



Analyse de l'infiltration immunitaire et conséquences thérapeutiques potentielles dans les cancers du rectum traités par radiochimiothérapie néoadjuvante

Carine El Sissy

► To cite this version:

Carine El Sissy. Analyse de l'infiltration immunitaire et conséquences thérapeutiques potentielles dans les cancers du rectum traités par radiochimiothérapie néoadjuvante. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01727920

HAL Id: dumas-01727920

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01727920>

Submitted on 9 Mar 2018

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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

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

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2017

N° 112

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINEAnalyse de l'infiltration immunitaire et conséquences thérapeutiques
potentielles dans les cancers du rectum traités par
radiochimiothérapie néoadjuvantePrésentée et soutenue publiquement
le 28 juin 2017

Par

Carine EL SISSY

Née le 26 décembre 1987 à Suresnes (92)

Dirigée par M. Le Professeur Franck Pages, PU-PH

Jury :

M. Le Professeur Éric Tartour, PU-PH Président

M. Le Professeur Olivier Adotevi, PU-PH

M. Le Professeur Dominique Bellet, PU-PH

M. Le Professeur Jean-Pierre Gérard, PU-PH

M. Le Professeur Guy Gorochoy, PU-PH

Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

« N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès.
Essayez de devenir un homme qui a de la valeur. »
Albert Einstein, 1879-1955

REMERCIEMENTS

À l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que la recherche est un travail d'équipe. Je n'aurais jamais pu mener ce travail à terme sans toutes les personnes qui m'ont accompagnée et que je tiens à remercier chaleureusement.

Dans un premier temps, j'aimerais remercier tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse.

Monsieur le Professeur Eric Tartour,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime. Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'accordez en me donnant l'opportunité de rejoindre votre équipe pour mon futur assistantat.

Monsieur le Professeur Olivier Adotevi,

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude la plus sincère.

Monsieur le Professeur Dominique Bellet,

Vous me faites l'honneur d'évaluer ma thèse, soyez assuré de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Gérard,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect. Merci pour notre collaboration scientifique très enrichissante.

Monsieur le Professeur Guy Gorochov,

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon respect. Je garde un très enrichissant souvenir de mon passage à la Pitié-Salpêtrière.

J'aimerais ensuite remercier mon directeur de thèse, le Professeur Franck Pagès, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer mon Master 2 puis cette thèse. Je tiens à vous remercier pour vos judicieux conseils et pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger ce travail. J'aimerais également vous témoigner ma reconnaissance pour votre disponibilité et votre soutien. Merci de m'avoir transmis le goût de la recherche et communiqué votre passion pour l'innovation en immunocancérologie.

Merci aux nombreuses collaborations internationales, sans qui ce travail n'aurait pas pu être mené à bien :

Le Docteur Marc Van Den Eynde (Belgique) pour sa collaboration essentielle dans la réalisation de cette recherche.

La Professeur Habr-Gama et le Docteur Rodrigo Perez (Brésil) pour leur partenariat et l'accès à leurs données cliniques et histologiques.

L'équipe du Pr Scripcariu (Roumanie) et notamment les Docteurs Maria-Gabriela Anitei et Ana Maria Todosi, pour leur collaboration dans ce travail passionnant. Merci pour l'incroyable travail fourni afin de retrouver les biopsies des patients.

Maximilian et le Dr Soledad Iseas et toutes les équipes en Argentine, qui ont accepté de participer à ce projet passionnant. Merci pour votre investissement.

Je tiens également à remercier une nouvelle fois chaleureusement le Professeur Jean-Pierre Gérard (Nice) et son équipe. Merci de m'avoir accueillie à Nice, d'avoir mené à bien la mise en place de l'amendement pour OPERA. J'espère que notre collaboration portera ses fruits.

Je souhaite également remercier tous les laboratoires privés d'anatomopathologie qui ont accepté de rechercher dans leurs archives les biopsies des patients et de nous les envoyer.

Je souhaite également remercier le Docteur Lagorce, du service d'anatomopathologie pour ses relectures instructives des lames de biopsies et de tumeur.

Merci à la plateforme d'Immunomonitoring ainsi que l'équipe INSERM UMRS 1138 :

- Nacilla Haicheur, merci pour tes encouragements et ton soutien au cours de ces années.
- Florence Marliot, merci pour ton aide devant Definiens (et ses innombrables bugs !), courage pour ton EPHE.
- Amos Kirilovsky, merci pour le temps passé à la programmation sur R et ta gentillesse.
- Maximilian, merci de m'avoir aidé dans ce projet, aussi bien avec Definiens qu'avec le recrutement de patients argentins.
- Sarah Church, merci pour ton expertise Nanostring et ta gentillesse.

Je tiens à remercier l'ensemble des techniciens du service d'Immunologie de l'HEGP (Anne, Fabienne, Frédérique, Lydie, Nelly, Pauline, Stéphane) et Paula, merci pour la bonne ambiance tous les jours, pour votre soutien, et pour votre travail.

Je remercie mes parents qui m'ont toujours soutenue et qui ont su éveiller en moi le goût de la médecine. Vous êtes une inspiration.

Mon frère, qui a toujours su être là pour moi, j'espère que ton travail portera ses fruits.

Merci pour votre présence, votre aide, votre soutien et vos conseils.

A ma grand-mère, pour sa joie de vivre.

Alexis, merci pour ta patience et ton amour. Merci de m'encourager dans tout ce que j'entreprends.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	6
TABLE DES FIGURES.....	8
TABLE DES TABLEAUX	9
ABBREVIATIONS	10
Introduction	12
I. Cancer colorectal et cancer du rectum	12
I.1. Épidémiologie.....	12
I.2. Définition anatomique	12
I.3. Clinique	13
I.4 Examens complémentaires	13
I.4.1 Imagerie.....	13
I.4.2 Examens biologiques	14
I.5 Classification anatomopathologique.....	14
I.6 Prise en charge thérapeutique actuelle	15
I.6.1 Cancers du rectum de stades UICC-TNM 0 et I	16
I.6.1.a Exérèse locale chirurgicale	16
I.6.1.b Exérèse extrafaciale du mésorectum ou TME	16
I.6.2 Cancers du rectum de stades UICC-TNM II et III	16
I.7 Nouvelles options thérapeutiques : stratégie de préservation d'organe.	17
I.7.1 Réponse histologique post RCT néoadjuvante	17
I.7.2 « Watch and Wait » : nouvelle approche non chirurgicale ou mini-invasive (tumorectomie) chez les patients en réponse clinique complète.....	19
II. Rôle du système immunitaire dans les cancers	24
II.1. Les débuts de l'immunothérapie	24
II.2. La théorie de l'immunosurveillance	25
II.2.1. Un concept remis en cause et débattu	25
II.2.2. La renaissance du concept d'immuno-surveillance.....	25
II.2.3. La mise à jour du concept d'immuno-surveillance : l'immunoediting.....	26
II.2.3.a. La phase d'élimination	26
II.2.3.b. La phase d'équilibre	28
II.2.3.c. La phase d'échappement	28
III. Rôle de l'infiltrat immunitaire dans le cancer du rectum.....	28
III.1. Effet pronostic des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs).....	28
III.2 Cas du cancer colorectal	30
III.3. Mort immunogène	32
IV. Molécules de co-stimulation inhibitrices	33
IV.1.PD-1 et PD-L1/PD-L2	34
IV.2. LAG3.....	34

IV.3. TIM3	34
V. Place des immunothérapies modulatrices en cancérologie colorectale.....	35
VI. Objectifs de l'étude	37
Matériels et Méthodes	38
I. Cohortes et populations.....	38
II. Immunohistochimie	39
III. Numérisation et quantification de l'infiltrat immunitaire.....	40
IV. Étude de l'expression de gènes, technologie Nanostring	41
V. Analyses statistiques	43
Résultats.....	45
I. Représentativité des populations immunitaires évaluées sur des biopsies de cancer du rectum	45
II. Infiltration immunitaire et prédiction de la réponse à la RCT	46
III. Modifications immunitaires induites par la RCT	49
III.1 Analyses d'expression de gènes immunitaires par la technologie Nanostring	49
III.2 Profil d'expression des gènes associés à une bonne réponse à la RCT	52
IV. Évaluation de la modulation des MCI post RCT	54
V. Infiltrat immunitaire et données de survie	56
V.1 L'infiltrat immunitaire prédit la DFS.....	56
V.2 Combinaison des données immunitaires et de la réponse à la RCT	57
V.2.1. Association données immunitaires et évaluation clinique par imagerie de la réponse à la RCT (ycTNM)	58
V.2.2. Association données immunitaires et évaluation histologique de la réponse à la RCT sur la pièce opératoire (Score de Dworak).....	58
VI- Conséquences thérapeutiques potentielles : stratégie de watch and wait.....	60
Discussion	64
I. Pertinence de l'évaluation immunitaire sur une biopsie	64
II. Importance de l'infiltrat immunitaire initial dans l'évaluation de la réponse au traitement.....	65
III. Impact de la RCT et réponse clinique : induction d'une réponse Th1 cytotoxique et des MCI....	66
IV. Modifications de l'attitude thérapeutique	67
Conclusion et perspectives	68
Annexes.....	70
Bibliographie	72

