagnostic est un facteur pronostic indépendant chez les patients opérés d'un PDAC. Le cfDNA durant la période opératoire est également un facteur pronostique prometteur, tout comme le cfDNA post-adjuvant qui pourrait permettre de prédire les récurrences. Ainsi, l'utilisation du cfDNA en routine clinique semble pertinente chez les patients opérés d'un PDAC.

Mots clés : biopsie liquide, ADN libre circulant, cancer du pancréas

Évaluation d'une nouvelle technique de PCR automatisée Idylla IDH1-2 mutation assay pour la détection de variants hotspots IDH1 et IDH2 dans les tumeurs solides et cancers hématologiques

Auteurs : Pauline Gilson ^{1,2}, Marc Muller ^{2,3}, Guillaume Gauchotte ^{2,4}, Smahane Fadil ², Marie Rouyer ², Jessica Demange ², Cécile Alaimo ², Julie Zinzner ², Maxime Brun ², Marie Husson ^{1,2}, Idrissia Hanriot ², Andréa Witz ², Julie Dardare ², Margaux Betz ^{1,2}, Jean-Louis Merlin ^{1,2}, Alexandre Harlé ^{1,2}

1. Institut de Cancérologie de Lorraine, CNRS UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine
2. Département de Biopathologie, Institut de Cancérologie de Lorraine/CHRU Nancy
3. Laboratoire de Génétique, CHRU Nancy
4. INSERM U1256 NGERE, Université de Lorraine

Introduction :

Les variants gain-de-fonction des gènes IDH1 et IDH2 codant les isocitrate déshydrogénases sont observées dans diverses tumeurs, notamment les leucémies myéloïdes aiguës (LMA, 10-15%), les gliomes (G, > 70%), les chondrosarcomes (CS, 50%), les cholangiocarcinomes (CC, 15-20%) et les carcinomes papillaires solides à polarité inversée du sein (CPS, 77%). Leur détection dans ces pathologies permet d'orienter le diagnostic, le pronostic et le choix thérapeutique. Le testing IDH repose principalement sur des approches de séquençage nouvelle-génération (NGS), de PCR ou d'immunohistochimie (IHC). Dans cette étude rétrospective, nous avons évalué les performances analytiques d'une nouvelle technique de PCR microfluidique automatisée Idylla IDH1-2 mutation assay (Biocartis) pour la détection des variants hotspots des gènes IDH1 et IDH2.

Méthodes :

Nous avons sélectionné rétrospectivement 70 échantillons fixés au formol de tumeurs solides (32 G, 7 CS, 30 CC, 1 SPBC) et 36 extraits d'ADN de moelle osseuse de patients avec une LAM dont le statut mutationnel IDH a été précédemment déterminé par technique(s) NGS +/- IHC au cours de la routine clinique. La technique Idylla IDH1-2 mutation assay a été réalisée en utilisant jusqu'à quatre coupes tissulaires (minimum 10 % de cellules tumorales) ou 50 µL d'une solution avec ≥ 10 ng/µL d'ADN extrait comme recommandé par le fabricant. La limite de détection et la robustesse de la technique ont ensuite été évaluées à l'aide de standards de référence commerciaux dilués.

Résultats :

Au total, 98,1% des résultats étaient valides avec la PCR automatisée Idylla. La concordance globale, la sensibilité et la spécificité de la technique était de 97,1%, 96,2% et 98,1% respectivement comparativement aux approches NGS de référence. Lors d'une analyse en sous-groupe, il apparaît que ces 3 paramètres sont tous ≥ 95% quel que soit le type tumoral considéré. En plaçant directement des coupes de tissus dans la cartouche Idylla, 39,7 % des cas présentaient une amplification suboptimale des régions contrôles (valeurs de Cycle de Quantification (Cq) > 35) associée à un risque de ne pas détecter les variants à faible fréquence allélique. A l'inverse, l'utilisation d'ADN extrait aux quantités recommandées par le fournisseur a abouti dans tous les cas à une amplification optimale de l'ADN pour la détection de variants. La limite de détection de la technique Idylla IDH1-2 mutation assay est de 1,6% et 0,5% pour la détection des variantes IDH1 R132H et IDH2 R172K respectivement.

Conclusion :

La technique Idylla IDH 1-2 mutation assay représente une alternative rapide et fiable pour détecter les variants hotspots IDH dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes à partir de coupes de tissus ou d'ADN extrait. Une attention particulière est cependant nécessaire pour l'interprétation des cas avec un Cq des régions contrôles supérieur à 35, pour lesquels il existe un risque de faux négatif.

