

ICOS EST FORTEMENT EXPRIMÉ DANS LES LYMPHOMES T CUTANÉS ET SON CIBLAGE PERMET L'INHIBITION DES CELLULES TUMORALES

AMATORE Florent^{1,2,3}, ORTONNE Nicolas⁴, LOPEZ Marc¹,
ORLANDUCCI Florence¹, CASTELLANO Rémy¹, DE CROOS Amandine⁴,
GORVEL Laurent¹, GOUBARD Armelle¹, BOUABDALLAH Réda⁵,
BONNET Nathalie², GROB Jean-Jacques³, GAULARD Philippe⁴,
BAGOT Martine⁶, BENSUSSAN Armand⁷, BERBIS Philippe², et OLIVE Daniel¹

1. Centre de recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM U1068, CNRS U7258, Aix Marseille Université, Institut Paoli - Calmettes, Marseille, France
2. Service de Dermatologie, Aix Marseille Université, APHM, Hôpital Nord, Marseille, France
3. Service de dermatologie et oncodermatologie, Hôpital de la Timone, Aix-Marseille Université, Marseille, France
4. Service d'anatomie et cytologie pathologique, INSERM U955 9, AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, 94220 Créteil, France
5. Département d'hématologie, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France
6. Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, Inserm, U976
7. Université de Paris, INSERM, UMR-976, Institut de Recherche Saint-Louis, Paris, France

auteur correspondant : florent.amatore@ap-hm.fr

doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.107

ICOS IS WIDELY EXPRESSED IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA, AND ITS TARGETING PROMOTES POTENT KILLING OF MALIGNANT CELLS

ABSTRACT

Background: Advanced stage cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs) remain an unmet medical need. Mogamulizumab, anti-KIR3DL2 and brentuximab vedotin (BV), an anti-CD30 antibody–drug conjugate (ADC) coupled to monomethylauristatin-E (MMAE), provided encouraging results but new targeted therapies are needed. Inducible Co-Stimulator (ICOS), a T-cell costimulatory receptor involved in the development of CTCLs, arouses interest.

Methods: We used immunohistochemistry to study ICOS expression in skin biopsies of 23 patients with early-stage mycosis fungoides (MF), 12 with transformed MF (TMF) and 17 with Sézary Syndrome (SS), at diagnosis or in relapse. ICOS expression by circulating Sézary cells and regulatory T cells (Tregs) in patients with SS was evaluated using flow cytometry and compared to healthy donors (HD) lymphocytes. In 5 patients with SS, we also analyzed concomitant biopsies from involved nodes. Then, we investigated the efficacy of anti-ICOS ADCs generated by coupling murine anti-ICOS monoclonal antibodies with MMAE, in comparison to BV. We used ICOS⁺ CTCL cell lines (MyLa and MJ), murine xenograft models with MyLa and ICOS⁺ Patient Derived Xenografts (PDXs) from patients with SS and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL).

Results: ICOS was highly expressed by the cutaneous atypical lymphocytic infiltrates in respectively 61%, 75% and 88% of patients with early-stage MF, TMF and SS, such as in all the involved nodes. ICOS expression by circulating Sézary cells was strong: $69 \pm 7.3\%$ versus $38.8 \pm 7.1\%$ of non-tumoral CD4⁺ cells ($p < 0.009$; CI95%: 8.7-51.6); and $31 \pm 3.2\%$ of CD4⁺ cells in HD ($p < 0.0001$; CI95%: 20.3-46.3). Percentages of ICOS⁺ Tregs were significantly higher in patients with SS than in HD. In CTCL cell lines, we observed a significant dose-dependent decrease in cell viability in the presence of anti-ICOS ADCs. In a mouse xenograft model (MyLa), anti-ICOS ADCs provided a longer overall survival (OS) than BV (HR=15.2; CI95%: 3.2-71.1; $p < 0.0006$). Finally, in ICOS⁺ PDXs anti-ICOS ADCs significantly improved OS, and reduced the number of tumor cells in the blood and bone marrow. No evidence of ADC toxicity was observed in treated mice.

Conclusion: ICOS is a therapeutic target of interest in CTCLs. Our results provide the preliminary basis for a therapeutic trial.

KEY POINTS

ICOS is widely expressed by malignant cells in the skin and blood of patients with CTCL.

Anti-ICOS ADCs have anti-tumor potential against CTCL cell lines and patient derived xenografts.

RESUME

Introduction : Il existe un besoin thérapeutique important pour les formes sévères de lymphomes T cutanés (LTC). Le Mogamulizumab, anti-KIR3DL2 et la brentuximab vedotin (BV), un anticorps anti-CD30 de type *antibody-drug conjugate* (ADC) couplé à la monométhyl auristatine E (MMAE), ne permet que des réponses de courte durée. Inducible Co-Stimulator (ICOS) est un récepteur de costimulation lymphocytaire T impliqué dans le développement des LTC. Notre étude évalue son potentiel en tant que cible thérapeutique.

Matériel et Méthodes : L'expression d'ICOS était évaluée en immunohistochimie dans des biopsies cutanées de 23 patients atteints de mycosis fongoïde (MF) à un stade précoce, 12 de MF transformé (MFT) et 17 de syndrome de Sézary (SS). Les ganglions envahis de 5 patients ayant un SS étaient également analysés.

L'expression d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes et les lymphocytes T régulateurs (Tregs) des patients atteints de SS était évaluée par cytométrie en flux et comparée à des lymphocytes de donneurs sains (DS).

Nous avons ensuite étudié l'efficacité d'ADC anti-ICOS générés par le couplage d'anticorps monoclonaux anti-ICOS avec la MMAE et la pyrrolobenzodiazépine (PBD), et nous les avons comparés au BV. Pour cela, nous avons utilisé des lignées cellulaires de LTC ICOS⁺ (MyLa, MJ et HUT78), une xénogreffe murine (XM) avec la lignée MyLa, et une XM avec des cellules de Sézary issues d'un patient.

Résultats : ICOS était fortement exprimé dans l'infiltrat lymphocytaire tumoral chez respectivement 61%, 75% et 88% des patients atteints de MF, TMF et SS, ainsi que dans les 5 ganglions envahis. Le double marquage révélait que l'expression

d'ICOS était limitée aux lymphocytes T tumoraux. Les lymphocytes T CD8⁺ICOS⁺ du micro-environnement tumoral étaient rares. L'expression d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes était forte : $69 \pm 7,3$ % contre $38,8 \pm 7,1$ % des LT CD4⁺ non tumoraux ($p < 0,009$; IC95%:8,7-51,6) ; et $31 \pm 3,2$ % des LT CD4⁺ de DS ($p < 0,0001$; CI95%:20,3-46,3). Les patients atteints de SS avaient significativement plus de Treg ICOS⁺ que les DS.

Sur les lignées de LTC, les ADC anti-ICOS-MMAE et anti-ICOS-PBD permettaient une diminution significative de la viabilité cellulaire. Dans le modèle de XM avec MyLa, la survie globale (SG) était plus longue dans le groupe ADC anti-ICOS-MMAE que dans le groupe BV (HR=15,2; IC95%:3,2-71,1; $p < 0,0006$). Enfin, dans la XM dérivée de patient, l'ADC anti-ICOS-MMAE améliorait significativement la SG et réduisait le nombre de cellules tumorales sanguines et médullaires. Aucune toxicité des ADC n'a été observée chez les souris traitées.

Discussion : ICOS est une cible prometteuse car elle est exprimée à la fois par les lymphocytes tumoraux et les Treg. Nous rapportons pour la première fois l'expression forte d'ICOS dans les LTC, ainsi que l'efficacité préclinique d'ADC anti-ICOS dans différentes conditions expérimentales. Ces résultats constituent la base préliminaire d'un essai thérapeutique.

POINTS CLÉS

ICOS est fortement exprimé par les cellules tumorales dans la peau et dans le sang des patients atteints de LTCE.

Les ADC anti-ICOS ont une efficacité anti-tumorale puissante dans des lignées de LTCE et de xénogreffes dérivées de patients.

INTRODUCTION

Les lymphomes T cutanés épidermotropes (LTCE) représentent environ deux tiers de tous les lymphomes cutanés primitifs [1]. Parmi eux, le mycosis fongoïde (MF) et sa forme leucémique, le syndrome de Sézary (SS), sont les plus fréquents [1]. Au stade précoce de la maladie (plaques érythémateuses plus ou moins infiltrées), les patients ont un pronostic favorable malgré une importante altération de leur qualité de vie [2]. En revanche, au stade tumoral (nodules parfois ulcérés et douloureux) et ganglionnaire, la survie spécifique à 10 ans n'est que d'environ 40% [2,3]. Enfin, dans les formes les plus avancées, c'est-à-dire le MF érythrodermique (toute la peau est érythémateuse) ou de SS (les cellules tumorales circulent dans le sang), le taux de survie à 5 ans tombe aux alentours de 25% [3].