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : ANATOMIE DU RECTUM	13
FIGURE 2 : CLASSIFICATION TNM DES CANCERS COLORECTAUX.....	15
FIGURE 3 : EXEMPLE DE REGRESSION TUMORALE SELON LA CLASSIFICATION DE DWORAK.	18
FIGURE 4 : THEORIE D'IMMUNOEDITING DES CANCERS OU THEORIE DES 3E (ELIMINATION, EQUILIBRE ET ECHAPPEMENT)..	27
FIGURE 5 : ASSOCIATION DE L'INFILTRAT IMMUNITAIRE ET LE PRONOSTIC DANS DIFFERENTS TYPES DE CANCERS.	29
FIGURE 6 : REPARTITION DES POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES EN FONCTION DU STADE DE LA TUMEUR..	31
FIGURE 7 : DENSITE IMMUNITAIRE ET REPONSE A LA RCT, ETUDE PRELIMINAIRE.....	32
FIGURE 8 : EXEMPLE D'ANALYSE PAR LE LOGICIEL D'IMAGE DEFINIENS.	40
FIGURE 9 : TECHNOLOGIE NANOSTRING.	42
FIGURE 10 : REPRESENTATIVITE DES POPULATIONS IMMUNITAIRE EVALUEE SUR BIOPSIE	45
FIGURE 11 : COMPARAISON DES DENSITES MOYENNES EN LYMPHOCYTES CD3+ ET CD8+ SUR L'ENSEMBLE DE LA ZONE TUMORALE DES BIOPSIES DE PATIENTS NON REPONDEURS (N=35) A LA RCT NEOADJUVANTE (DWORAK 0-1) ET BONS REPONDEURS (N=45) (DWORAK 3-4).	47
FIGURE 12 : COMPARAISON DES DENSITES MOYENNES EN LYMPHOCYTES CD3+ SELON LE STADE YPTNM DES PATIENTS TRAITES PAR RCT.....	49
FIGURE 13 : A- COMPARAISON DU POURCENTAGE D'ARN EXTRAITS SUPERIEURES A 300 NUCLEOTIDES, MESURE SUR PUCE AGILENT POUR DES TUMEURS TRAITES (NOIR) OU NON PAR RCT (GRIS). B- CONCENTRATION D'ARN EXTRAITS EN FONCTION DU STADE DWORAK.	50
FIGURE 14 : : EXPRESSION INTRA-TUMORALE DU NIVEAU DE GENES POUR 32 PATIENTS TRAITES PAR RCT ET 13 PATIENTS NON TRAITES PAR RCT.	51
FIGURE 15 : COMPARAISON DU NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES IMMUNITAIRES ENTRE LES PATIENTS NON REPONDEURS (DWORAK 0-1) ET REPONDEURS (DWORAK 3-4).....	52
FIGURE 16 : MATRICE DE CORRELATION GENEREE CHEZ LES PATIENTS BONS REPONDEURS A LA RCT.....	53
FIGURE 17 : COMPARAISON DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LAG-3 D'UN CANCER DU RECTUM NON TRAITÉ PAR RCT (A : DENSITE= 85/MM ²) ET TRAITÉ PAR RCT (B : DENSITE =226/MM ²).	54
FIGURE 18 : COMPARAISON DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE PD-1 D'UN CANCER DU RECTUM NON TRAITÉ PAR RCT (A : DENSITE = 168/MM ²) ET TRAITÉ PAR RCT (B : DENSITE = 382/MM ²).	55
FIGURE 19 : COURBES DE KAPLAN MEIER ILLUSTRANT LES DIFFERENCES DE SURVIE SANS RECIDIVE DES PATIENTS FORTS (HI ; COURBES VERTES) VS FAIBLE (LO ; COURBES ROUGES) EN CD3+ (A) OU CD8+ (B) PAR DEUX METHODES DE CALCUL DE LA DENSITE DIFFERENTES : METHODE DE LA DENSITE GLOBALE SUR LA BIOPSIE ET LA METHODE DES 10 TUILES LES PLUS INFILTREES. TEST DE LOGRANK AVEC CORRECTION DE ALTMAN.....	56
FIGURE 20 : REPRESENTATION GRAPHIQUE (COURBES DE KAPLAN MEIER) DE LA FONCTION DE SURVIE SANS RECIDIVE (DFS) EN FONCTION DE LA COMBINAISON DES INFORMATIONS DE L'INFILTRATION IMMUNITAIRE (CD3 ET CD8) AVEC L'EVALUATION CLINIQUE DE LA REPONSE A LA RCT (ycTNM).	58
FIGURE 21 : REPRESENTATION GRAPHIQUE (COURBES DE KAPLAN MEIER) DE LA FONCTION DE SURVIE SANS RECIDIVE (DFS) EN FONCTION DE LA COMBINAISON DES INFORMATIONS DE L'INFILTRATION IMMUNITAIRE (CD3 ET CD8) ET DE L'EVALUATION HISTOLOGIQUE SUR LA PIECE OPERATOIRE DE LA REPONSE A LA RCT (SCORE DE DWORAK).....	59
FIGURE 22 : DIAGRAMME DESCRIPTIF DES COHORTES SUIVIES EN WATCH AND WAIT.....	60
FIGURE 23 : DENSITE EN CD3 SUR LES BIOPSIES DIAGNOSTIQUES DANS LES DIFFERENTS CENTRES « WATCH AND WAIT »	61
FIGURE 24 : MOYENNE DES DENSITES EN CD3 SUR LES BIOPSIES DIAGNOSTIQUES DE PATIENTS SUIVIS EN « WATCH AND WAIT » DANS LES GROUPES ABSENCE DE RECHUTE, RECHUTE, RECHUTE PRECOCE (<2 ANS) ET RECHUTE TARDIVE (>2 ANS)..	62
FIGURE 25 : REPARTION DES RECHUTES (LOCALE ET A DISTANCE) DANS LES 4 QUARTILES DE DENSITE EN CD3 SUR LES BIOPSIES DIAGNOSTIQUES.	62
FIGURE 26 : REPRESENTATION GRAPHIQUE (COURBES DE KAPLAN MEIER) DE LA FONCTION DE SURVIE SANS RECIDIVE EN FONCTION DE L'INFILTRATION IMMUNITAIRE (COMBINAISON CD3 ET CD8).	63

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : EXEMPLE DE LA CLASSIFICATION DE DWORAK DU DEGRE DE REPONSE HISTOLOGIQUE (KIM ET AL., 2016)	18
TABLEAU 2 : ÉTUDES DE PHASE II PROPOSANT UNE TUMORECTOMIE OU UNE STRATEGIE DE « WATCH AND WAIT » APRES RCT NEOADJUVANT DANS DES CANCERS DU RECTUM LOCALEMENT AVANCES.....	20
TABLEAU 3 : RESUME NON EXHAUSTIF DES MARQUEURS TISSULAIRES ET SANGUINS ASSOCIES A UNE REPONSE A LA RCT NEOADJUVANTE DANS LES CANCERS DU RECTUM LOCALEMENT AVANCES.....	22
TABLEAU 4 : DESCRIPTIF DES COHORTES ANALYSEES	38
TABLEAU 5 : PROTOCOLES D'IMMUNOMARQUAGE SUR AUTOMATE BENCHMARK XT (ROCHE)	39
TABLEAU 6 : GENES ANALYSES PAR LA TECHNOLOGIE NANOSTRING.....	44
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DE LA COHORTE DE BELGIQUE ETUDIEE EN IHC. CTNM : CLINICAL TNM EVALUATION CLINIQUE DE LA PROGRESSION TUMORALE AVANT TOUT TRAITEMENT. . N/A : NON DISPONIBLE (NOT AVAILABLE).	46
TABLEAU 8 : TABLEAU DE CONTINGENCE EVALUANT LA DENSITE EN CD8 SUR LA BIOPSIE DIAGNOSTIQUE COMME TEST PREDICTIF DE REPONSE A LA RCT NEOADJUVANTE.	48
TABLEAU 9 : ANALYSE MULTIVARIEE SELON LE MODELE DE COX SUR LE CRITERE DFS SUR L'ENSEMBLE DE LA COHORTE.....	57

ABBREVIATIONS

ACE : Antigène carcino-embryonnaire
ADN : acide désoxyribonucléique
ASCO : American Society of Clinical Oncology
ATP : adénosine triphosphate
BCG : Bacillus Calmette-Guérin
BCR : B cell receptor
CCR : Cancer colorectal
CEA : Carcinoembryonic antigen
ctC : Circulating tumor cells
DFS : Disease-free survival, survie sans récurrence
EBV : Epstein-Barr virus
HADHA : Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase;
HAS : Haute autorité de santé
HHV-8 : Human herpes virus 8
HMGB-1 : High Mobility Group Box-1
HMGCS2 : 3 -hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
HSD17B2 : 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2
ILC : Innate lymphoid cells
IRM : Imagerie par résonance magnétique
KO : Knock-out
KRAS : Kirsten Rat Sarcoma
LARC : Locally advanced rectal cancer
MCA : 3-methylcholanthrene
MCI : Molécule de costimulation inhibitrice
NF- κ B : Nuclear factor- κ B
NFS : Numération formule sanguine
NK : Natural killer
OS : Overall survival, survie globale
PLEC1 : Plectin-1 ;
RAG : Recombination activating gene
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire
RCT : Radiochimiothérapie

TAA : Tumor associated antigens, antigènes associés à la tumeur

TAP : Thoraco-abdomino-pelvien

TAGLN : Transgelin

TIL : Tumor-infiltrating lymphocytes

TCR : T-cell receptor

TKT : Transketolase;

TME : Total mesorectum excision

TNM : Tumor-Node-Metastase

TP53 : Tumor protein 53

TRG : Tumor Regression Grade,

UICC : Union internationale contre le cancer

XRCC2 : X-ray repair cross-complementing protein 2

Introduction

I. Cancer colorectal et cancer du rectum

I.1. Épidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est le 3^{ème} cancer le plus fréquent en France avec près de 40 000 cas en 2012. En 2012, l'âge moyen au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme.

Dans environ 30 % des cas, le CCR est localisé au niveau du rectum (Brenner et al., 2012). En France, la prévalence du cancer du rectum est de 15 000 nouveaux cas par an et la probabilité de survie à 5 ans est de 55 % (Allemani et al., 2015 ; Bouvier and Launoy, 2015).