Mots clés : isocitrate déshydrogénase, PCR, NGS, variants hotspots



ABSTRACTS

SESSION 6

BIOMARQUEURS

Isolement, caractérisation et impact des petites vésicules extracellulaires issues de cellules tumorales infectées par HPV16

Auteurs : Sergen Arslan ¹, Sylvie Fauconnet ^{1,2,3}, Alexandre Barbaud ¹, Laure Avoscan ⁴, Marion Tissot ⁵, Carmen Garrido ⁶, Jessica Gobbo ⁷, Isabelle Lascombe ¹

1. Université de Franche-Comté, Laboratoire SINERGIES, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, F-25000 Besançon, France
2. CHU Besançon, Service Urologie, Andrologie et Transplantation Rénale, F-25000 Besançon, France
3. CHU Besançon, Centre Investigation Clinique, Inserm CIC 1431, F-25000 Besançon, France
4. Université de Bourgogne, Institut Agroécologie, CNRS, INRAE, DImaCell Imaging Resource Center, F-21000 Dijon, France
5. Université de Franche-Comté, EFS, INSERM, UMR RIGHT, DImaCell Imaging Resource Center, F-25000 Besançon, France.
6. INSERM 1231, Label Ligue National Contre le Cancer et Label d'excellence LipSTIC de Dijon; Early Phase Unit INCa CLIP, Centre Anti-Cancer Georges-François Leclerc, F-21000 Dijon, France.
7. Université de Bourgogne, Faculté de médecine, INSERM U1231, Label LipSTIC et Ligue Nationale contre le Cancer, Centre de lutte contre le cancer Georges François Leclerc, F-21000 Dijon, France

Introduction :

Les cellules tumorales sécrètent de petites vésicules extracellulaires (pVE) d'origine endosomale qui se retrouvent dans les fluides biologiques. Ces pVE sont impliquées dans les différentes étapes de la progression tumorale en délivrant leur contenu interne (acides nucléiques, protéines, lipides) aux cellules normales réceptrices modifiant ainsi leur phénotype et leurs propriétés. Dans les cellules infectées par le papillomavirus humain de type 16 (HPV16), responsable du cancer du col de l'utérus, l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte, induit l'expression continue et dérégulée des oncoprotéines virales E6/E7, conduisant à l'immortalisation des cellules, à la transformation et au maintien du phénotype transformé. De plus, la présence du virus augmente le nombre et modifie la composition des pVE issues de ces cellules influant sur le comportement des cellules cibles. C'est pourquoi l'un de nos objectifs de recherche est de comprendre le rôle des pVE provenant de cellules infectées par HPV dans la carcinogenèse du col de l'utérus. A ce jour, le rôle de ces pVE est peu documenté.

Méthodes :

I) Isolement par ultracentrifugation différentielle des pVE issues de cellules (HPV16+). II) Caractérisation par Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), microscopie électronique à transmission (MET) et western blotting des pVE isolées. III) Recherche de la présence de matériel viral (ADN, transcrits, protéines) dans les pVE par PCR, RTqPCR et western blotting. IV) Observation par microscopie confocale de l'interaction des pVE (HPV16+) avec des cellules HPV négatives. V) Analyse par Incucyte de l'effet des pVE sur la prolifération des cellules réceptrices.

Résultats :

Après isolement par ultracentrifugation différentielle de particules issues de surnageants de culture de cellules Ca Ski infectées par HPV16, l'analyse par NTA a déterminé une concentration de 109 particules/ml avec un diamètre des particules inférieur à 200 nm correspondant à celui des pVE. L'observation par MET a confirmé la présence de particules de taille similaire aux pVE et montré que ces vésicules avaient une morphologie arrondie avec une membrane intègre. L'identification de marqueurs associés aux pVE (CD9, CD63, CD81) a confirmé l'enrichissement en pVE des fractions isolées par ultracentrifugation. La présence de transcrits des oncogènes viraux e6/e7 à l'intérieur des pVE a été détectée et l'internalisation des pVE, marqués à la fluorescence, dans des cellules HPV négatives a été observée en microscopie confocale. D'ailleurs, dans ces cellules (HPV négatives), les transcrits e6/e7 d'HPV16 ont été retrouvés et de manière intéressante, la mise en contact des pVE HPV16 a conduit à l'augmentation de la prolifération des cellules réceptrices.