Le MF et le SS sont tous deux caractérisés par une prolifération monoclonale de lymphocytes T-helper matures dans la peau. Les cellules tumorales du MF sont classiquement CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻, avec une perte fréquente de CD7 [4]. Les cellules de Sézary (lymphocytes malins circulants) sont CD4⁺ CD7⁻, et/ou CD4⁺ CD26⁻, et expriment fréquemment CD158k (KIR3DL2) [5]. Le CD158k est le marqueur le plus sensible pour la détection des cellules de Sézary dans le sang et la peau [6 – 8]. Programmed Death-1 (PD-1) est également exprimé par les cellules T tumorales dans la peau et le sang [9,10], et représente un marqueur utile pour le diagnostic histologique de SS [11]. Cependant, le phénotype des cellules de Sézary varie fortement d'un patient à l'autre [7,12].

Il existe un réel besoin thérapeutique dans les LTCE. Le brentuximab vedotin (BV) [13], un *Antibody-Drug Conjugate* (ADC) anti-CD30 lié à la monométhyl auristatine E (MMAE), n'apporte pas d'amélioration significative du pronostic sur le long terme. Plus récemment, le mogamulizumab [14] (anti-CCR4) et les anti-KIR3DL2 [15] ont donné des résultats encourageants, mais de nouvelles thérapies ciblées sont nécessaires.

Dans la lymphomagenèse, les cellules T tumorales peuvent surexprimer à la fois des récepteurs co-stimulateurs qui leur permettent de survivre, de proliférer et de résister à l'apoptose, et des récepteurs co-inhibiteurs qui sont associés à leur capacité d'échappement à l'immunité anti-tumorale [16,17]. Dans les LTCE, cette double expression de récepteurs inhibiteurs et stimulateurs permet la croissance tumorale [18]. En effet, dans l'épiderme d'une plaque de MF, les cellules T CD4 tumorales et non tumorales expriment un large éventail de récepteurs co-inhibiteurs, tels que PD-1 [18]. Notons d'ailleurs que l'expression de PD-1 à la surface des

cellules tumorales augmente avec la progression de la maladie [19]. De plus, dans une petite cohorte de patients atteints de MF, il a été montré que l'expression d'*Inducible CO-Stimulator* (ICOS) pouvait être retrouvée à différents stades de la maladie [20]. Plus récemment, l'analyse de cultures d'explants épidermiques et dermiques de biopsies cutanées de patients atteints de LTCE a révélé qu'il y avait plus de lymphocytes T ICOS⁺ chez des patients atteints de LTCE que chez des donneurs sains, sans toutefois préciser la nature tumorale ou réactive de ces lymphocytes [18].

ICOS (CD278, AILIM, H4) est un récepteur de co-stimulation lymphocytaire T membre de la superfamille des récepteurs B7/CD28 [21]. Il est positivement régulé sur les lymphocytes T activés (CD4 et CD8 effecteurs, T folliculaires auxiliaires [T_{FH}], lymphocytes T régulateurs [Tregs]). Les cellules T naïves expriment faiblement ICOS mais son expression est rapidement induite après l'engagement du T-Cell Receptor (TCR). Son ligand unique, ICOSL, est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B), et de nombreuses cellules non hématopoïétiques [22]. L'engagement d'ICOS par son ligand induit la prolifération, la survie, la différenciation et la production de cytokines afin de potentialiser la réponse immunitaire spécifique de l'antigène.

L'expression d'ICOS par les cellules tumorales dérivées de lymphocytes T_{FH} est connue depuis une vingtaine d'années [23,24]. Par exemple, les cellules malignes dans le lymphome angio-immunoblastique (AITL) et le syndrome lympho-prolifératif cutané primaire à cellules T CD4⁺ petites à moyennes (PCSM_{TLPD}) expriment fortement ICOS. De plus, les Tregs activés expriment fréquemment ICOS [22], et les Tregs ICOS⁺ ont une plus grande capacité immunosuppressive que les Tregs ICOS⁻ [25]. Récemment, Geskin et al [26] ont mis en évidence que le taux de Tregs était anormalement élevé dans le sang des patients atteints de SS. Enfin, la capacité inhibitrice du mogamulizumab sur les Tregs explique en grande partie son efficacité dans le SS [27].

Ainsi, ICOS est une cible thérapeutique prometteuse du fait de son expression dans plusieurs types de lymphomes T périphériques primitifs (PTCL) agressifs, au premier rang desquels LTCE et AITL. Notre premier objectif était de déterminer l'expression d'ICOS dans la peau de patients atteints de MF et de SS à différents stades de la maladie, et dans le sang de patients atteints de SS. Notre deuxième objectif était d'évaluer l'efficacité d'ADC anti-ICOS sur des lignées cellulaires de LTCE et des modèles de xénogreffes murins.

MATERIELS ET METHODES

Conception de l'étude et population

Nous avons mené une étude prospective multicentrique entre novembre 2017 et octobre 2019. Les patients étaient âgés de plus de 18 ans et ont signé un formulaire de consentement éclairé avant le début de toute procédure liée à l'étude. Le diagnostic de LTCE était réalisé par un clinicien et un pathologiste, tous deux membres du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés (GFELC), selon les critères de la classification 2018 de l'OMS-EORTC [28,29]. Pour que le diagnostic de SS soit confirmé, le patient devait répondre aux critères du groupe B2 de la classification TNMB [29]. Pour les tests fonctionnels, les patients atteints de SS ont été inclus soit lors du diagnostic initial, soit lors d'une rechute clinique et biologique (critères B2). Nous avons exclu les patients sous traitement par immunothérapie ou participant à un essai thérapeutique.

Les échantillons de peau de 52 patients atteints de LTCE au moment du diagnostic (38 patients) ou en rechute (14 patients) ont été obtenus par punch-biopsie de 4 mm sous anesthésie locale, puis fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Des échantillons de peau provenant de 12 patients atteints de lymphome B, 14 de syndrome lymphoprolifératif CD30⁺ (lymphome cutané primitif anaplasique à grandes cellules et papulose lymphomatoïde), 12 de PCSMLPD et 13 d'AITL ont servi de contrôle. Les volontaires sains étaient des donneurs de sang de l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Tous les prélèvements de tissus de patients et l'utilisation à des fins de recherche ont respecté les protocoles approuvés par les comités d'examen et de confidentialité institutionnels de l'Institut Paoli-Calmettes (ICOS-LYMPH-IPC2018003), de l'hôpital Saint-Louis et de l'hôpital Henri-Mondor, conformément à la Déclaration d'Helsinki.

Génération des anticorps monoclonaux

Pour la génération des ADC anti-ICOS, un anticorps murin anti-ICOS IgG1 clone 314.8 purifié généré dans notre laboratoire [30] a été transmis à Levena Biopharma et Concortis Biotherapeutics (San Diego, CA, USA) pour être couplé au MMAE et à la pyrrolobenzodiazépine (PBD). Il s'agit d'un anticorps neutralisant. Le Drug Antibody Ratio (DAR) était de 3,25.

Le BV (anti-CD30-MMAE) et le trastuzumab emtansine (anti-HER2-MMAE) ont été fournis par la pharmacie de notre hôpital.

Culture cellulaire

Nous avons utilisé trois lignées cellulaires de LTCE : MyLa (Pr N. Ortonne, Département de pathologie, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France), MJ (American Type Culture Collection [ATCC], VA, USA) et HUT78 (ATCC). MyLa et MJ sont des lignées cellulaires MF, tandis que HUT78 est une lignée cellulaire SS. Les cellules MyLa et HUT78 ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (FCS), 2 % de L-glutamine, 1 % de pyruvate ; les cellules MJ dans le milieu Iscove modifié Dulbecco (IMDM) (Life Technologies) complété par 20 % de FCS. Les lignées cellulaires de lymphome diffus à grandes cellules B (Daudi, ATCC CCL-213) et de leucémie à cellules T (Jurkat, ATCC TIB-152) ont également été achetées auprès de l'ATCC et ont été cultivées de la même manière que les cellules MyLa et HUT78. La lignée cellulaire Jurkat qui a été transfectée pour exprimer le récepteur ICOS a été nommée Jurkat-ICOS. La lignée cellulaire MyLa transfectée pour exprimer la luciférase (infection avec un vecteur lentivirus exprimant *LUC2*) a été nommée MyLa-Luciférase.

Les xénogreffes dérivées de patients (PDX) de AITL (DFTL 78024V1) et de SS (DFTL 90501V3) ont été obtenues auprès du Dana-Farber Cancer Institute, Boston (MA, USA) [31].

Cytométrie en flux et immunohistochimie

Nous avons utilisé des anticorps anti-ICOS de lapin (anticorps polyclonal de lapin de Spring Biosciences [Abcam, Cambridge, Royaume-Uni] pour l'immunohistochimie, et l'anticorps monoclonal de lapin SP98, Spring Biosciences, avec des anticorps secondaires anti-lapin Alexa488), ainsi que des anticorps de souris contre PD-1 (NAT105, Abcam), CD4 (4B12, Novocastra) (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne), CD8 (C8/144B, Dako) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), et FoxP3 (236A/E7, Abcam) pour les colorations multiplexes, à l'aide d'anticorps secondaires rouge Texas anti-souris, et DAPI pour les colorations nucléaires. Les anticorps étaient utilisés en dilution 1:100. Toutes les expériences de coloration ont été réalisées sur des sections de 3µm d'épaisseur provenant de biopsies de peau et de ganglions fixées au formol et incluses en paraffine, soit manuellement, soit à l'aide du dispositif Bond Max (Leica Microsystems). L'expression d'ICOS et de tous

les autres marqueurs a été notée de manière semi-quantitative et divisée en quatre catégories, en fonction de la proportion de cellules positives au sein de l'infiltrat de cellules T tumorales, sur 10 champs à l'objectif 40, par 2 lecteurs (0 : aucune coloration, faible expression : < 5 %, expression modérée : 5-50 %, forte expression : > 50 %). L'intensité de marquage était équivalente sur toutes les lames de MF et de SS et n'était pas prise en compte pour l'analyse statistique.