I.2. Définition anatomique

Le rectum est la partie pelvique du gros intestin, d'une longueur de 12 cm, il va de la charnière recto-sigmoïdienne lorsque finit le mésocôlon sigmoïde à la hauteur de la 3^{ème} pièce sacrale jusqu'au canal anal (bord supérieur de l'appareil sphinctérien) (Delmas, 2006), soit de 3 à 15 cm de la marge anale (Figure 1).

On distingue le bas rectum (3 à 5 cm de la marge), le moyen rectum (5 à 10 cm de la marge) et le haut rectum (10 à 15 cm de la marge).

En pratique clinique, les examens utilisés pour distinguer les différents étages du rectum sont le toucher rectal, la rectoscopie rigide, l'échographie endorectale et l'IRM. Le siège de la tumeur est défini à partir de son pôle inférieur. Les distances sont mesurées par rapport à la marge anale.

Cette classification anatomique est importante, car la position exacte de la tumeur détermine la stratégie thérapeutique : notamment la mise en place d'un traitement néo-adjuvant, le type de chirurgie, les possibilités de conservation sphinctérienne...

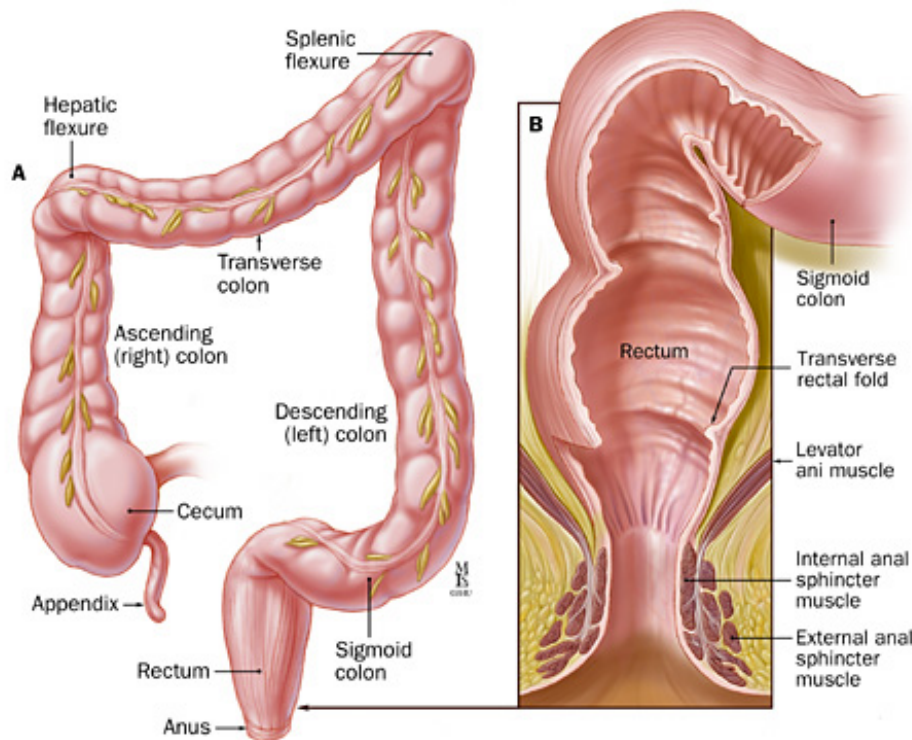


Figure 1 : Anatomie du rectum

I.3. Clinique

Le diagnostic de CCR doit être évoqué devant des manifestations cliniques telles que : des rectorragies, des troubles du transit ou encore devant toute anémie ferriprive d'étiologie indéterminée.

Le diagnostic de CCR peut également être porté dans le cadre du dépistage organisé : les personnes entre 50 et 74 ans sont concernées par ce dépistage.

I.4 Examens complémentaires

Plusieurs examens complémentaires à la fois d'imagerie et biologiques sont nécessaires dans le cadre du diagnostic d'un CCR.

I.4.1 Imagerie

La coloscopie totale avec prélèvements biopsiques est l'examen essentiel du diagnostic. Les biopsies sont effectuées pour un examen anatomopathologique afin d'établir le diagnostic de cancer.

Le bilan d'extension repose sur le scanner thoraco-abdomino-pelvien (TAP) avec injection de produit de contraste. En cas de localisation rectale, une IRM endorectale ou une écho-endoscopie rectale sont recommandées.

I.4.2 Examens biologiques

Le bilan standard systématique comprend une Numération-Formule Sanguine (NFS) et la clairance rénale.

D'autres examens seront prescrits en fonction de l'âge et de l'état clinique du patient.

Le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), marqueur tumoral, est également systématique.

I.5 Classification anatomopathologique

Dans 60 à 80 % des cas les cancers colorectaux se développent à partir d'un adénome. Le risque de transformation d'un adénome en cancer dépend de différents facteurs comme la taille, le degré de dysplasie ou l'importance de la composante villoseuse. Ainsi, l'adénocarcinome est le cancer primitif du rectum le plus fréquent. La classification anatomopathologique des cancers du rectum actuellement en vigueur est la classification UICC TNM 7ème édition, 2009 (Figure 2, Annexe 1 et Annexe 2)

Afin d'évaluer le statut ganglionnaire, l'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandé. Cependant, dans certains cas de cancers du rectum, le traitement néo-adjuvant induit une diminution des ganglions, rendant ainsi l'analyse des 12 ganglions requis souvent impossible.

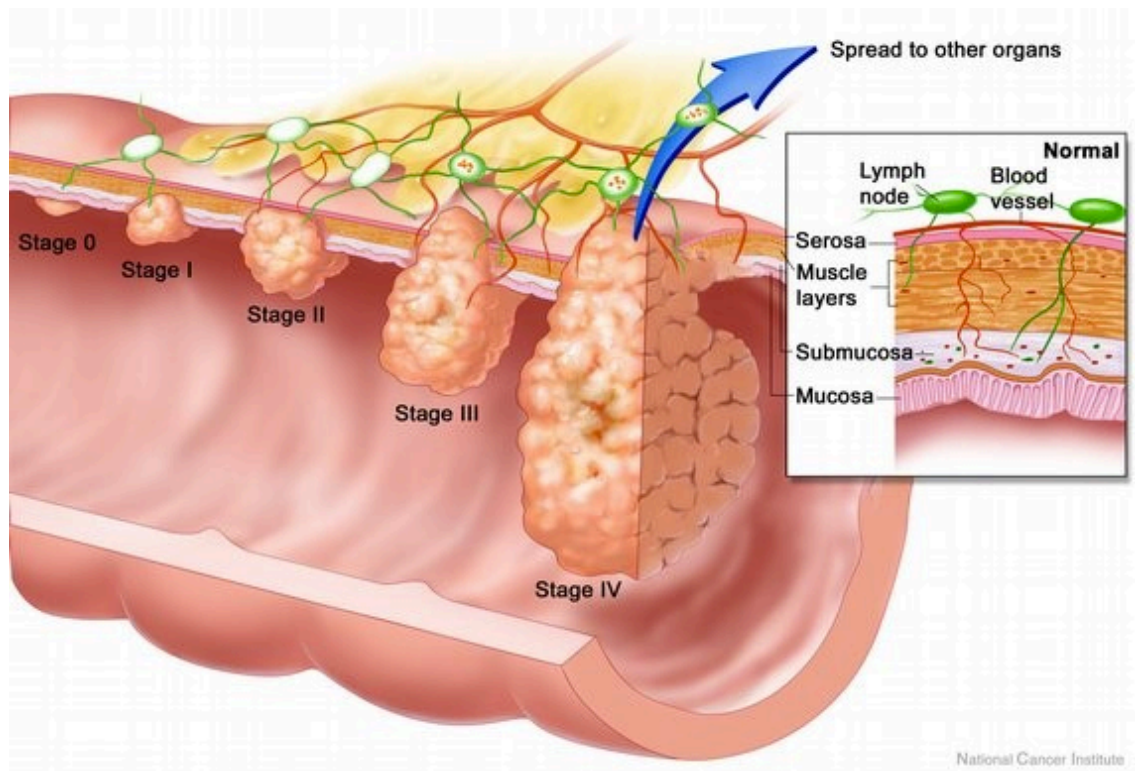


Figure 2 : Classification TNM des cancers colorectaux. Stade 0 : carcinome in situ, Stade I : Tumeur envahissant la sous-muqueuse voire la musculuse sans atteinte ganglionnaire, Stade II : Tumeur envahissant la sous-séreuse sans atteinte ganglionnaire, Stade III : Envahissement ganglionnaire, Stade IV : Présences de métastases à distance

I.6 Prise en charge thérapeutique actuelle

La prise en charge thérapeutique du cancer du rectum varie considérablement en fonction de plusieurs critères : siège de la tumeur, stade d'évolution, bilan d'extension initial, l'état général du patient et son bilan d'opérabilité.

Le bilan préthérapeutique initial comprend le toucher rectal et la colonoscopie totale. Afin de déterminer le degré d'infiltration de la tumeur dans la paroi rectale, l'IRM pelvienne ou l'écho-endoscopie rectale sont des examens indispensables. Ces examens complémentaires permettent de classer la tumeur en stade T1 ou T2 (tumeur limitée à la paroi), T3 (infiltration de la graisse périrectale) ou T4 (extension aux organes périrectaux).

I.6.1 Cancers du rectum de stades UICC-TNM 0 et I

La chirurgie est le traitement de référence pour ces stades.

I.6.1.a Exérèse locale chirurgicale

Dans un nombre variable de cas (Maeda et al., 2014), pour certains cancers précoces du rectum (T1-2, N0), une exérèse locale chirurgicale par voie transanale peut être proposée. Ce type de procédure à un taux de morbi-mortalité associé plus faible comparé à une résection plus radicale et une période de convalescence raccourcie (Baxter and Garcia-Aguilar, 2007; Brenner et al., 2014; You, 2011). L'analyse histologique de la pièce opératoire dicte la conduite ultérieure : surveillance ou reprise chirurgicale si la tumeur s'étend à la musculuse.