Conclusion :

Les cellules HPV16 positives sécrètent des pVE qui augmentent la prolifération de cellules cibles HPV négatives. Les transcrits e6/e7 d'HPV16, présents dans les pVE, sont transmis à ces cellules réceptrices. L'objectif sera alors de déterminer si l'effet prolifératif des pVE est dépendant de l'action des transcrits d'HPV16. In fine, les transcrits détectés dans les pVE HPV16 pourraient être utilisés pour évaluer l'évolution de lésions précancéreuses vers le cancer du col de l'utérus et ainsi établir le rôle pro tumoral des pVE issues de cellules infectées par HPV16.

Mots clés : Petites vésicules extracellulaires ; cancer ; HPV16

Bottle-brush Polymers to Deliver Molecular Glues for Multiple Myeloma

Auteurs : Mainak Banerjee ^{1,2,3}, Pedro Lopez ^{1,2}, Chen Zhu ^{1,2}, Adeline Gasser ^{1,2}, Charline Keller ⁴, Christine Carapito ^{2,4}, Waygen Thor ³, Loïc Charbonnière ³ and Alexandre Detappe ^{1,2,3}

1. Institut de Cancérologie Strasbourg Europe;
2. Strasbourg Drug Discovery and Development Institute;
3. Équipe de Synthèse Pour l'Analyse, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg;
4. LSMBO-Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique

Introduction :

Among the different types of cancer, Multiple Myeloma (MM), a complex and heterogeneous blood disease, is largely characterized by a drastic proliferation of plasma cells in the bone-marrow leading to severe mortality.¹ Current regimen of MM treatment is lacking satisfactory therapeutic response and no absolute therapy has been enforced in spite of promising preclinical and clinical efficacy by novel protein degraders, bi-specific monoclonal antibody, antibody-drug conjugates (ADCs), and chimeric antigen receptor (CAR) T-cell. The targeted destruction of proteins (TPD) responsible for thriving in cancer by low molecular weight cereblon (CRBN) binding E3-ligase-modulating drugs or heterobifunctional ligands such as proteolysis targeted chimeras (PROTAC) have proved to be highly encouraging for the therapy of MM and other cancers. Towards TPD, the preclinical outcomes of small molecules as CC-885 and clinical advance of CC-90009 is highly promising as an alternative strategy for MM.²⁻³

However, to date, the poor pharmacokinetic (PK) properties of this novel class of molecule and their large side effects limit them to further clinical translation. Overall, the clinical translation of protein degrader drugs is inhibited by several challenges including: i) optimization of the PK properties and ii) management of the off target biodistribution of each molecule leading to undesired toxicity. Certainly, there is a compelling need to design new strategy to reduce side effects associated with these drugs.

Here, we sought to develop a polymeric strategy for delivery of molecular glues to improve their therapeutic window while improving the PK profile and tumor uptake. We report the development of a deliverable novel molecular glue (MB-276) with high binding affinity for GSPT1 as predicted by docking experiment (Fig.1 A). By post-functionalization to a bottlebrush polymer platform (BBP@GSPT1), we demonstrated high selectivity and potential in vitro therapeutic effect against MM cell lines (Fig.1 B-C). The chemical grafting of molecular glues into the bottlebrush polymer helps to achieve improved BD/PK and to enhance the specificity of the drug delivery into the tumor without altering the therapeutic efficiency of the degraders. We expect that this strategy will advance the current preclinical regimen of MM cure but also provide novel insights on polymeric delivery of molecular glues.

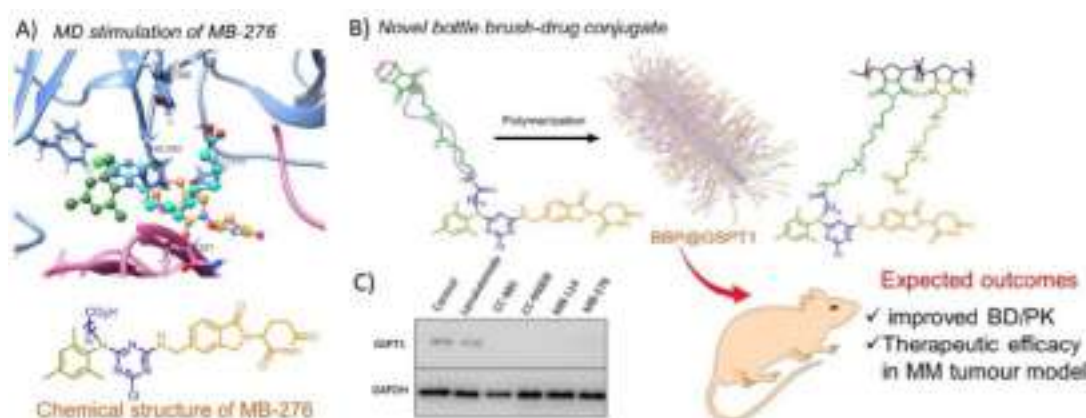


Figure1: Molecular docking (MD) simulations and chemical structure (top & bottom) of deliverable molecular glue MB-276 (A); synthetic scheme to obtain statistical bottle-brush polymer (BBP@GSPT1) of MB-276 (B); western blot experiment to assess GSPT1 degradation by 1 μM of CC-885, CC-90009 and MB-276 in KMS12-BM cell.