Pour la cytométrie en flux et les tests fonctionnels, nous avons utilisé des anticorps anti-ICOS 314.8 générés dans notre laboratoire (pour plus de détails, voir Le *et al* [30]). Les autres anticorps ont été achetés auprès de Beckman Coulter (BC) (Brea, CA, USA), Becton-Dickinson (BD) (Franklin Lakes, NJ, USA), Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Allemagne), et eBioscience (San Diego, CA, USA) : CD45 KO (BC), CD3 percpCy5.5 (BD), CD4 Pacblue (BD), CD7 FITC (BD), CD26 APC (Miltenyi), CD14 APCH7 (BD), CD158e/k PE Vio770 (Miltenyi), CD52 PE (Miltenyi), CD56 APC-Vio770 (Miltenyi), CD19 APC (BD), CD20 PE (BC), CD25 PE-Cf 594 (BD) et FoxP3 FITC (eBioscience).

Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les données brutes générées ont été analysées avec le logiciel DIVA FACS Canto II version 8.0.1.

Essais cytotoxiques fonctionnels

Mesure de la viabilité cellulaire avec alamarBlue™. La viabilité des cellules en présence d'ADC a été mesurée avec de l'amarBlue™ (Biosource, Carlsbad, CA, USA). Après 4 à 5 jours d'exposition des cellules aux ADC, l'amarBlue™ était ajouté. Après 4 heures d'incubation à 37°C, la fluorescence était mesurée par un luminomètre (OPTIMA, BMG Labtech) à une longueur d'onde de 560 nm, comme recommandé par le fabricant.

Mesure de l'internalisation des anticorps avec pHAb Reactive Dyes. Nous avons utilisé un test de colorants réactifs pHAb (Promega) pour évaluer l'internalisation des anticorps anti-ICOS et anti-CD30 dans les lignées cellulaires MyLa, MJ et HUT78. Les colorants pHAb sont non fluorescents à un pH neutre et deviennent hautement fluorescents à un pH acide. Les anticorps ont été liés à des billes magnétiques de protéine G, puis marqués avec le colorant réactif aux amines pHAb. Les anticorps conjugués au pHAb ont ensuite été co-incubés avec les lignées cellulaires pendant 20 heures à 37°C. La fluorescence des anticorps internalisés a été détectée par cytométrie en flux (532 nM, détecteur PE).

Animaux et modèle de xénogreffes

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives françaises pour la manipulation des animaux, les directives ARRIVE et approuvées par le comité d'éthique local (accord n° APAFIS#6069-2016071216263470 v3).

Des souris mâles non obèses diabétiques présentant un déficit immunitaire combiné sévère gamma (NSG/NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgtm1Wjl/SzJ) âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées pour les études sur les souris et ont été obtenues auprès de Charles Rivers (l'Arbresle, France). Les souris ont été hébergées dans des conditions stériles avec de la nourriture et de l'eau stérilisées fournies *ad libitum* et ont été maintenues sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité et sous contrôle de la température et de l'humidité.

Les souris ont reçu des injections sous-cutanées de 8 millions de cellules Myla ou MylaLuc dans du PBS. La croissance tumorale a été suivie en mesurant avec un pied à coulisse numérique et en calculant le volume de la tumeur (longueur \times largeur \times $\pi/6$). Lorsque les tumeurs ont atteint une taille moyenne proche de 100 mm³, les souris ont été randomisées (n=7 par groupe) et utilisées pour déterminer la réponse au traitement. Les traitements par ADC ont été injectés par voie intraveineuse dans la veine caudale. Les ADC BV et anti-ICOS ont été administrés à la même dose (3 mg/kg) et le trastuzumab emtansine à 10 mg/kg. L'analyse de la bioluminescence a été réalisée à l'aide d'un PhotonIMAGER (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France) après ajout de luciférine sans endotoxine (30 mg/kg). Une fois l'analyse terminée, les souris ont été autopsiées et la luminescence des organes a été évaluée. La surveillance quotidienne des souris à la recherche de symptômes de la maladie (volume tumoral >1500 mm³, perte de poids significative, pelage ébouriffé, dos voûté, faiblesse et mobilité réduite) a permis de déterminer le moment où une euthanasie était nécessaire. Les courbes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées à l'aide du test log-rank.

Pour explorer l'efficacité des traitements ADC sur la progression des lymphomes, nous avons utilisé des PDX d'AITL (DFTL 78024V1) et de SS (DFTL 90501V3). Pour chaque PDX, 100 000 à 500 000 cellules provenant des PDX ont été injectées par voie intraveineuse dans la veine caudale de souris NSG sans culture *in vitro* préalable. Lorsque la prise de greffe était authentifiée (cellules hCD45⁺ détectées dans le sang périphérique par cytométrie en flux), les souris étaient traitées de la même manière que celle décrite précédemment.

Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées avec le programme GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un test t non paramétrique non apparié de Student avec un niveau de signification fixé à $p < 0,05$ a été utilisé pour comparer l'efficacité *in vitro* de l'anticorps d'intérêt et de son contrôle. Les analyses d'efficacité groupées ont été réalisées avec un test d'analyse de variance (two-way ANOVA). La CI50 (dose inhibitrice médiane) a été calculée par régression non linéaire. Les courbes de survie *in vivo* ont été comparées à l'aide du test log-rank (Kaplan-Meier).

Déclaration de partage des données

Pour les données originales, veuillez contacter florent.amatore@ap-hm.fr et daniel.olive@inserm.fr.

RESULTATS

ICOS est fortement exprimé par les cellules malignes de la peau des patients atteints de MF et de SS.

L'expression d'ICOS dans les biopsies cutanées de 52 patients atteints de LTCE au moment du diagnostic (38 patients) ou en rechute (14 patients) était évaluée par IHC. Chez 5 patients atteints de SS, nous avons également analysé des biopsies de ganglions envahis (pN3). Nous avons mesuré l'expression de l'ICOS au sein de la population de cellules T tumorales CD3⁺, caractérisée morphologiquement (atypies nucléaires) et phénotypiquement (perte de CD2, CD5, CD7 ; expression de PD-1 pour le SS ; expression de CD30 pour les syndromes lymphoprolifératifs cutanés primitifs CD30⁺).

L'expression d'ICOS était modérée à forte dans l'infiltrat lymphocytaire tumoral chez respectivement 61%, 75% et 88% des patients atteints de MF, MF avancé et SS (**Figure 1A-B**). Comme attendu, ICOS était faiblement exprimé dans les lymphomes B et fortement exprimé dans les PCSMLPD et AITL. De plus, ICOS était exprimé par des lymphocytes atypiques (définis par les caractéristiques nucléaires et phénotypiques classiques) dans les cinq ganglions envahis chez les patients atteints de SS. Ainsi, l'expression d'ICOS augmente avec la progression de la maladie et devient forte et constante dans le SS, tant dans la peau que dans les ganglions.