I.6.1.b Exérèse extrafaciale du mésorectum ou TME

Quand une résection locale est impossible, une résection transabdominale du rectum avec préservation de la fonction sphinctérienne est privilégiée lorsque cela est possible. Dans ce cas, l'exérèse extrafaciale du mésorectum ou TME (total mesorectum excision) est le traitement standard. Il s'agit d'une approche chirurgicale décrite pour la première fois en 1986 par Heald et Ryall (Heald and Ryall, 1986).

L'introduction de la TME dans la prise en charge des cancers du rectum a entraîné une diminution significative et majeure du taux de récurrences locales (Arbman et al., 1996).

I.6.2 Cancers du rectum de stades UICC-TNM II et III

Dans ces stades, la localisation du cancer du rectum a toute son importance. En effet, elle conditionne la mise en place ou non d'une radiochimiothérapie (RCT) néoadjuvante.

Dans le cas des cancers du bas et du moyen rectum, le traitement standard est la chirurgie précédée d'une radiochimiothérapie.

Les cancers du rectum de stade localement avancé (LARC) sont associés à un taux élevé de récurrences loco-régionales, ceci est lié non seulement à la proximité anatomique du rectum aux différentes structures et organes pelviens, mais aussi à la difficulté lors de la chirurgie d'exérèse d'obtenir des marges saines suffisantes. La RCT néoadjuvante permet alors un meilleur contrôle des récurrences locales (Gerard, 2006 ; Kapiteijn et al., 2001) sans toutefois améliorer la survie globale.

Il est à noter que les adénocarcinomes du rectum ne sont pas très sensibles à la radiothérapie. Afin d'améliorer la radiosensibilité des cancers du rectum, la chimiothérapie est associée à la radiothérapie. Actuellement, les protocoles FUFOL 45 Gy (radiothérapie totale de 45 Gy et chimiothérapie à base de 5 -FU-acide folinique) et CAP 50 Gy (radiothérapie totale de 50 Gy et chimiothérapie concomitante par capécitabine) sont les schémas thérapeutiques standards.

I.7 Nouvelles options thérapeutiques : stratégie de préservation d'organe.

La morbi-mortalité liée à l'acte chirurgical est importante, avec un risque de mortalité opératoire de l'ordre de 8 % chez les patients de plus de 75 ans et une altération de la qualité de vie des patients. Entre 20 et 30 % des patients (jusqu'à 50 % chez les personnes de plus de 75 ans) ont des séquelles fonctionnelles qui persistent à long terme, comme l'incontinence fécale, une dyschésie, l'impuissance ou le port de stomie définitive (Benoist et al., 1997 ; Endreseth et al., 2006 ; Senéjoux, 2011 ; Stornes et al., 2016).

C'est pourquoi certains auteurs remettent aujourd'hui en cause la place de la chirurgie radicale chez les patients bons répondeurs à la RCT (Habr-Gama et al., 2004) au regard de l'altération de la qualité de vie.

I.7.1 Réponse histologique post RCT néoadjuvante

La réponse histologique de la tumeur primitive à la RCT est évaluée selon un grade de régression tumorale (ou Tumor Regression Grade, TRG). Différentes classifications permettent d'établir ce score de régression, la plus ancienne étant la classification de Dworak (Dworak et al., 1997) (Tableau 1, Figure 3). Elles évaluent de manière semi-quantitative le pourcentage de cellules tumorales ainsi que le pourcentage de fibrose ou de contingent colloïde restant sur la pièce opératoire post traitement néo-adjuvant (radiothérapie et/ou chimiothérapie). Les différentes classifications vont d'une réponse complète (destruction totale du contingent tumoral) à l'absence de réponse. Elles permettent de classer les tumeurs en fonction de leur radio-chimiosensibilité.

Dworak	
Complete regression	No tumor cells (TRG 4)
Near complete regression	Very few tumor cells (TRG 3)
Moderate regression	Dominantly fibrotic changes with few tumor cells or groups (TRG 2)
Minimal regression	Dominant tumor mass with obvious fibrosis (TRG 1)
No regression	No regression (TRG 0)

Tableau 1 : Exemple de la classification de Dworak du degré de réponse histologique (Kim et al., 2016)

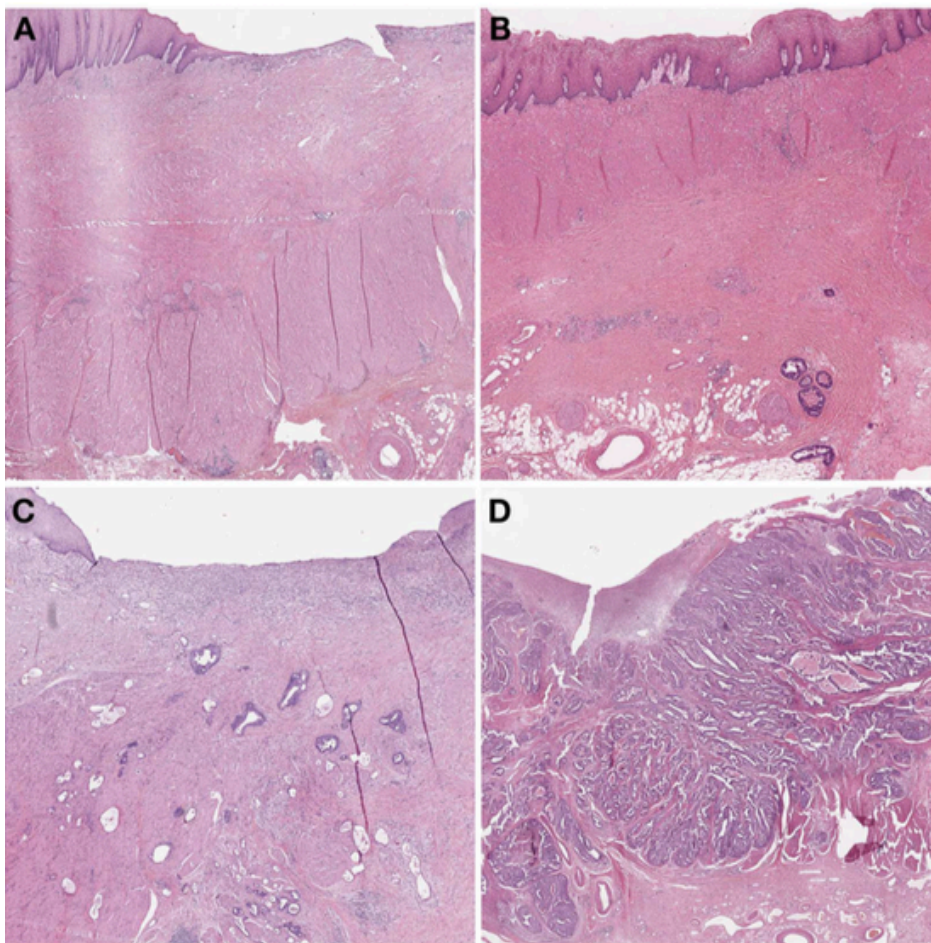


Figure 3 : Exemple de régression tumorale selon la classification de Dworak. (A) TRG4 régression complète. (B) TRG3 < 10 % de tumeur résiduelle. (C) TRG2 : 10-50 % de tumeur résiduelle. (D) TRG 0-1 : > 50 % de tumeur résiduelle (Thies and Langer, 2013)

I.7.2 « Watch and Wait » : nouvelle approche non chirurgicale ou mini-invasive (tumorectomie) chez les patients en réponse clinique complète

La RCT néoadjuvante permet une régression tumorale dans 50 à 60 % des cas, avec une réponse histologique complète dans environ 20 % des cas (Bosset et al., 2005 ; Collette et al., 2007 ; Das et al., 2006, 2007 ; Smith et al., 2010).

Le risque de métastase ganglionnaire après traitement néoadjuvant est de l'ordre de 6 % chez les patients en réponse complète clinique sur les examens d'imagerie. Ainsi, devant l'amélioration des techniques d'imagerie permettant d'évaluer la réponse à la RCT et le faible taux de récurrences locales chez les patients répondeurs, une stratégie de conservation d'organe est actuellement envisagée : simple chirurgie d'exérèse du reliquat tumoral ou même absence de geste chirurgical avec surveillance des patients en cas de réponse complète à la RCT (stratégie de « watch and wait »).

En 2004, l'équipe brésilienne de Habr-Gama (Habr-Gama et al., 2004) publie la première étude montrant une survie globale (OS) à 5 ans de 100 % et une survie sans récurrence (DFS) à 5 ans de 82 % dans le groupe « watch and wait » comparé à une OS de 88 % et une DFS de 83 % dans le groupe opéré.

Cette attitude thérapeutique est encore à l'état d'évaluation dans de nombreux groupes à travers le monde (Tableau 2).

Dans l'optique de proposer une prise en charge personnalisée aux patients atteints de cancer du rectum, il semble aujourd'hui nécessaire de disposer de biomarqueurs prédictifs de la qualité de la réponse à la RCT néoadjuvante. Ces marqueurs permettraient à la fois de proposer une stratégie de préservation d'organe aux patients bons répondeurs et d'adapter la prise en charge des patients résistants à la RCT.

Plusieurs critères cliniques de la tumeur tels que : la taille, les stades T et N, la localisation de la tumeur, ainsi que l'intervalle entre la RCT néoadjuvante et la prise en charge chirurgicale ont été montrés comme étant des facteurs associés à une bonne réponse à la RCT néoadjuvante (Bitterman et al., 2015; Ferrari and Fichera, 2015; Huh et al., 2013; Qiu et al., 2011; Zeng et al., 2015).