Keywords: targeted destruction of proteins (TPD); Multiple Myeloma (MM); delivery; polymer

References:

1. A. J. Cowan et al. JAMA Oncol. 2018, 4, 1221-1227
2. M. E. Matyskiela et al. Nature 2016, 535, 252-257
3. C. Surka et al. Blood 2021, 137, 661-677

Ultrasonication-Driven Advances in MnO₂ Nanomaterials: Unlocking New Horizons for Cancer Treatment

Auteurs : Mahran Bechetnia ^{1,2}, Julien Boudon ¹, Céline Mirjolet ³, Latifa Bergaoui ², Nadine Millot ¹

1. Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS/Université de Bourgogne, Dijon, France
2. Carthage University, National Institute of Applied Sciences and Technology, EcoChimie Laboratory, Tunis, Tunisia
3. Department of Radiation Oncology, Centre Georges François Leclerc, UNICANCER, Dijon, France

Introduction :

This study explores the transformative impact of ultrasonication on MnO₂ nanosheets, particularly in terms of their morphology, structure, texture, surface properties, and stability. The primary aim is to compare the effectiveness of two MnO₂ forms—nanosheets and nanofibers—in advancing cutting-edge biomedical applications, with a focus on oncology. Specifically, we investigate their ability to enhance tumor microenvironment oxygenation, increase oxidative stress in cancer cells via the generation of reactive oxygen species (ROS), and serve as efficient vectors for targeted radiotherapy (RT) and improved MRI contrast. These findings could open new avenues for more effective cancer treatment strategies.

Méthodes :

MnO₂ nanosheets were synthesized and subjected to various ultrasonication durations. Structural and morphological changes were analyzed using Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray Diffraction (XRD), Raman Spectroscopy, and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Surface and size changes were measured via Dynamic Light Scattering (DLS) and Brunauer-Emmett-Teller (BET) analysis. The colloidal stability of nanosheets was assessed in water and high-ionic-strength environments (NaCl 0.15 mol·L⁻¹, phosphate-buffered saline). MTS dose-dependent cytotoxicity tests were conducted on TSA, 4T1, and NIH3T3 cell lines, relevant to oncology research.

Résultats :

Ultrasonication led to the transformation of agglomerated nanosheets into exfoliated and nanofiber forms, as observed by TEM. XRD and Raman analyses revealed structural modifications, while BET results showed an increase in surface area, and DLS indicated reduced hydrodynamic size. XPS analysis confirmed surface oxidation changes. Colloidal stability improved in water but decreased in simulated biological environments. The MTS cytotoxicity tests demonstrated significant dose-dependent effects, with nanofibers showing higher toxicity on cancer cell lines, indicating their potential for oncology applications.

Conclusions :

Ultrasonication profoundly impacts the morphology, structure, texture, surface properties, and stability of MnO₂ nanosheets. These changes are crucial in shaping their interaction with biological systems, particularly in oncology, where tailored nanomaterials can enhance therapeutic efficacy. The control of these parameters is essential for optimizing their biomedical use.

Mots clés : MnO₂, nanosheets, nanofibers, ultrasonication, oncology, cytotoxicity, colloidal stability

Size-dependent toxicity of PTX/Gold co-loaded PLGA Formulations in 2D and 3D murine models of glioma

Auteurs : Wassim EL BASSET ^{1,2,4}, Asli GOCTU ^{1,2}, Gautier LAURENT ^{1,2}, Yann PELLEQUER ¹, Brice MOULARI ¹, Claire CHRETIEN ¹, Céline MIRJOLET ³, Mona DIAB-ASSAF ⁴, Stéphane ROUX ², Arnaud BEDUNEAU¹

1. Université de Franche-Comté, EFS, INSERM, UMR RIGHT, F-25000 Besançon, France ;
2. Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249 CNRS, Université de Franche-Comté ;
3. Department of Radiation Oncology, Unicancer - Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Dijon.
4. EDST, Pharmacology and Cancerology Laboratory, Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon

Introduction :

The use of nanoparticles in healthcare presents promising prospects for cancer therapy. Among these, gold nanoparticles are employed as radiosensitizers to enhance the effects of radiotherapy due to their ability to absorb ionizing radiation. Additionally, coating them with gadolinium ions, a contrast agent used in MRI, allows for real-time tracking and precise timing of radiotherapy. However, their small size (less than 10 nm) results in rapid systemic elimination via renal excretion, which reduces their therapeutic potential. Embedding them in a biodegradable polymer matrix (PLGA) produces Au@PLGA particles with a size ranging between 100 nm and 200 nm. This size increase helps delay the renal elimination and prolongs their residence time in the tumoral tissue.