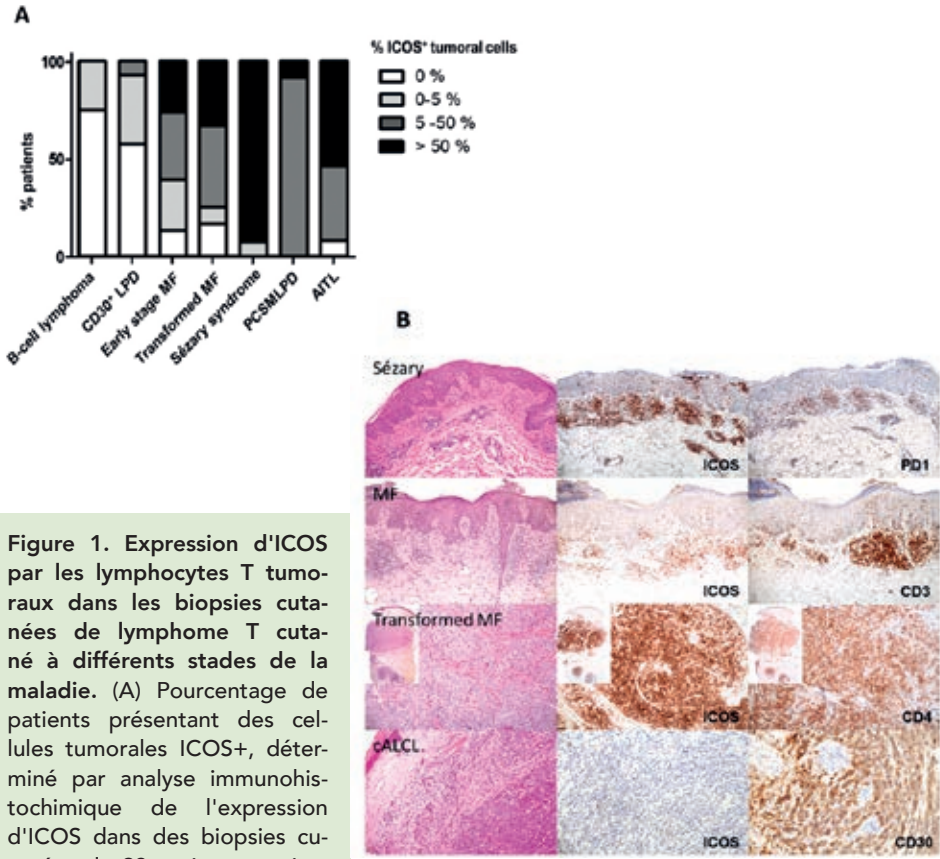
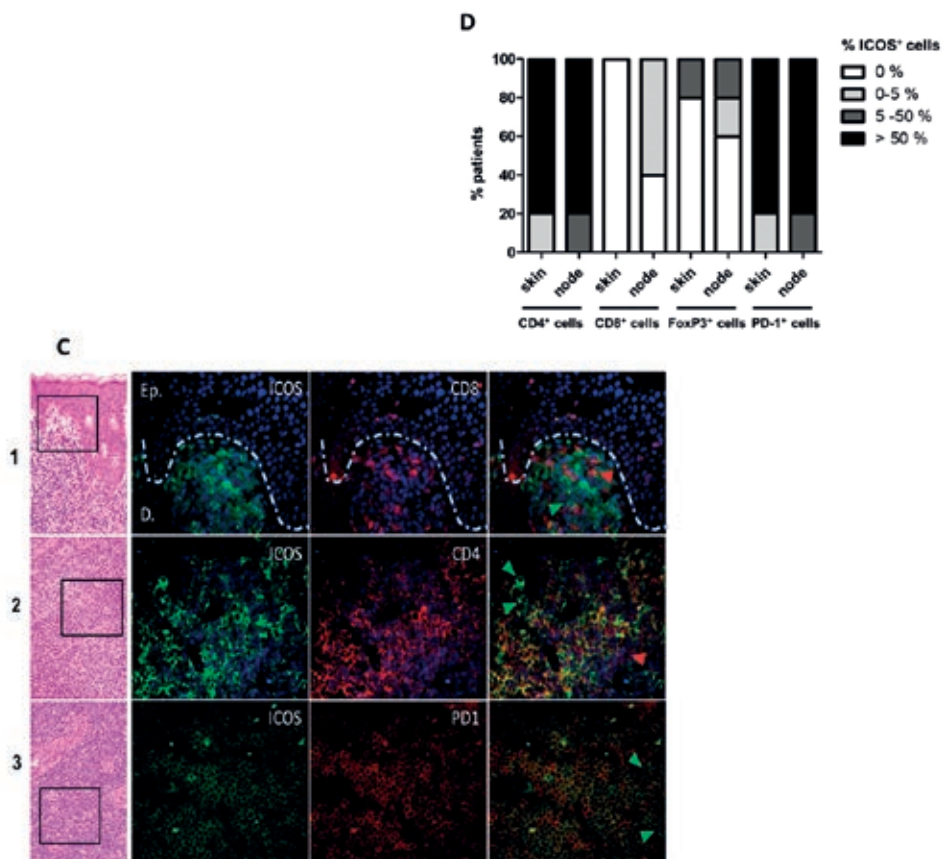


Figure 1. Expression d'ICOS par les lymphocytes T tumoraux dans les biopsies cutanées de lymphome T cutané à différents stades de la maladie. (A) Pourcentage de patients présentant des cellules tumorales ICOS+, déterminé par analyse immunohistochimique de l'expression d'ICOS dans des biopsies cutanées de 23 patients atteints de MF au stade précoce, 12 de MF transformé, 17 de SS, 12 de lymphome B, 14 de LPD CD30+ (lymphome cutané anaplasique à grandes cellules et papulose lymphomatoïde), 12 de PCSM/LPD et 13 d'AITL. Les biopsies de lymphome B ont été utilisées comme témoins négatifs, tandis que les PCSM/LPD et AITL ont été utilisés comme contrôles positifs. (B) Analyse immunohistochimique de l'expression d'ICOS dans les lymphocytes CD3+CD4+ infiltrant l'épiderme ou le derme. (C) Immunofluorescence avec double coloration : anti-souris Texas red et anti-lapin Alexa Fluor 488 comme anticorps secondaires et le 49,6-diamidino-2 phénylindole pour la coloration nucléaire dans les biopsies cutanées (ligne 1) et les ganglions (lignes 2 et 3) de 3 patients différents atteints de SS. Les flèches identifient les cellules exprimant un seul marqueur ; les flèches vertes indiquent les cellules ICOS+, et les flèches rouges indiquent les cellules CD8+ (ligne 2) et les cellules CD4+ (ligne 3). (D) Analyse immunohistochimique en double coloration de biopsies cutanées et de ganglions de 5 patients atteints de SS. Le pourcentage de patients présentant des cellules ICOS+/CD4+, ICOS+/CD8+, ICOS+/FoxP3+ et ICOS+/PD-1+ dans l'infiltrat tumoral cutané et ganglionnaire est représenté. cALCL, « cutaneous anaplastic large cell lymphoma » (lymphome cutané anaplasique à grandes cellules).



Des expériences de doubles marquages ont été réalisées dans des échantillons de peau et de ganglions lymphatiques des cinq patients afin de caractériser davantage l'expression d'ICOS par les cellules T néoplasiques et par le microenvironnement (**Figure 1C**). Nous avons observé que la plupart des cellules T CD4⁺ atypiques (>50 %) exprimaient ICOS, ainsi que la plupart des cellules atypiques PD-1⁺, à l'exception d'un patient dont l'expression d'ICOS était faible à modérée. Chez ce dernier, tous les lymphocytes ICOS⁺ co-exprimaient PD-1. Une forte expression de PD-1 a été retrouvée dans tous les échantillons de peau et de ganglions, et les lymphocytes ICOS⁺ PD-1⁻ semblaient être absents ou très rares (<5%). Seuls très peu (<5%) de lymphocytes T ICOS⁺ CD8⁺ ont pu être identifiés dans le microenvironnement tumoral dans 3 échantillons de ganglions. Peu de lymphocytes T CD4⁺ ICOS⁻ et de lymphocytes Tregs FoxP3⁺ étaient présents dans la peau et les ganglions. Ces Tregs exprimaient faiblement à modérément ICOS (**Figure 1D**). Ainsi, l'expression

d'ICOS semble principalement limitée aux cellules T CD4⁺ néoplasiques, avec de rares cellules T CD8⁺ ICOS⁺ ou Tregs FoxP3⁺ dans le micro-environnement tumoral.

ICOS est fortement exprimé par les cellules malignes dans le sang des patients atteints de SS.

L'expression d'ICOS par les cellules malignes circulantes a ensuite été évaluée par cytométrie de flux. L'expression de KIR3DL2 est rapportée comme étant plus fiable que la perte d'expression de CD7 et CD26 dans le diagnostic et l'évaluation de la charge tumorale sanguine dans le SS [6]. Pour assurer la sélection la plus spécifique des cellules de Sézary, nous avons considéré que les cellules T CD4⁺ KIR3DL2⁺ avec perte de CD7 et/ou CD26 étaient des cellules malignes. La **figure 2A** montre la distribution des populations lymphocytaires chez 13 patients et 12 volontaires sains. Chez les patients, le pourcentage médian de cellules T CD4⁺ malignes (cellules de Sézary) parmi toutes les cellules lymphoïdes était de 53,1 % (35,9-71), ce qui signifie que 64 % de toutes les cellules T CD4⁺ des patients étaient des cellules malignes. Les Tregs (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) représentaient 2 % de l'ensemble des lymphocytes, soit 4,3 % des lymphocytes non tumoraux ; cette proportion était de 3,4 % chez les donneurs sains. En outre, les lymphocytes NK représentaient 2,4 % de tous les lymphocytes chez les patients (5 % des lymphocytes non tumoraux), contre 5,5 % chez les donneurs sains.