	Effectif (n)	Stade initial	Réponse clinique complète (CCR)	Traitement des CCR	Récidive locale (n)	Récidive métastatique (n)	Suivi (moyenne mois)
Schell et al., 2002	11	T3	CCR: 8/11	RCT + excision transanale	0	1	55,2
Kim et al., 2001	26	T2-T3	CCR: 17/26	RCT + excision transanale	1	0	24
Bonnen et al., 2004	26	T3	CCR: 23/26	RCT + excision transanale	2	4	60
Habr-Gama et al., 2004	71	T2-T3	CCR: 71/71	Watch and Wait	2	3	57.3
Lezoche et al., 2005	100	T2-T3	CCR: 18/100	RCT + excision transanale	5	2	55
Appelt et al., 2015	51	T2-T3	CCR: 40/51	RCT + Watch and wait	9	5	23.9
Maas et al., 2011	192	T2-T3	CCR: 21/192	RCT+ Watch and wait	1	0	25
(Habr-Gama et al.2014)	183	T2-T4N0- 2M0	CCR: 90/183	RCT + Watch and wait	28	13	60

Tableau 2 : Études de phase II proposant une tumorectomie ou une stratégie de « watch and wait » après RCT néoadjuvant dans des cancers du rectum localement avancés.

Des critères histologiques ont également été décrits comme étant prédictifs d'une mauvaise réponse à la RCT comme les tumeurs mucineuses ou la présence d'ulcérations (Mccawley et al., 2016).

L'imagerie (IRM et écho-endoscopie rectale) est également un outil intéressant, mais pas toujours très sensible dans la prédiction de la réponse à la RCT (Joye et al., 2014 ; Patel et al., 2011).

Au niveau moléculaire, de nombreux biomarqueurs sanguins ou tissulaires accessibles dès le diagnostic ont été décrits comme étant prédictifs de réponse à la RCT néoadjuvant (Dayde et al., 2017). Cependant à ce jour, aucun n'est utilisé en pratique clinique.

Plusieurs biomarqueurs moléculaires de bonne réponse à la RCT ont été retrouvés au niveau tissulaire (biopsie ou pièce opératoire). L'absence de mutation au niveau du gène *TP53* ou *KRAS* est à titre d'exemple associée à une bonne réponse à la RCT, plusieurs études suggèrent également un rôle du degré de méthylation de l'ADN avec la réponse à la RCT, mais également avec la survie.

Les profils d'expression de gènes des patients bons répondeurs ont également été étudiés : plusieurs signatures de gènes ont été proposées pour discriminer les patients bons et mauvais répondeurs (Agostini et al., 2015).

Au niveau sanguin, le marqueur tumoral ACE – biomarqueur pronostique et de suivi dans les cancers colorectaux- semble être associé à la réponse à la RCT et à la survie globale (Kim et al., 2015 ; Zeng et al., 2015).

Les cellules tumorales circulantes (ctC) sont depuis une dizaine d'années au centre de l'attention (Alix-Panabières and Pantel, 2014) et pourraient être une voie de recherche intéressante dans la stratification de la réponse à la RCT. Ainsi, chez les patients atteints de cancer du rectum localement avancé (LARC) la détection des ctC pourrait être un bon marqueur prédictif de réponse à la RCT : le taux basal de ctC est plus élevé chez les patients bons répondeurs à la RCT (Sun et al., 2016).

Au total, plusieurs biomarqueurs ont été identifiés comme étant associés à une bonne réponse à la RCT (

Tableau 3). Cependant aujourd'hui, aucun biomarqueur prédictif assez robuste pour une analyse de routine n'a été identifié. L'association de plusieurs marqueurs clinicopathologiques, d'imagerie et biologiques pourrait permettre le développement d'un score sensible et peu coûteux guidant une prise en charge personnalisée des cancers du rectum.

Référence	Effectif (n)	Échantillons analysés	Biomarqueurs	<i>p</i>
Qin et al., 2015	67	Avant RCT	XRCC2	<i>p</i> < 0,001
Lee et al., 2015	172	Avant RCT	HSD17B2 and HMGCS2	<i>p</i> < 0.001
Zaanan et al., 2015	96	Avant RCT	Beclin 1	<i>p</i> = 0,02
Cebrián et al., 2016	75	Avant RCT	PLK1	<i>p</i> = 0,049
Probst et al., 2016	18 113	Avant RCT	CEA	<i>p</i> < 0,001
Chen et al., 2012	1830	Avant RCT	statut gène P53	<i>p</i> = 0,002
Teng et al., 2015	62	Avant RCT	CD8+ TILs ; CD4+TILs	<i>p</i> = 0.022 ; <i>p</i> = 0.022
Sun et al., 2016	115	Avant RCT	ctC	<i>p</i> = 0,012

Tableau 3 : Résumé non exhaustif des marqueurs tissulaires et sanguins associés à une réponse à la RCT néoadjuvante dans les cancers du rectum localement avancés.; XRCC2, X-ray repair cross-complementing protein 2; HSD17B2, 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 ; HMGCS2, 3 -hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase

Ainsi, la prise en charge du cancer du rectum a profondément été améliorée par la mise en place de la technique chirurgicale de TME afin de diminuer le taux de récurrence locale et la réalisation d'une radiochimiothérapie néoadjuvante en systématique dans les formes localement avancées (LARC).

Malgré cela, plusieurs questions restent en suspens :

1/ Comment améliorer la réponse à la RCT dans les LARC et obtenir un taux de réponse clinique complète plus important et un gain en termes de survie ?

2/ Existe-t-il des biomarqueurs fiables et robustes permettant de :

- prédire la qualité de la réponse à la RCT pour en particulier exclure les patients non répondeurs
- renforcer la présomption de réponse complète post-RCT obtenue en imagerie (IRM, scanner), afin d'instaurer avec une sécurité accrue une chirurgie à minima ou une stratégie de surveillance simple « watch and wait ».

II. Rôle du système immunitaire dans les cancers

II.1. Les débuts de l'immunothérapie

La notion selon laquelle le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance et l'éradication de cellules cancéreuses n'est pas récente.

En 1891, il fut rapporté pour la première fois le succès d'une immunothérapie par William Coley (1862-1936), médecin du Memorial Sloan Kettering Cancer Institute à New York. Jeune interne de chirurgie, une de ses premières patientes fut Bessie Dashiel, 17 ans, qui mourut en moins de 10 semaines d'un sarcome d'Ewing malgré l'amputation du bras atteint. Ceci affecta profondément Coley, il se mit alors à relire tous les dossiers de patients atteints de tumeurs similaires. Son attention se porta sur un dossier datant de 1883 (soit 7 ans avant Bessie Dashiel) d'un patient atteint d'un sarcome du cou inopérable qui semblait avoir disparu après que le patient eut développé un érysipèle. Le patient fut renvoyé chez lui sans tumeur résiduelle. Coley retrouva le patient. Celui-ci était encore vivant et n'avait aucune trace de tumeur résiduelle (McCarthy, 2006). Après des recherches, Coley fut convaincu qu'une infection sévère pouvait entraîner la régression voire la guérison d'un cancer. En 1891, il injecta sa première patiente avec une souche de Streptocoque et observa une régression de la tumeur. Il répéta cela chez 2 autres patients qui moururent de choc septique, cependant il constatait à chaque fois une diminution tumorale (Coley, 1891). Par la suite, il injecta à ses patients une combinaison de bactéries tuées par la chaleur (*Serratia marcescens* et *Streptococcus pyogenes*), connue sous le nom de toxine de Coley. À la fin de sa carrière, Coley avait pris en charge plus de 1000 patients avec un taux de guérison de 10 % dans des tumeurs osseuses ou sarcomes inopérables (Coley, 1891; Jacob Bickels et al., 2002; Wiemann and Starnes, 1994).

Aujourd'hui, ce principe est encore d'actualité (Redelman-Sidi et al., 2014) : en effet, le BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) est une des biothérapies les plus efficaces utilisées depuis plus de 30 ans dans les cancers de la vessie.

II.2. La théorie de l'immunosurveillance

II.2.1. Un concept remis en cause et débattu

L'immunosurveillance est une théorie selon laquelle le système immunitaire à la fois inné et adaptatif est capable de reconnaître et détruire les cellules tumorales à l'origine d'une néoplasie.

Ce fut en 1909 que Paul Ehrlich (1854-1915) postula pour la première fois le concept d'immunosurveillance. En effet, pour lui les cellules « mutantes » générées en permanence ont besoin des cellules du système immunitaire - véritable patrouille - pour être éradiquées avant l'apparition de manifestations cliniques (Ehrlich, 1909, 1957). Ce postulat sous-entendait l'existence d'antigènes spécifiques de tumeur. Cette affirmation ouvrit alors plus d'un siècle de débats autour du contrôle immunologique des tumeurs.

Il fallut cependant attendre la moitié du vingtième siècle pour que Sir Macfarlane Burnet (Burnet, 1957) et Lewis Thomas (Thomas, 1959) fassent le lien entre la régression tumorale et la réponse immunitaire. En 1970, fut alors théorisé le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale par Burnet (Burnet, 1970, 1964) dans lequel les lymphocytes auraient un rôle de sentinelle à la fois dans la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses.

Dans les années 1960, Lloyd John Old (1933-2011) (L J Old and Boyse, 1964) et George Klein (1925-2016) (Klein, 1966) démontrèrent que des souris pouvaient être immunisées contre des tumeurs syngéniques (appartenant à la même race consanguine) induites par divers carcinogènes (viraux, chimiques...) démontrant ainsi l'existence d'antigènes associés à la tumeur (TAA).

II.2.2. La renaissance du concept d'immuno-surveillance

Dans les années 1990, le développement de souris déficientes pour les différentes populations immunitaires et celui des anticorps monoclonaux a permis de valider le concept d'immuno-surveillance anti-tumorale.