In this context, multifunctional gold nanoparticles designed for both therapeutic and diagnostic purposes are developed for the treatment of solid tumors. To combine radiotherapy and chemotherapy, the anticancer agent paclitaxel (PTX) is co-encapsulated with gold nanoparticles within the polymer matrix, forming Au+PTX@PLGA nanoparticles..

Méthodes :

The three formulations were characterized by hydrodynamic diameters of 114 nm, 165 nm, and 197 nm with a narrow size dispersion as showed by a PDI < 0.3. The PTX loading rate ranged from 0.46% w/w to 0.64% w/w. Slight toxicity was observed in the GL-261 murine 2D cell line but not in the 9L cell line after 24 hours of exposure to all three formulations, even at the highest PTX concentration. Interestingly, a significant effect was seen in the 3D models of 9L and GL-261, with more pronounced effects on the latter. The smallest formulations were more toxic, causing more than 80% decrease in viability in both spheroid models at a PTX concentration of 58.5µM.

Résultats :

Après isolement par ultracentrifugation différentielle de particules issues de surnageants de culture de cellules Ca Ski infectées par HPV16, l'analyse par NTA a déterminé une concentration de 109 particules/ml avec un diamètre des particules inférieur à 200 nm correspondant à celui des pVE. L'observation par MET a confirmé la présence de particules de taille similaire aux pVE et montré que ces vésicules avaient une morphologie arrondie avec une membrane intégrée. L'identification de marqueurs associés aux pVE (CD9, CD63, CD81) a confirmé l'enrichissement en pVE des fractions isolées par ultracentrifugation. La présence de transcrits des oncogènes viraux e6/e7 à l'intérieur des pVE a été détectée et l'internalisation des pVE, marqués à la fluorescence, dans des cellules HPV négatives a été observée en microscopie confocale. D'ailleurs, dans ces cellules (HPV négatives), les transcrits e6/e7 d'HPV16 ont été retrouvés et de manière intéressante, la mise en contact des pVE HPV16 a conduit à l'augmentation de la prolifération des cellules réceptrices.

Conclusion :

In conclusion, AuNPs and paclitaxel were successfully co-encapsulated in a PLGA matrix. A toxic effect was observed at high concentrations in both 3D models and only in the GL-261 2D culture. The cytotoxic effect was pronounced with the smallest nanoparticles and was dependent on the glioma cell-line and the spatial organization of cells.

Mots clés :

Gold nanoparticles ; Glioma ; Chemotherapy ; Paclitaxel

A new generation of G-quadruplex binding compounds: from their synthesis to the characterization of their anti-cancer effects

Auteurs : Aurane FROUX^{1,2}, Alessio TERENCE¹, Antonio MONARI³, Giampaolo BARONE¹, Stéphanie GRANDEMANGE²

1. Università di Palermo, Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies Viale delle Scienze, Edificio 17, 90128 Palermo, Italy.
2. Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France.
3. Université Paris Cité and CNRS, ITODYS, F-75006 Paris, France

Introduction :

G-rich sequences in nucleic acid molecules can fold into non-conventional secondary structures, as G-quadruplexes (G4). Those motifs are significantly enriched at key sites along the genome as in genes' promoters, sustaining their crucial role in the regulation of many cellular processes. The identification of G4 in the promoters of numerous oncogenes place those structures as promising therapeutic targets for cancer. In that sense, we developed a transdisciplinary approach to bind and stabilize G4 in cancerous cells, with the aim of finding new selective stabilizers to control cancer progression.

Méthodes :

In this multidisciplinary study, we synthesized 12 new transition metal complexes, derived from the Salphen scaffold, coordinated with Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pd²⁺ and Pt²⁺ metals. DNA-binding behavior was evaluated in solution by spectroscopy techniques, jointly with molecular dynamic simulations. Anticancer activity was investigated in pancreatic and breast cancer cell lines (T3M4, MDA-MB-231 and T47D), by testing the effect on proliferation, viability, and genes expression modulation.