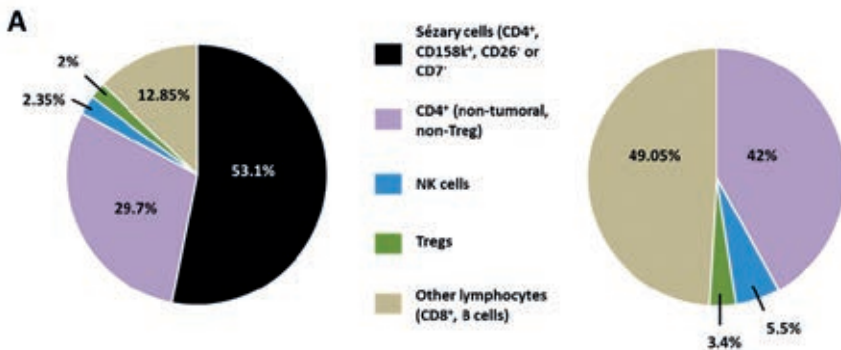
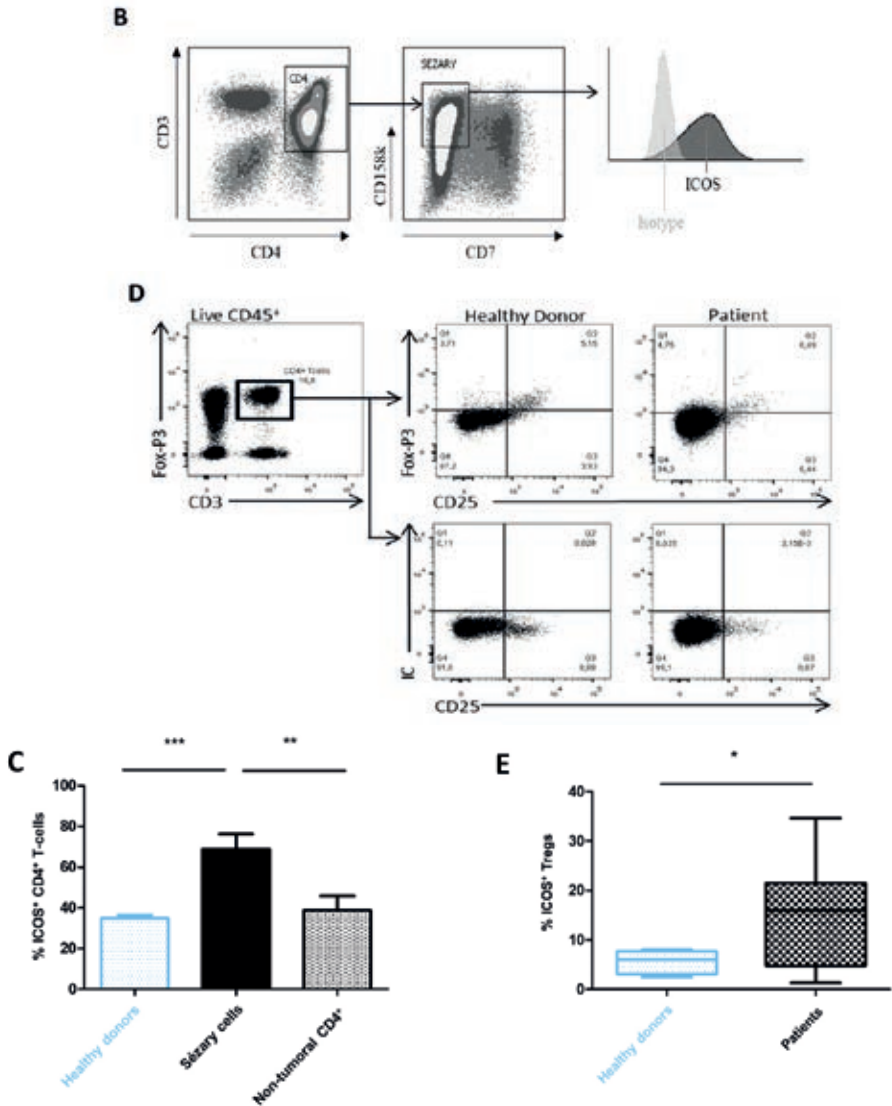


Figure 2. Expression d'ICOS dans les cellules malignes circulantes des patients atteints de SS. (A) Pourcentage des populations de cellules lymphoïdes dans le sang périphérique de 13 patients atteints de SS et de 12 donneurs sains par cytométrie de flux. NK, natural killer. (B) Stratégie de *gating* des cellules de Sézary (CD4+CD158k+CD7-) par cytométrie en flux. (C) Évaluation par cytométrie en flux de l'expression d'ICOS chez des patients atteints de SS et des donneurs sains. Pourcentage de cellules ICOS⁺ parmi les cellules T CD4⁺ de Sézary et les cellules T CD4⁺ non tumorales. Les cellules de Sézary ont été définies comme CD4⁺, KIR3DL2⁺, CD7⁻, ou CD4⁺, KIR3DL2⁺, CD26⁻. Les cellules T CD4⁺



non tumorales sont KIR3DL2-. Environ 70 % des cellules de Sézary expriment l'ICOS, contre 40 % des cellules CD4+ non tumorales des patients et des cellules CD4+ des donneurs sains. Il n'y avait pas de différence significative d'intensité d'expression entre les cellules tumorales et les CD4 sains des patients (données non présentées). (D) Stratégie de sélection des cellules Treg (CD4+FoxP3+CD25+) par cytométrie de flux pour un donneur sain et un patient représentatif. (E) Pourcentage de cellules Treg ICOS+ chez les patients atteints de SS et les donneurs sains. ***P, .001 ; **P, 5.001-.01 ; *P, 5 .01-.05. IC, contrôle isotypique.

L'expression d'ICOS par les cellules tumorales circulantes a été retrouvée chez tous les patients. Cette expression était forte : $69\pm 7,3$ % des cellules tumorales exprimaient ICOS contre $38,8\pm 7,1$ % des cellules CD4⁺ non tumorales chez les patients ($p < 0,009$; intervalle de confiance à 95 % [IC95 %] : 8,654-51,55) ; et $31\pm 3,2$ % des cellules CD4⁺ chez les volontaires sains ($p < 0,0001$; IC95 % : 20,29-46,34) (**Figure 2B**). Chez les patients, $14,4\pm 2,7$ % des Tregs Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ exprimaient ICOS, contre $5,6\pm 1,2$ % chez les volontaires sains ($p=0,04$) (**Figure 2C**).

Les ADC anti-ICOS inhibent les lignées cellulaires MyLa, MJ et HUT78

Nous avons d'abord testé les ADC anti-ICOS sur des lignées cellulaires MF (MyLa et MJ) et SS (HUT78) pour nous assurer de leur fonctionnalité. L'expression d'ICOS était forte sur MyLa (rapport MFI = 143,9) et MJ (rapport MFI = 96) mais faible sur HUT78 (rapport MFI = 4,5). CD30 était fortement exprimé sur les 3 lignées cellulaires (**Figure 3A**).

Nous avons observé une diminution significative et dose-dépendante de la viabilité cellulaire en présence des ADC anti-ICOS-MMAE dans les lignées cellulaires MyLa et MJ (**Figures 3B-C**). Pour la lignée cellulaire MyLa, les ADC anti-ICOS-MMAE avaient une IC50 meilleure mais pas statistiquement différente que celle obtenue avec le BV (respectivement 8,2 ng/ml et 30,6 ng/ml). Pour la lignée MJ, les ADC anti-ICOS-MMAE étaient légèrement moins efficaces que le BV. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps monoclonaux anti-ICOS s'internalisent mieux dans les cellules MyLa, contrairement aux anti-CD30 qui s'internalisent mieux dans les cellules MJ (données non montrées).

Dans les cellules HUT78, BV est moins efficace que dans MyLa et MJ (IC50=251,9 ng/ml) et les ADC anti-ICOS-MMAE ne présentent aucune activité (**Figure 3D**). En effet, la lignée cellulaire HUT78 présente une résistance au MMAE, puisque la CI50 du MMAE libre est respectivement de $8,2\text{e-}007$ μM et $0,001$ μM dans MyLa et HUT78 (données non montrées). Cependant, les ADC anti-ICOS-PBD ont une forte action inhibitrice, ce qui suggère que les ADC anti-ICOS couplés à une drogue adaptée pourraient être efficaces même avec de faibles niveaux d'expression d'ICOS.

Enfin, nous avons évalué la spécificité des ADC en testant les ADC anti-ICOS sur les cellules Jurkat et Jurkat-ICOS (**Figures 3E-F**). Les valeurs IC50 de tous les ADC sont résumées dans la **Figure 3G**.