RAG-1 et RAG-2 (recombination activating gene) sont des enzymes de recombinaison exprimées exclusivement dans les lymphocytes. Elles sont essentielles pour le réarrangement TCR ou BCR. Après injection d'un carcinogène chimique, le MCA (3-méthylcholanthrene), les souris KO RAG2^{-/-} développent des tumeurs plus rapidement et à une plus grande fréquence que des souris contrôles sauvages (Shankaran et al., 2001). De plus 100 % des

souris RAG2^{-/-} développent des tumeurs spontanées. Ainsi, les lymphocytes préviennent non seulement la formation de tumeurs induites par un carcinogène, mais aussi la formation de tumeurs spontanées.

Par la suite, plusieurs souris KO pour les différentes sous-populations lymphocytaires cytotoxiques ont montré une susceptibilité accrue au développement de tumeurs après injection de MCA (Crowe et al., 2002 ; Dunn et al., 2006 ; Gao et al., 2003 ; Girardi et al., 2003 ; Smyth et al., 2001).

Qu'en est-il chez l'homme ?

Dès les années 70, des études de suivi de patients greffés sous immunosuppresseurs (Penn et al., 1971) ou de patients atteints d'un déficit immunitaire primaire (Gatti and Good, 1971) ont montré un risque relatif de développer un cancer plus important chez ces patients par rapport à la population générale. Ces cancers sont le plus souvent secondaires à une infection virale telle que les infections par EBV ou HHV8 (Penn, 1999).

II.2.3. La mise à jour du concept d'immuno-surveillance :

l'immunoediting

La présence de tumeurs malignes chez l'homme en l'absence d'immunodépression suggère l'existence de mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire.

Ainsi, c'est aujourd'hui l'hypothèse d'« immunoediting » avancée par R. Schreiber (Dunn et al., 2002) qui est retenue : certaines cellules tumorales mutées arrivent à échapper à l'activité anti-tumorale des cellules du système immunitaire. Ce système de sélection aboutirait à la survie des cellules tumorales les moins immunogéniques et a été formulé sous le nom de la théorie des « 3E » : Élimination, Équilibre et Échappement (Figure 4).

II.2.3.a. La phase d'élimination

Cette première phase reprend le concept d'immunosurveillance anti-tumorale. Lors de cette phase, le système immunitaire inné et adaptatif est capable d'identifier et de détruire les cellules tumorales nouvellement formées.

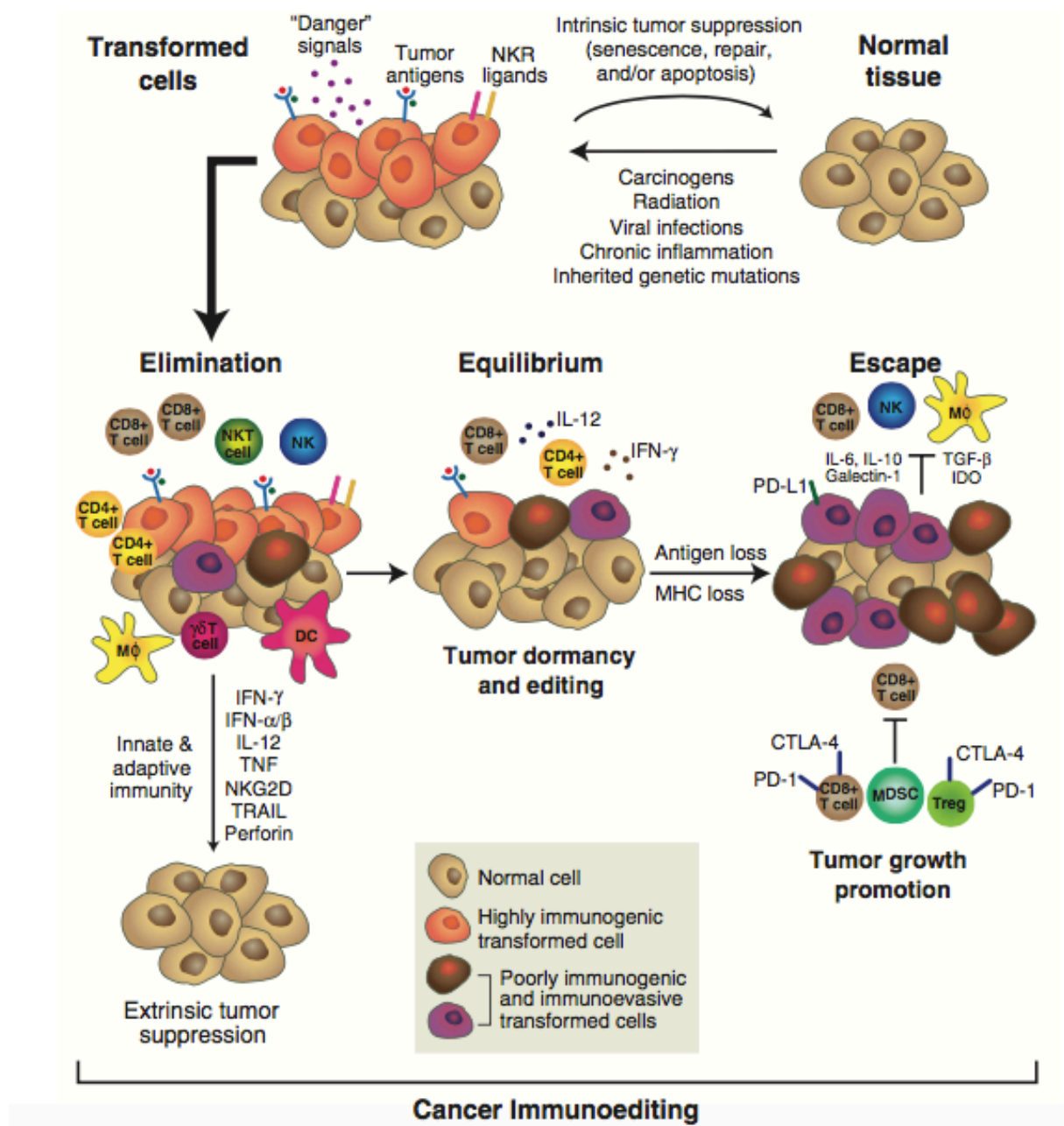


Figure 4 : Théorie d'immunoediting des cancers ou théorie des 3E (élimination, équilibre et échappement). L'apparition de cellules tumorales hautement immunogéniques induit le recrutement des cellules du système immunitaire inné (NKT, NK, macrophages, cellules dendritiques) et du système adaptatif (lymphocytes T CD4+ et CD8+) qui éliminent la majorité des cellules tumorales par des mécanismes de cytotoxicité et un contexte cytokinique favorable (IFN α/β , IFN γ , TNF...). Les cellules tumorales non éliminées entrent dans un état de quiescence.

II.2.3.b. La phase d'équilibre

Cette seconde phase est un état d'équilibre entre la prolifération des cellules cancéreuses et leur destruction par le système immunitaire. À l'état d'équilibre, les cellules tumorales se trouvent dans un état de « dormance » (Aguirre-Ghiso, 2007) où elles demeurent cliniquement indétectables. Les cellules du système immunitaire adaptatif exercent une pression de sélection sur les cellules tumorales restantes sculptant ainsi leur immunogénicité (Koebel et al., 2007). Cette phase pourrait être la plus longue des 3 phases de l'« immunoediting » et peut durer plusieurs années voire décennies.

La preuve de ce concept de « dormance » a été montrée chez la souris par Koebel en 2007 (Koebel et al., 2007). Son équipe montra qu'une tumeur latente, cliniquement indétectable pouvait ressurgir après déplétion en lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ ou par neutralisation de cytokines comme l'IFN- γ .

Des arguments cliniques sous-tendent cet état d'équilibre au cours de l'immunoediting des cancers chez l'homme.

II.2.3.c. La phase d'échappement

L'échappement est la dernière phase du processus tumoral, lors de laquelle les cellules tumorales en détournant les défenses anti-tumorale (perte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, mise en place de mécanismes immunosuppresseurs...) deviennent moins immunogènes, échappent à la reconnaissance immune, prolifèrent et disséminent à distance de la tumeur primaire.

III. Rôle de l'infiltrat immunitaire dans le cancer du rectum

III.1. Effet pronostic des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)

Nous savons aujourd'hui que la majorité des types de cellules immunitaires peut être observée dans le microenvironnement tumoral : des cellules du système immunitaire inné (polynucléaires, cellules NK, macrophages, cellules dendritiques, cellules myéloïdes suppressives, ILC), mais aussi des cellules du système adaptatif (lymphocytes T, lymphocytes B).

Le rôle pronostique de l'infiltrat immunitaire a été étudié dans différents types de cancers (Clemente et al., 1996 ; Flammiger et al., 2012 ; Galon et al., 2006 ; Pages et al., 2009). La

présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) est un facteur de bon pronostic. Dans la majorité des tumeurs solides, l'infiltration des tumeurs par un taux élevé de lymphocytes effecteurs (CD8+, CD4+ de type Th1, NK) a été associée à un meilleur pronostic : survie sans récurrence (DFS) prolongée, accroissement de la survie globale (OS) (Fridman et al., 2012) (Figure 5).