Résultats :

The in-solution studies of the 12 new complexes showed their ability to bind and stabilize G4 structures, exhibiting preferential selectivity for G4 structures over double-stranded DNA. Molecular dynamic results confirmed the stable interaction between the complexes and the kRAS G4, unraveling an unconventional interaction mode, since some molecules bind to the G4 loop. In cancer cells, we confirmed by immunofluorescence assay the ability of the ligands to induce an increase in the G4 number, suggesting the structure stabilization in a cellular environment. Moreover, we showed the ability of our compounds to early downregulate the expression of several G4-driven oncogenes, that could be related to the stabilization of G4s. Based on those promising results, we tested the effect on cell proliferation and viability of cancer cell lines and interestingly showed those molecules can negatively affect such cellular parameters.

Conclusion :

In this study, we brought a large library of new molecules able to specifically stabilize G4s, exhibiting interesting anticancer properties. Further investigations will be conducted to hopefully allow a better understanding of the G4s' role in a cancerous and tumoral environment and bring further therapeutic prospects in cancerology.

Mots clés : G-quadruplexes, Transition metal complexes, Stabilisation, oncogenes downregulation

Drug release of PLGA NPs designed for combining radiotherapy and chemotherapy

Auteurs : Asli GOCTU^{1,2}, Wassim EL BASSET^{1,2}, Gautier LAURENT^{1,2}, Rana BAZZI¹, Céline MIRJOLET³, Stéphane ROUX¹, Arnaud BEDUNEAU²

1. Laboratoire Chrono-environnement – UMR 6249 CNRS-UFC, Besançon
2. UMR RIGHT 1098, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon
3. Département of Radiation Oncology, Unicancer – Georges-François Leclerc Cancer Center, Dijon

Introduction :

Since gadolinium chelate-coated gold nanoparticles (Au@TADOTAGA(Gd)) are designed for combining magnetic resonance imaging (MRI) (gadolinium ions) and radioenhancement capacity (gold), they exhibit a high potential for radiotherapy guided by MRI. But this potential is under-exploited due to a too rapid renal clearance.

For postponing their renal clearance and increasing their tumor retention, the encapsulation of these gold nanoparticles in a large and biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) particles (Au@PLGA) was successfully performed. As a result, circulation time was increased. The influence of the encapsulation of the gold nanoparticles on their tumor retention was studied using single photon emission computed tomography (SPECT). The results collected during this study clearly show the relevance of the encapsulation: gold nanoparticles are retained for a longer time in the tumor when they are encapsulated (>7 days for Au@PLGA vs <1 day for free gold nanoparticles Au@TADOTAGA(Gd)).

Méthodes :

PLGA is also described as an effective carrier of various anti-cancer agents. In this context, we demonstrated that the gold nanoparticles Au@TADOTAGA(Gd) can also be co-encapsulated with paclitaxel (PTX), an anticancer agent. The resulting (AuNP+PTX)@PLGA particles permits to combine chemotherapy with MRI-guided radiotherapy. Such a combination associated to a higher tumor retention of the nanoparticles permits a better control of the tumor growth when tumor are treated by radiotherapy after intratumoral injection of (AuNP+PTX)@PLGA particles.

The efficiency of (AuNP+PTX)@PLGA particles in the control of tumor growth can probably be explained by the release of the therapeutic agents (gold nanoparticles and PTX). If the co-encapsulation is important to master for exploiting the combination of chemotherapy and radiotherapy, the release of the therapeutic agents from PLGA particles is also crucial to understand. For achieving this goal, the release of active species (PTX and gold nanoparticles) was studied in Hepes 10mM at 37°C, pH 7.4 for 3 months with 2 conditions, irradiated nanoparticles and non-irradiated nanoparticles. AuNPs are assayed by atomic absorption spectrometry (AAS) and PTX is titrated by high performance liquid chromatography (HPLC). The degradation of lactic acid is assayed by spectrophotometry with a kit from Megazyme at 340nm.

Résultats :

The study revealed the release of AuNPs between 20 and 30 days after the redispersion in aqueous solution in 3 phases: the burst phase, AuNPs release from PLGA surface; the latency, no release and a progressive release resulting from the degradation of PLGA. The release of PTX also occurs between 20 and 30 days but without the burst phase. The release does not depend on the radiation exposure since no difference between irradiated nanoparticles and non-irradiated nanoparticles was observed.

The study demonstrated that the release of therapeutic agents from PLGA is provoked by the degradation of PLGA: the content of lactic acid, the degradation product of PLGA, increases in the aqueous suspension between D21 and D30.