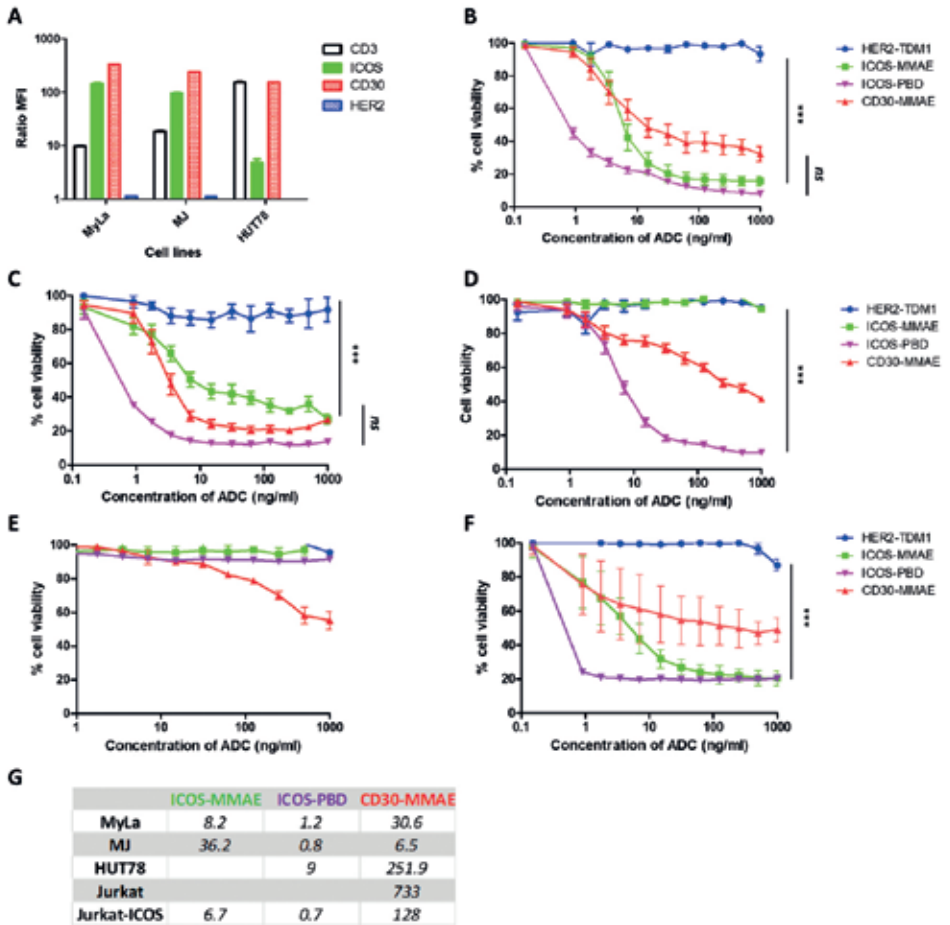


Figure 3. Les ADC anti-ICOS ont une efficacité *in vitro* spécifique sur les lignées cellulaires exprimant ICOS. (A) Immunophénotypage des lignées cellulaires de lymphome T cutané par cytométrie de flux. A noter que l'expression d'ICOS était plus élevée dans les cellules MyLa et MJ que dans les cellules HUT78. (B-F) Pourcentage de viabilité cellulaire dans des concentrations croissantes d'ADC, évaluées avec l'alarmarBlue (moyenne de 16 replicates), sur MyLa (B), MJ (C), HUT78 (D), Jurkat (E), et Jurkat-ICOS (F). Les ADC anti-HER2 ont été utilisés comme contrôle négatif, tandis que les ADC anti-CD30 (BV) ont servi de contrôle positif. (G) Tableau récapitulatif des valeurs IC50 exprimées en ng/ml pour tous les ADC. ***P, .001. ns, non significatif. PBD, pyrrolobenzodiazépine.

In vivo, les ADC anti-ICOS-MMAE sont supérieurs au BV en terme de survie globale et empêchent le développement de métastases

Les souris greffées par voie sous-cutanée avec 8.10^6 cellules MyLa ont été réparties aléatoirement en trois groupes : un groupe ADC anti-ICOS-MMAE, un groupe BV, un groupe ADC anti-HER2 (trastuzumab-emtansine).

Les souris traitées avec les ADC anti-HER2 sont décédées entre le jour J10 et J12. Une diminution rapide du volume tumoral était observée après traitement par ADC anti-ICOS-MMAE ou BV (**Figure 4A**). Les tumeurs sous-cutanées n'étaient plus perceptibles à partir du quinzième jour après la première injection, sans différence significative entre les deux traitements. La tolérance a été excellente, sans aucun signe de toxicité des ADC chez les souris traitées. Fait intéressant, les ADC anti-ICOS-MMAE ont montré une supériorité significative par rapport à la BV en terme de survie globale (**Figure 4B**). La différence entre les deux courbes de survie globale (test de Mantel-Cox log-rank) était significative ($p=0,0006$) avec un hazard ratio de 15,16 (IC95% : 3,2-71,1). La survie médiane dans le groupe BV était de 35 jours et n'a pas été atteinte dans le groupe ADC anti-ICOS.

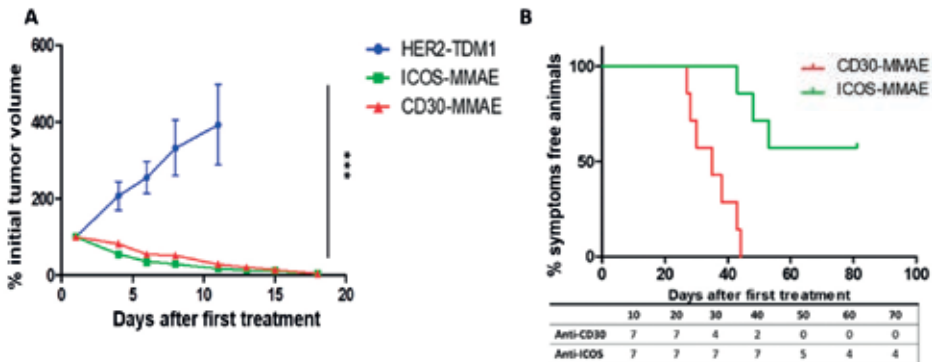
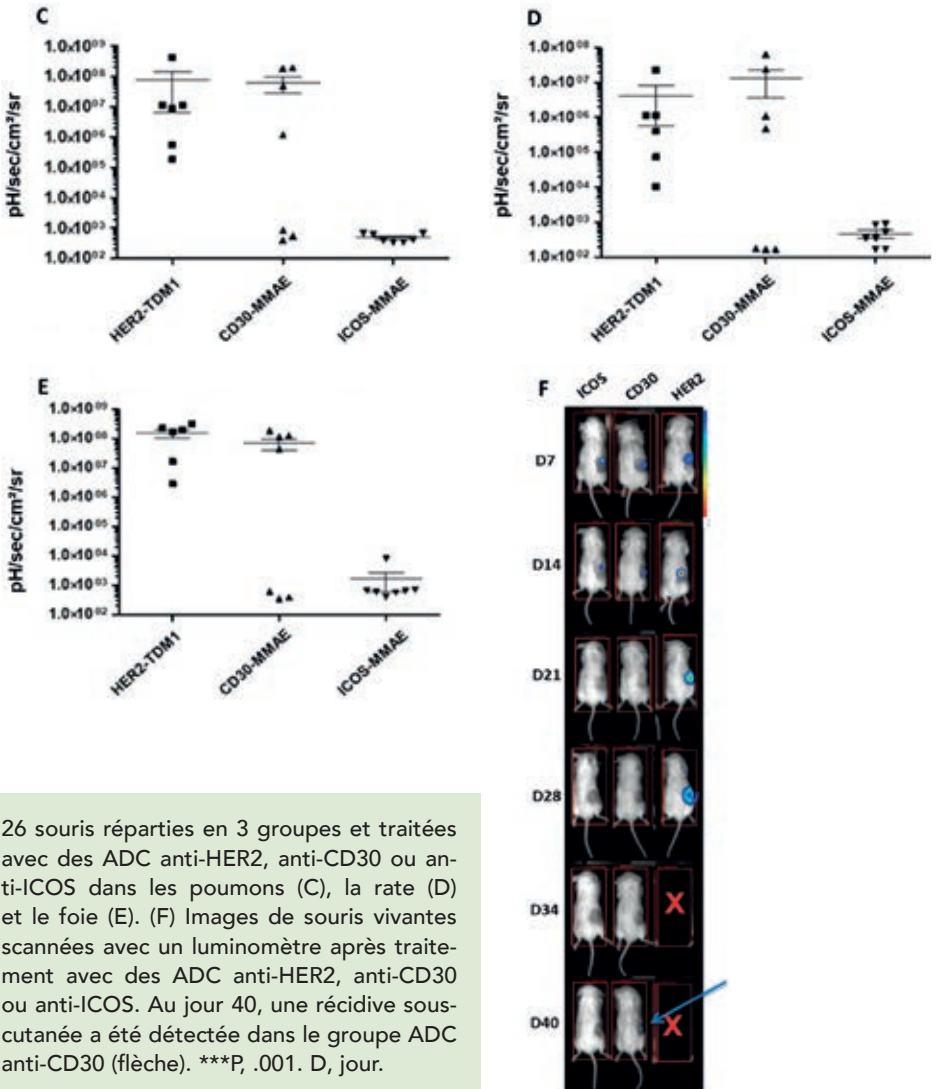


Figure 4. Évaluation de l'efficacité *in vivo* des ADC anti-ICOS-MMAE dans un modèle de xélogreffe murine avec la lignée MyLa. (A) Vingt-et-une souris ont été greffées avec 8×10^6 cellules MyLa chacune, qui ont été injectées par voie sous-cutanée avec 200 μ L de solution saline tamponnée au phosphate et sans matrice de membrane basale. Les souris ont ensuite été réparties aléatoirement en 3 groupes et suivies pour le volume tumoral après 2 traitements d'ADC anti-HER-2, anti-CD30 ou anti-ICOS administrés à 4 jours d'intervalle (jours 10 et 14 après la prise de greffe). (B) Courbes de survie globale (Kaplan-Meier) comparant l'effet des ADCs anti-ICOS et anti-CD30. La différence entre les 2 courbes est significative ($P= 0.0006$). (C-E) Détection des métastases chez

Au cours d'une deuxième expérience, nous avons cherché à suivre le développement des métastases en utilisant des cellules MyLa-Luciférase. Vingt-sept souris ont été greffées et traitées dans les mêmes conditions que lors de la première expérience. A J25, 7 souris de chaque groupe ont été sacrifiées et leurs organes ont été scannés avec le luminomètre pour détecter la présence de métastases. Les



26 souris réparties en 3 groupes et traitées avec des ADC anti-HER2, anti-CD30 ou anti-ICOS dans les poumons (C), la rate (D) et le foie (E). (F) Images de souris vivantes scannées avec un luminomètre après traitement avec des ADC anti-HER2, anti-CD30 ou anti-ICOS. Au jour 40, une récurrence sous-cutanée a été détectée dans le groupe ADC anti-CD30 (flèche). ***P, .001. D, jour.

autres souris ont été maintenues jusqu'à J40 pour détecter *in vivo* le début de la récurrence sous-cutanée. A J25, toutes les souris du groupe anti-HER2 présentaient des métastases dans les poumons, le foie et la rate. Dans le groupe BV, environ 50% des souris avaient au moins une métastase dans l'un de ces trois organes. Dans le groupe anti-ICOS-MMAE, les organes ne présentaient pas de bioluminescence significative (**Figures 4C-E**). A J40, une récurrence sous-cutanée était perçue *in vivo* chez les souris du groupe BV, alors que les souris du groupe anti-ICOS étaient toujours en rémission (**Figures 4F**).