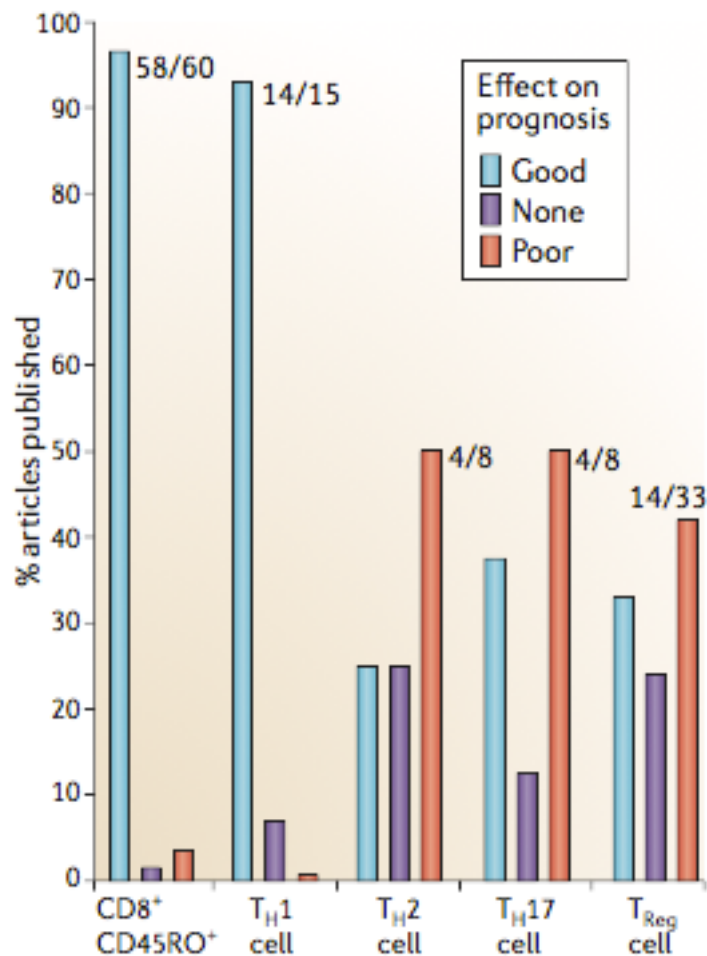


Figure 5 : Association de l'infiltrat immunitaire et le pronostic dans différents types de cancers. Analyse de plus de 120 publications étudiant le rôle pronostique des différentes sous populations T (cytotoxiques, mémoire, régulatrice, auxiliaires) dans plus de 20 types tumoraux. D'après Fridman et al., 2012

III.2 Cas du cancer colorectal

Dans le cancer colorectal, il a été montré que l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T CD3+, T CD8+ cytotoxiques et T mémoires CD45RO avait une valeur pronostique très importante pouvant surpasser la classification histopronostique du TNM (Bindea et al., 2011 ; Galon et al., 2006 ; Pagès et al., 2005).

La répartition de l'infiltrat immunitaire est hétérogène au sein des tumeurs solides. Les cellules immunitaires sont présentes au sein des glandes tumorales, dans le stroma avoisinant et à distance au niveau de la marge d'invasion et des structures lymphoïdes tertiaires néoformées (Bindea et al., 2013a). Il existe dans les cancers colorectaux une distribution géographique préférentielle des différents sous-types lymphocytaires : lymphocytes NK au niveau du stroma, lymphocytes B au niveau du front d'invasion (région IM), tandis que les lymphocytes T CD3, TCD8 et T CD45RO se distribuaient de façon plus homogène avec une densité plus importante au niveau du front d'invasion que dans la tumeur (région CT). Cette distribution évolue suivant la progression tumorale. Ainsi, les populations lymphocytaires T (CD3) cytotoxiques (CD8) et mémoires (CD45RO), ainsi que les Treg (FOXP3) et les lymphocytes NK diminuent dans la tumeur et le front d'invasion au cours de la progression tumorale (des stades T1 à T4). À l'inverse, la densité en lymphocytes B tend à augmenter avec le stade T (Bindea et al., 2013b) (Figure 6).

Le test « Immunoscore », basé sur la quantification des lymphocytes T CD 3+ et T CD8+ au sein de la tumeur et de son front d'invasion a été développé au sein de la plateforme d'Immunomonitoring de l'HEGP pour une translation clinique. Ce test a fait l'objet d'une large étude internationale de validation portant sur les cancers coliques de stades II-III, dont les résultats ont été présentés à l'ASCO 2016.

Par ailleurs, ce test est prédictif de la survie de patients atteints d'un cancer du rectum non traités par radiochimiothérapie néoadjuvante (Anitei et al., 2014).

L'évaluation immunitaire est impossible sur les pièces opératoires pour les cancers du rectum traités par RCT néoadjuvante. En effet, la radiothérapie induit une destruction tumorale partielle (le plus souvent) ou totale, associée à une profonde modification architecturale tumorale avec apparition de fibrose et/ou d'une réponse colloïde et une disparition de la délimitation tumeur/front d'invasion. Dans ce contexte, seules les biopsies faites au moment

de la coloscopie diagnostique (avant RCT) permettent d'évaluer la nature de l'infiltrat immunitaire initial.

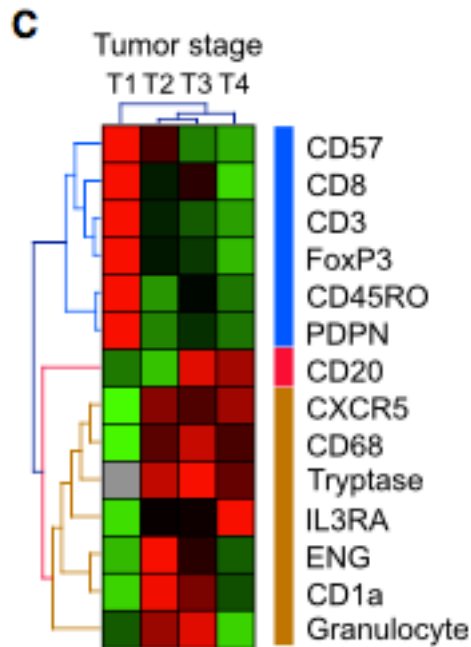


Figure 6 : Répartition des populations lymphocytaires en fonction du stade de la tumeur. Les marqueurs T (CD57, CD 8, CD3, FoxP3 et CD45RO) sont figurés en bleu, leur expression diminue avec le stade T de T1 à T4. L'expression moyenne du CD-20 (marqueur B) est quant à elle augmentée avec le stade. D'après Bindea et al., 2013b.

Dans un travail préliminaire (Anitei et al., 2014) portant sur un nombre restreint de patients (n=55), il a été observé une corrélation entre une forte infiltration en lymphocytes T CD3 et lymphocytes T CD8 des biopsies et une bonne réponse à la RCT néoadjuvante (Anitei et al., 2014) (Figure 7). Ceci était en accord avec une étude antérieure portant sur 48 cancers du rectum traités par RCT néoadjuvante (Yasuda et al., 2011).

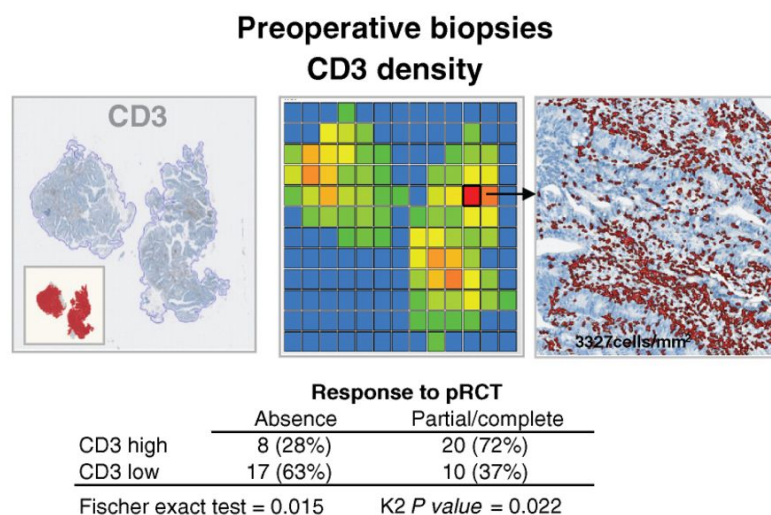


Figure 7 : Densité immunitaire et réponse à la RCT, étude préliminaire. Gauche : biopsie immunomarquée (CD3) numérisée, puis divisée en tuiles pour l'analyse. Centre : Cartographie montrant la densité des différentes tuiles, du minimum (vert) au maximum (rouge). Droite : détection des cellules CD3+ (en rouge) au niveau d'une tuile. Bas : Distribution des densités fortes et faibles en fonction de la réponse à la RCT néoadjuvante. D'après (Anitei et al., 2014)

III.3. Mort immunogène

Cette association pourrait être la conséquence de la nécessité d'un relais immunitaire pour l'obtention d'une bonne réponse à la RCT. Ainsi, il a été montré que la radiothérapie et certaines chimiothérapies pouvaient induire une mort cellulaire immunogène, c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire spécifique efficace. En effet, chez les souris immuno-déficientes l'efficacité anti-tumorale de différentes molécules utilisées en chimiothérapie conventionnelle est réduite, voire supprimée. Différents mécanismes peuvent expliquer cet effet immuno-dépendant de la chimiothérapie (Zitvogel et al., 2013). La chimiothérapie peut agir directement sur les cellules tumorales en modifiant leur immunogénicité (augmentation de l'expression des antigènes de tumeur à la surface des cellules tumorales, meilleure présentation des antigènes). Ces modifications couplées à l'effet toxique des chimiothérapies sur les cellules tumorales induisent l'apoptose et la mort immunogène des cellules.

Cette mort immunogène est caractérisée par la libération de signaux de stress et de danger par les cellules tumorales apoptotiques.

Les principaux signaux immunogènes identifiés sont :

- l'exposition à la surface de la cellule mourante de la calréticuline qui en délivrant un signal de phagocytose (« eat-me » signal), favorise la phagocytose des cellules cancéreuses par les macrophages et les cellules dendritiques
- le relargage d'ATP favorisé par l'autophagie de la cellule et permettant de recruter les cellules phagocytaires
- la sécrétion dans le microenvironnement tumoral de HMGB-1 (High Mobility Group Box-1) par les cellules tumorales en apoptose. Le facteur nucléaire HMGB-1 est un ligand endogène du TLR4 exprimé par les cellules dendritiques qui favorise la maturation des cellules dendritiques et ainsi la présentation antigénique (Kroemer et al., 2013 ; Zitvogel et al., 2008).