Conclusion :

In summary, the co-encapsulation of Au@TADOTAGA(Gd) nanoparticles and PTX in PLGA permits both to better exploit the radioenhancing effect of the gold nanoparticles and to better control the tumor growth by combining radiosensitization and chemotherapy thanks to a progressive release of the therapeutic agents from PLGA particles.

Mots-clés : Nanoparticles, Paclitaxel, PLGA, Radiotherapy, Chemotherapy



ABSTRACTS

AUTRES

PK CHARACTERISATION OF S65487 AND ASSESMENT OF VARIABILITY USING PHARMA COMETRICS IN HEALTHY VOLUNTEERS AND PATIENTS WITH CANCER

Auteurs : Burlot Chloé^{1,2}, Riglet François¹, Schmitt Antonin², Fouliard Sylvain¹

1. Institut de Recherches International Servier, France
2. Centre Georges François Leclerc INSERM 1231, Burgundy Franche Comte University, Dijon, France

Introduction :

S65487 is a BCL2 inhibitor in clinical development, with the aim of proposing a new effective treatment for patients with hematological malignancies, in particular acute myeloid leukemia (AML). Three clinical trials, including a microdose study on healthy volunteers [1] and phase I and I/II studies, have been carried out, with respectively 100 µg and from 25 to 1200 mg doses. The aim of this work is to characterize pharmacokinetic (PK) of S65487 on patients with cancer while integrating PK data generated during the microdose study in healthy volunteers and thus to characterize and find mechanistic explanations to the variability's sources between microdose and therapeutic doses.

Méthodes :

Population Pharmacokinetic (pop PK) modeling is used to describe the time-course of drug concentration in each patient through the estimation of typical PK parameters (e.g. drug clearance, volume of distribution) and their associated variability. Data from 5 healthy volunteers were added to a PK model already developed by Servier teams. This model has been developed with data from patients in a phase I and I/II clinical trials, in where the drug is administered intravenously as monotherapy and in combination with azacitidine. Stochastic Approximation Expectation-Maximization (SAEM) algorithm is used to estimate population parameters of this model. Then, to compare microdose study and phase I and I/II studies, PK parameters estimates from each study has been performed to determine the information provided by the microdose study.

Resultats :

Data from the microdose study have been added to the 3-compartment PK model, which describe with a good precision those low-concentration observations. It describes S65 concentrations as a function of time for each patient. Comparison of PK parameter estimates between the microdose study and phase I and I/II studies showed significant differences for clearance (CL) and volume of distribution in the central compartment (V1). CL and V1 are on average respectively 3.5 times greater and 3.2 smaller in the microdose study and with less variability for both parameters.

In order to find sources of these variabilities, several hypotheses have been explored such as the health condition of subjects and potential organ failure, in a first time. In a second time, we focused on the CYP3A4 inhibition activity. In vitro studies have shown that S65 is a strong inhibitor, substrate of CYP3A4 and 70% metabolized by this enzyme. Hence the hypothesis that CYP3A4 inhibition activity is dependent on S65 concentration. In the microdose study, at very low concentration, CYP3A4 inhibition may be null or very low, resulting in a higher CL value than at high concentrations, where CYP3A4 activity would be inhibited and CL lower. This hypothesis can be verified by developing competitive inhibition and mechanism-based inhibition (MBI) models with an effect on CL [2-3]. Moreover, target-mediated drug disposition (TMDD) with its saturation of target at low doses, also present in small molecule, have been shown to be a possible source of non-linearity[4]. This hypothesis can also be an explanation in the difference of CL estimates.

Conclusion :

These pharmacometrics analyses will enable us to characterize the PK of the drug, investigate sources of variability, and participate in its development to support bringing it to patients.

Références :

- [1] Y. Sugiyama et S. Yamashita, « Impact of microdosing clinical study — Why necessary and how useful? », Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 63, no 7, p. 494-502, juin 2011, doi: 10.1016/j.addr.2010.09.010.
- [2] S. Zhou et al., « Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs », Clin. Pharmacokinet., vol. 44, no 3, p. 279-304, 2005, doi: 10.2165/00003088-200544030-00005.
- [3] B. Punyawudho et al., « Characterization of the Time Course of Carbamazepine Deinduction by an Enzyme Turnover Model », Clin. Pharmacokinet., vol. 48, no 5, p. 313-320, mai 2009, doi: 10.2165/00003088-200948050-00003.
- [4] T. Burt et al., « Phase 0/microdosing approaches: time for mainstream application in drug development? », Nat. Rev. Drug Discov., vol. 19, no 11, p. 801-818, nov. 2020, doi: 10.1038/s41573-020-0080-x.