Les ADC anti-ICOS-MMAE ont une puissante efficacité *in vivo* dans les PDX de lymphomes ICOS⁺.

Pour améliorer la valeur prédictive de notre modèle préclinique, nous avons évalué l'efficacité des ADC anti-ICOS-MMAE dans des PDX ICOS⁺ provenant de patients atteints de SS et d'AITL.

Des cellules de PDX exprimant ICOS provenant de patients atteints de SS ont été injectées par voie intraveineuse à quatorze souris NSG. À J40 après la greffe, nous avons observé une augmentation brutale et rapide du nombre de cellules de Sézary. Nous avons prélevé des échantillons de sang de chaque souris et quantifié le nombre de cellules tumorales circulantes pour répartir uniformément les souris vivantes en deux groupes de 7 souris : le groupe ADC anti-ICOS et le groupe témoin ADC anti-HER2. Quinze jours après le traitement, les souris ont été sacrifiées, et nous avons quantifié le nombre de cellules malignes dans le sang et les organes par cytométrie de flux. Nous avons observé une réduction du nombre de cellules tumorales dans le sang, la moelle osseuse et la rate du groupe ADC anti-ICOS (**Figure 5A-C**). Les ADC anti-ICOS montrent ici une efficacité rapide et significative, ce qui suggère que cette stratégie thérapeutique pourrait être utilisée chez des patients atteints de SS avancé.

Dans une deuxième expérience, des PDX ICOS⁺ provenant de patients atteints d'AITL ont été injectés par voie intraveineuse à des souris NSG. Nous avons ensuite prélevé des échantillons de sang pour détecter les cellules tumorales par cytométrie de flux. Les premières cellules tumorales ont été détectées à J21 après la transplantation, les traitements ont donc commencé à J22. Les souris ont été traitées avec des ADC anti-ICOS, de la vincristine (contrôle positif, avec le même mode d'action que le MMAE), ou une solution saline (NaCl à 0,9 %). La survie médiane dans le groupe contrôle négatif et vincristine était de J67 et J68,

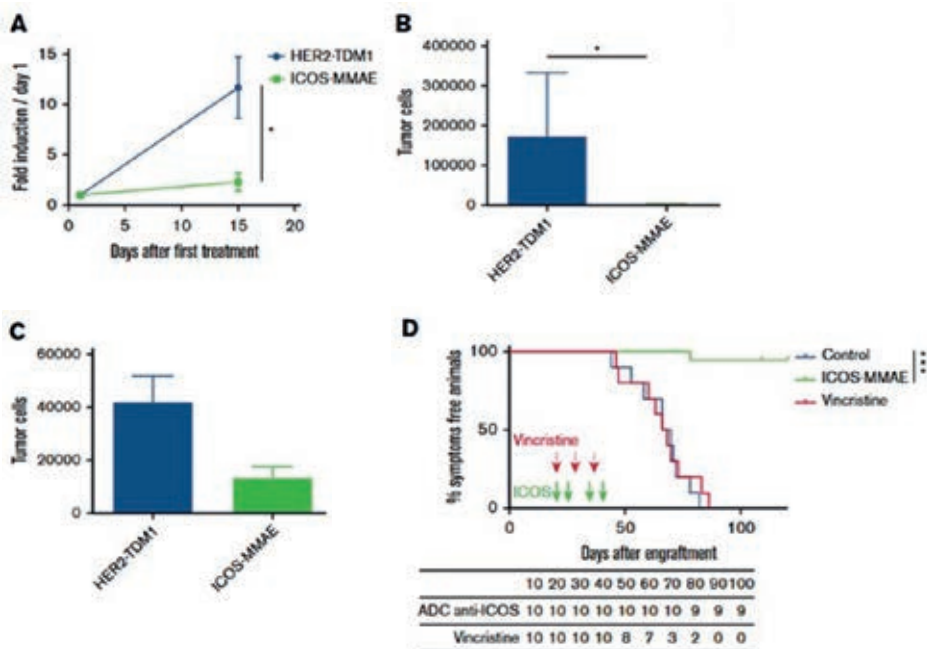


Figure 5. Efficacité *in vivo* des ADC anti-ICOS-MMAE sur des PDX ICOS+. (A-C) Quatorze souris ont été greffées avec 5×10^5 cellules de PDXs provenant d'un patient atteint de SS et divisées en 2 groupes (ADC anti-ICOS-MMAE et ADC anti-HER2 contrôle). Les deux traitements ont été injectés par voie IV aux jours 55, 58, 62 et 65 à une dose de 3 mg/kg. Les souris ont ensuite été euthanasiées au jour 69, et les organes ont été prélevés, dissociés et analysés par cytométrie en flux (dans le sang [A], la moelle osseuse [B] et la rate [C]). (D) Trente souris ont été greffées avec 5×10^5 cellules de PDXs provenant de patients atteints d'AITL et divisées en 3 groupes de 10 souris. Le traitement a commencé le 22^e jour, lorsque les premiers blastes ont été détectés dans le sang (environ 0,2 blaste/mL). L'ADC anti-ICOS et le sérum salin (NaCl 0,9 %) ont été injectés par voie IV aux jours 22, 25, 38 et 43 à une dose de 3 mg/kg. La vincristine a été administrée par voie intrapéritonéale aux jours 22, 29 et 38 à raison de 0,25 mg/kg. *P, 5.01-.05 ; ***P, .001.

respectivement. La survie médiane dans le groupe anti-ICOS n'a pas été atteinte. La survie prolongée des souris traitées par l'ADC anti-ICOS par rapport à celles recevant une solution saline était significative ($p < 0,0001$) (**Figure 5D**). Aucun signe de toxicité de l'ADC n'a été observé chez les souris traitées. À J120, les souris traitées avec les ADC anti-ICOS étaient en rémission complète puisqu'aucun blaste n'était plus détectable (données non présentées).

DISCUSSION

Cette étude présente les résultats de l'efficacité préclinique des ADC anti-ICOS et démontre leur excellent potentiel anti-tumoral dans plusieurs conditions expérimentales complémentaires, dans des PTCL agressifs tels que LTCE et AITL.

Nous rapportons pour la première fois l'expression forte et constante d'ICOS par les cellules de Sézary circulantes, la forme la plus sévère de LTCE. Dans les biopsies cutanées de MF, l'expression d'ICOS semble augmenter avec l'évolution de la maladie. Il est à noter que dans les formes précoces de MF, l'infiltration tumorale est principalement composée de lymphocytes du TME, et que cet équilibre s'inverse dans les formes tardives de la maladie [32].

Le profil d'expression d'ICOS dans le MF et le SS met en évidence son potentiel en tant que marqueur diagnostique supplémentaire pour le LTCE. En effet, certains résultats histologiques nécessaires au diagnostic sont parfois trompeurs dans les premiers stades de la maladie. Les patients atteints de MF ont un risque accru de développer un syndrome lymphoprolifératif cutané CD30⁺ [33], dont l'histologie est proche du MF transformé. ICOS est rarement exprimé par les cellules néoplasiques des lymphomes cutanés anaplasiques à grandes cellules, ce qui pourrait aider à distinguer les c-ALCL des MF transformés.

D'autres études sont nécessaires pour évaluer le potentiel prédictif de l'expression d'ICOS sur l'évolution et le pronostic du LTCE. Dans de nombreux cancers solides, tels que le mélanome [34], le cancer du sein [35] le cancer gastrique [36] et le carcinome rénal à cellules claires [37], l'expression d'ICOS par les Tregs du micro-environnement est associée à un mauvais pronostic. L'impact pronostique d'ICOS n'a pas été évalué dans les hémopathies malignes.

Nous avons montré que les ADC anti-ICOS sont efficaces dans les lignées cellulaires et les PDX de lymphomes exprimant ICOS. On peut s'attendre à ce qu'ils induisent une déplétion des cellules T CD4⁺ malignes et des Tregs, mais aussi des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ non malignes exprimant ICOS. Nous montrons ici que les cellules T CD4⁺ non malignes des patients atteints de SS ne représentent qu'environ 30% de tous les lymphocytes, dont 30-40% expriment ICOS. De plus, les cellules T CD8⁺ représentent moins de 10% des lymphocytes (le rapport CD4:CD8 est classiquement > 10:1 dans le SS). Dans le LTCE, les cellules T CD8⁺ infiltrant la TME sont connues pour être peu cytotoxiques [38]. Ainsi, les mAbs anti-ICOS n'inhiberaient qu'une partie du pool de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, et ces derniers ne sont pas des acteurs efficaces de l'immunité anti-tumorale dans les

LTCE. En outre, nous n'avons identifié que très peu de cellules T ICOS⁺ CD8⁺ dans la TME des échantillons de SS, tant dans la peau que dans les ganglions. Enfin, contrairement à l'alemtuzumab [39] et d'autres thérapies immunosuppressives, les anti-ICOS n'auraient aucun effet toxique sur les lymphocytes NK, qui sont des effecteurs importants de l'immunité anti-tumorale. Il est admis que l'élimination des cellules tumorales associée à la préservation d'un système immunitaire efficace est la clé d'une stratégie thérapeutique efficace [39].

Les Tregs sont une sous-population de cellules T CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ qui empêchent les réponses immunitaires aux auto-antigènes, assurent une immunosuppression et participent ainsi à l'échappement immunitaire des tumeurs. Parmi eux, les Tregs intra-tumoraux ICOS⁺ ont une capacité de suppression plus forte que leurs homologues ICOS⁻ [40]. En sécrétant de l'IL-10 et du TGF-β, les Tregs ICOS⁺ inhibent la plupart des cellules immunitaires innées et adaptatives [41]. Des études portant sur différents types histologiques de cancer ont mis en évidence le nombre important de Tregs dans le sang périphérique et dans la TME des patients [42]. De plus, Le et al [30] ont démontré que les lymphomes B folliculaires génèrent des Tregs *via* la voie ICOS/ICOSL. Ici, un pourcentage significativement plus élevé de Tregs exprimait ICOS chez les patients atteints de LTCE que chez les donneurs sains. Le ciblage d'ICOS induirait une déplétion des Tregs, ce qui pourrait améliorer les profils immunitaires. Dans le LTCE, cette stratégie a été utilisée *via* l'inhibition de CCR4 avec le mogamulizumab, qui induit une cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et une phagocytose (ADCP) des cellules T malignes CCR4⁺ et les Tregs [27].

Contrairement aux anticorps induisant un effet ADCC/ADCP, les ADC agissent directement sur les cellules tumorales ; l'avantage est la rapidité d'action, mais l'inconvénient est une toxicité cumulative liée à la drogue couplée. Les ADC anti-ICOS pourraient être utilisés pour obtenir une rémission complète avant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, ou dans les cas où une manifestation clinique sévère de la maladie nécessite une efficacité rapide. L'optimisation des ADC pour réduire leur toxicité et améliorer leur efficacité est actuellement à l'étude [43,44].

Nos résultats peuvent être étendus au spectre de la variante folliculaire des PTCL et aux AITL. Ceux-ci ont un mauvais pronostic avec une survie globale à 5 ans d'environ 30%, les chimiothérapies actuelles étant inefficaces chez la plupart des patients [45,46]. Ainsi, un essai de phase I évaluant la tolérance d'un anticorps antagoniste anti-ICOS, MEDI-570, chez des patients atteints de PTCL ou d'AITL de variante folliculaire récidivant ou réfractaire a été récemment initié (NCT02520791).

Il existe un réel besoin thérapeutique dans les LTCE et les PTCL T_{FH}. ICOS est une cible thérapeutique prometteuse car elle est exprimée à la fois par les cellules T tumorales et les Tregs. Nos résultats, qui démontrent l'expression forte et fréquente d'ICOS dans les LTCE, ainsi que l'efficacité préclinique des ADC anti-ICOS, sont une base préliminaire pour un essai thérapeutique.

REMERCIEMENTS

L'équipe D.O. est affiliée "Equipe Fondation Recherche Médicale" DEQ20180339209. D.O. est Senior Scholar de l'"Institut Universitaire de France". Les auteurs remercient toute l'équipe "Immunité et Cancer" (CRCM, Marseille) et la plateforme "TrGet" (CRCM, Marseille) pour leur aide technique. Les auteurs remercient « INSERM », « Institut Paoli-Calmettes », « Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer » et « Aix-Marseille Université » pour leur aide financière. Les auteurs remercient les patients et leurs familles.

CONFLITS D'INTERETS :

D.O. est co-fondateur d'ImCheck Therapeutics, Emergence Therapeutics et Alderaan.

M.B. est membre du board scientifique de Takeda.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SWERDLOW SH : The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 2016, **127**(20),2375-90.
2. HWANG ST. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet Lond Engl*, 2008, **371**(9616),945-57.
3. FINK-PUCHES R : Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood*, 2002, **99**(3),800-5.
4. JAWD SI : Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*, 2014, **70**(2),205.e1-16; quiz 221-2.

5. SCARISBRICK JJ : Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990, 2018, **93**,47-56.
6. ROELENS M : Revisiting the initial diagnosis and blood staging of mycosis fungoides and Sézary syndrome with the KIR3DL2 marker. *Br J Dermatol*, 2020, **182**(6),1415-22
7. BAHLER DW : CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sézary syndrome by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, **74**(3),156-62.
8. ORTONNE N : CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*, 2008, **128**(2),465-72.
9. SAMIMI S : Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol*, 2010, **146**(12),1382-88.
10. WADA DA : Programmed death 1 is expressed in cutaneous infiltrates of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Am J Hematol*, 2011, **86**(3),325-27.
11. KLEMKE CD : Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol*, 2015, **173**(1),93-105.
12. MOINS-TEISSERENC H : CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sézary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells. *J Invest Dermatol*, 2015,**135**(1),247-57.
13. PRINCE HM : Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet Lond Engl*, 2017, **390**(10094):555-66.
14. KIM YH : Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2018, **19**(9),1192-204.
15. BAGOT M : IPH4102, a first-in-class anti-KIR3DL2 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory cutaneous T-cell lymphoma: an international, first-in-human, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*, 2019, **20**(8),1160-70.
16. UPADHYAY R : Lymphoma: immune evasion strategies. *Cancers*, 2015, **7**(2),736-62.
17. SCHIETINGER A : Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*, 2014, **35**(2),51-60.

18. QUERFELD C : Primary T Cells from Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Explants Display an Exhausted Immune Checkpoint Profile. *Cancer Immunol Res*, 2018, **6**(8):900-9.
19. NGUYEN GH : Upregulation of inhibitory signaling receptor programmed death marker-1 (PD-1) in disease evolution from cutaneous lymphoid dyscrasias to mycosis fungoides and Sezary's syndrome. *Ann Diagn Pathol*, 2017, **28**,54-9.
20. BOSISIO FM : Expression of T-follicular helper markers in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides and other primary cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Dermatopathol*, 2015, **37**(2),115-21.
21. AMATORE F : Inducible Co-Stimulator (ICOS) as a potential therapeutic target for anti-cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, **22**(4),343-51.
22. AMATORE F : Role of Inducible Co-Stimulator (ICOS) in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, **20**(2),141-50
23. MARAFIOTI T, PATERSON JC, BALLABIO E, et al. The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. *Haematologica*, 2010, **95**(3),432-39.
24. BUONFIGLIO D : Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eur J Immunol*, 1999, **29**(9),2863-74.
25. DOWNS-CANNER S : Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17AnegFoxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun*, 2017, **8**,14649.
26. GESKIN LJ : Therapeutic reduction of cell-mediated immunosuppression in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Cancer Immunol Immunother Cll*, 2018, **67**(3),423-34.
27. NI X : Reduction of regulatory T cells by Mogamulizumab, a defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 antibody, in patients with aggressive/refractory mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2015, **21**(2),274-85.
28. WILLEMZE R : The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*, 2019, **133**(16),1703-14.
29. OLSEN EA : Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 2011, **29**(18),2598-607. doi:10.1200/JCO.2010.32.0630

30. LE K-S : Follicular B Lymphomas Generate Regulatory T Cells via the ICOS/ICOSL Pathway and Are Susceptible to Treatment by Anti-ICOS/ICOSL Therapy. *Cancer Res*, 2016, **76**(16),4648-60.
31. TOWNSEND EC : The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell*, 2016, **29**(4),574-86.
32. RUBIO GONZALEZ B : Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr Opin Oncol*, 2016, **28**(1),88-96.
33. VERGIER B : Statistical evaluation of diagnostic and prognostic features of CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 65 cases. *Am J Surg Pathol*. 1998, **22**(10),1192-202.
34. NELSON MH, : The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. *J Immunol Baltim Md 1950*, 2015, **194**(4),1737-47.
35. FAGET J : ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer Res*, 2012,**72**(23),6130-41.
36. NAGASE H : ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori. *Int J Cancer*, 2017, **140**(3),686-95.
37. GIRALDO NA :Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2017, **23**(15):4416-28.
38. ILIADIS A : The cellular microenvironment and neoplastic population in mycosis fungoides skin lesions: a clinicopathological correlation. *Eur J Dermatol EJD*, 2016, **26**(6):566-71.
39. MARIE-CARDINE A : IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res*, 2014, **74**,6060-70.
40. WALLIN JJ : Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J Immunol Baltim Md 1950*, 2001, **167**(1),132-39.
41. KLINGENBERG R : Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8+ T cells *in vitro*. *Eur J Immunol*, 2005, **35**(6):1712-21.
42. SCHENK AD : Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*, 2009, **9**(1),64-73.
43. DAN N : Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Chemistry to Clinical Implications. *Pharm Basel Switz*, 2018, **11**(2).

44. KHERA E : Pharmacokinetic and Immunological Considerations for Expanding the Therapeutic Window of Next-Generation Antibody-Drug Conjugates. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*, 2018, **32**(5):465-80
45. LEMONNIER F : Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*, 2012, **120**(7):1466-69.
46. MOURAD N : Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood*, 2008, **111**(9):4463-70.