Population pharmacokinetics modelling in real-life abemaciclib-treated patients: A comparison of predictive performance of two published population PK models

Auteurs : Marylise STERLÉ^{1,2,3}, Bernard ROYER^{3,4}, Coureche KADERBHAI⁵, Silvia ILIE⁵, Isabelle DESMOULINS⁵, Didier MAYEUR⁵, Manon REDA⁵, Audrey HENNEQUIN⁵, Jean-David FUMET^{2,5}, Leïla BENGRINE- LEFEVRE⁵ and Antonin SCHMITT^{1,2,3}

1. Pharmacy Department, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France
2. INSERM U1231, University of Burgundy Franche-Comté, Dijon, France
3. Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique GPCO
4. Pharmacology and Toxicology Laboratory, CHRU Besançon, Besançon, France
5. Oncology Department, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France – INSERM U1231, UFR des Sciences de Santé, Dijon, France

Background and objectives: S65487 is a BCL2 inhibitor in clinical development, with the aim of proposing a new effective treatment for patients with hematological malignancies, in particular acute myeloid leukemia (AML). Three clinical trials, including a microdose study on healthy volunteers [1] and phase I and I/II studies, have been carried out, with respectively 100 µg and from 25 to 1200 mg doses. The aim of this work is to characterize pharmacokinetic (PK) of S65487 on patients with cancer while integrating PK data generated during the microdose study in healthy volunteers and thus to characterize and find mechanistic explanations to the variability's sources between microdose and therapeutic doses.

Material and Methods: Population Pharmacokinetic (pop PK) modeling is used to describe the time-course of drug concentration in each patient through the estimation of typical PK parameters (e.g. drug clearance, volume of distribution) and their associated variability. Data from 5 healthy volunteers were added to a PK model already developed by Servier teams. This model has been developed with data from patients in a phase I and I/II clinical trials, in where the drug is administered intravenously as monotherapy and in combination with azacitidine. Stochastic Approximation Expectation-Maximization (SAEM) algorithm is used to estimate population parameters of this model. Then, to compare microdose study and phase I and I/II studies, PK parameters estimates from each study has been performed to determine the information provided by the microdose study.

Results: Data from the microdose study have been added to the 3-compartment PK model, which describe with a good precision those low-concentration observations. It describes S65 concentrations as a function of time for each patient. Comparison of PK parameter estimates between the microdose study and phase I and I/II studies showed significant differences for clearance (CL) and volume of distribution in the central compartment (V1). CL and V1 are on average respectively 3.5 times greater and 3.2 smaller in the microdose study and with less variability for both parameters.

In order to find sources of these variabilities, several hypotheses have been explored such as the health condition of subjects and potential organ failure, in a first time. In a second time, we focused on the CYP3A4 inhibition activity. In vitro studies have shown that S65 is a strong inhibitor, substrate of CYP3A4 and 70% metabolized by this enzyme. Hence the hypothesis that CYP3A4 inhibition activity is dependent on S65 concentration. In the microdose study, at very low concentration, CYP3A4 inhibition may be null or very low, resulting in a higher CL value than at high concentrations, where CYP3A4 activity would be inhibited and CL lower. This hypothesis can be verified by developing competitive inhibition and mechanism-based inhibition (MBI) models with an effect on CL [2-3]. Moreover, target-mediated drug disposition (TMDD) with its saturation of target at low doses, also present in small molecule, have been shown to be a possible source of non-linearity[4]. This hypothesis can also be an explanation in the difference of CL estimates.

Conclusions: These pharmacometrics analyses will enable us to characterize the PK of the drug, investigate sources of variability, and participate in its development to support bringing it to patients.

References: [1] Y. Sugiyama et S. Yamashita, « Impact of microdosing clinical study — Why necessary and how useful? », Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 63, no 7, p. 494-502, juin 2011, doi: 10.1016/j.addr.2010.09.010.

[2] S. Zhou et al., « Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs », Clin. Pharmacokinet., vol. 44, no 3, p. 279-304, 2005, doi: 10.2165/00003088-200544030-00005.

[3] B. Punyawudho et al., « Characterization of the Time Course of Carbamazepine Deinduction by an Enzyme Turnover Model », Clin. Pharmacokinet., vol. 48, no 5, p. 313-320, mai 2009, doi: 10.2165/00003088-200948050-00003.

[4] T. Burt et al., « Phase 0/microdosing approaches: time for mainstream application in drug development? », Nat. Rev. Drug Discov., vol. 19, no 11, p. 801-818, nov. 2020, doi: 10.1038/s41573-020-0080-x.