Une activation immunitaire est observée post-RCT (Galluzzi et al., 2016) pouvant être le témoin de l'apport de la composante immunitaire dans la réponse à la RCT. Cette activation des lymphocytes T nécessite la reconnaissance par le TCR d'un complexe CMH-peptide, d'un second signal délivré par différentes molécules de costimulation. Afin de réguler cette activation, des molécules de costimulation inhibitrices sont secondairement induites par les lymphocytes T afin de limiter leurs fonctions.

IV. Molécules de co-stimulation inhibitrices

La réponse immunitaire adaptative est initiée par la reconnaissance d'un antigène par un lymphocyte T spécifique via son récepteur TCR (1^{er} signal). L'antigène est présenté sous forme d'un complexe CMH-peptide à la surface de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Cette communication entre le lymphocyte T et la CPA est modulée par des signaux de costimulation activatrice ou inhibitrice. Un deuxième signal de costimulation activatrice est indispensable pour poursuivre l'activation de la cellule T : sans celui-ci la cellule est anergique. Ce second signal provient de l'interaction entre des molécules exprimées à la surface du LT (CD28, CD40-L...) et les ligands exprimés à la surface de la CPA (CD80, CD86, CD40...). Cependant un rétro-contrôle négatif est nécessaire afin d'empêcher une prolifération incontrôlée. Ainsi, cette costimulation activatrice est suivie dans un second temps par l'expression de molécules de costimulation inhibitrice (MCI) à la surface des LT (PD-1, Tim-3, LAG-3...).

IV.1.PD-1 et PD-L1/PD-L2

Programmed Death Cell protein 1 (PD-1, CD279) est un récepteur transmembranaire de type I, appartenant à la super-famille des immunoglobulines (Ig) qui peut être exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+, CD8+, Treg, NK, des cellules dendritiques, des lymphocytes B et des monocytes. Il possède deux ligands, PD-L1 (CD274) exprimé à la surface de nombreuses cellules et PD-L2 (CD273) ayant une expression plus restreinte (Keir et al., 2008). Son domaine intra-cytoplasmique contient un motif ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et un motif ITSM (Immunoreceptor tyrosine-based switch motif). Lors de la liaison de PD-1 avec un de ces ligands, ces deux motifs sont phosphorylés. Cette phosphorylation entraîne le recrutement de deux phosphatases (SHP1 et SHP2) par le motif ITSM, qui vont alors déphosphoryler Zap70, PKC θ et la sous-unité CD3 ζ , inhibant ainsi l'activation du lymphocyte T.

IV.2. LAG3

La molécule lymphocyte activation gene 3 (LAG3, CD233) appartient également à la super-famille des Ig, il possède des similitudes de structure avec la molécule CD4. Le gène codant LAG3 possède 20 % d'homologie avec le gène codant CD4. Comme pour le CD4, son ligand est le CMH de classe II présent à la surface des TILs, des cellules dendritiques et des macrophages. Cependant l'affinité du LAG3 pour le CMH de classe II est plus forte, et son site de liaison est distinct de celui du CD4. De plus, contrairement au CD4, LAG3 est exprimé à la surface du LT après son activation (Sierro et al., 2011). LAG3 inhibe les LT effecteurs et active l'effet immunosuppresseur des Treg.

IV.3. TIM3

T-cell immunoglobulin and mucin 3 (TIM-3) est une protéine membranaire, appartenant à la famille des TIM, découverte en 2002. Cette molécule de co-stimulation inhibitrice a initialement été identifiée sur les cellules T helper 1 (Th1). Sa liaison à son ligand (le principal étant galactine-9) induit l'apoptose du LT (Monney et al., 2002). Plus récemment, TIM-3 a été décrit à la surface de cellules de l'immunité innée (macrophages, monocytes, cellules dendritiques) et comme ayant un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire.

V. Place des immunothérapies modulatrices en cancérologie colorectale

Au cours d'une stimulation antigénique chronique, il a été montré que les lymphocytes T expriment des molécules de costimulation inhibitrices (MCI) à des niveaux élevés, entraînant ainsi une perte de fonctionnalité. Ces lymphocytes sont alors dans un état d'« épuisement » (exhaustion). La présence des MCI est le reflet d'une activation cellulaire antérieure (associée à un bon pronostic), mais la persistance de ces signaux inhibiteurs empêche l'action cytotoxique des lymphocytes vis à vis des cellules tumorales.

La compréhension de ces mécanismes a permis le développement d'une nouvelle classe de traitement en cancérologie : les anticorps inhibiteurs bloquant les MCI, induisant une réactivation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux. Ces médicaments révolutionnent actuellement la prise en charge thérapeutique en cancérologie. Les premiers essais cliniques de blocage ont débuté dans les années 2000. À ce jour, 4 anticorps monoclonaux bloquant CTLA-4 ou PD-1 ont obtenu un agrément clinique dans les mélanomes et les cancers du poumon.

Dans le cancer colorectal, en dépit d'une forte valeur prédictive de l'infiltrat immunitaire initial (Galon et al., 2006 ; Pagès et al., 2005 ; Pages et al., 2009), il ne semble pas exister de réponse clinique forte aux anti-CTLA-4 ou PD-1.

Il faut cependant noter une différence de réponse aux inhibiteurs des MCI en fonction du statut microsatellitaire de la tumeur. En effet, il existe deux sous-types de CCR : avec ou sans instabilité microsatellitaire. Lors des divisions cellulaires et de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase des erreurs sont commises. Ces erreurs sont plus fréquentes au niveau de séquences répétées appelées microsatellites et sont normalement corrigées par un système de réparation des mésappariements : MMR (Mismatch repair). Les tumeurs dont le système MMR est déficient présentent des mutations au niveau des microsatellites et sont qualifiées de tumeurs MSI (Microsatellite instability), les tumeurs dont le système MMR est intact sont appelées tumeurs MSS (Microsatellite stable). L'instabilité microsatellitaire dans les cancers colorectaux est secondaire à des mutations dans un des 4 gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) ou à l'hyperméthylation du promoteur de *MLH*. Ainsi de nombreuses protéines non fonctionnelles reconnues comme des antigènes du « non-soi » (néoantigènes) déclenchent une réponse anti-tumorale (Dudley et al., 2016). Il a été démontré une plus forte infiltration en TILs dans les cancers colorectaux MSI (Llosa et al., 2015 ; Tougeron et al., 2009). Les CCR MSI surexpriment au niveau de leurs TILs plusieurs MCI (PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, IDO) (Llosa et al., 2015).

Dans un essai récent de phase II évaluant l'efficacité clinique du pembrolizumab dans les cancers colorectaux métastatiques MSI et MSS en échec de traitement, Le et al. ont montré que les patients atteints de cancers colorectaux MSI avaient une très bonne réponse clinique au traitement par anti-PD-1 (Le et al., 2015). Actuellement, une étude de phase II (KEYNOTE-164, NCT02460198) et une étude de phase III (KEYNOTE-177, NCT02563002) évaluant l'efficacité du pembrolizumab dans les CCR MSI sont en cours afin de valider ces résultats préliminaires.

De plus, la charge mutationnelle est en cours d'évaluation comme biomarqueur prédictif de réponse aux anti-PD-1/PD-L1 dans les CCR (George et al., 2016).

Il faut cependant noter que seuls 5 % des cancers colorectaux présentent une instabilité micro-satellitaire.

Le faible taux de réponse aux anti-MCI des tumeurs non-MSI est à ce jour inexpliqué. D'autres mécanismes induisant l'anergie lymphocytaire pourraient être associés à l'épuisement des lymphocytes observé dans la majorité des tumeurs solides.

Aujourd'hui, certaines équipes tentent d'augmenter la sensibilité aux immunothérapies des tumeurs colorectales MSS. Une des stratégies actuellement envisagées afin de potentialiser les effets des anti-MCI est l'association des anti-MCI à la radiothérapie. En effet, des études préliminaires chez la souris ont montré un renforcement de l'effet anti-tumoral systémique (effet abscopal) en présence d'une association RCT + anti-MCI (Park et al., 2015). De nombreux essais cliniques sont en cours afin de tester cette hypothèse (NCT03104439 : association Nivolumab et Ipilimumab et radiothérapie ; NCT02437071 association Pembrolizumab et radiothérapie). Les modifications immunitaires induites par la radiothérapie, en particulier sur l'expression des MCI, ne sont pas encore bien caractérisées.

Dans des modèles animaux, l'inhibition de la voie MEK (MAPK/ERK) était associée à une surexpression des molécules de CMH de classe 1 à la surface des cellules tumorales, ainsi qu'à une augmentation de l'infiltration lymphocytaire dans le microenvironnement tumoral, aboutissant à une activité anti-PD-L1 accrue. Un essai clinique de phase II découlant directement de ces observations est actuellement en cours (NCT01988896), et associe un inhibiteur de MEK (cobimetinib) et un anti-PD-L1 (atezolizumab). Les premiers résultats encourageants chez les patients MSS ont été présentés à l'ASCO 2016 ; un essai de phase III évaluant cette combinaison est actuellement en cours dans les cancers colorectaux avancés MSS (NCT02788279).

VI. Objectifs de l'étude

Les objectifs de cette étude étaient :

- (i)** d'investiguer la faisabilité d'une analyse immunitaire sur les biopsies diagnostiques afin d'évaluer l'impact de la réaction immunitaire naturelle sur :
 - La réponse à la RCT
 - L'évolution clinique en termes de récurrence et de survie
- (ii)** d'évaluer l'impact clinique de la détermination de la composante immunitaire sur la prise en charge thérapeutique des patients présentant un cancer du rectum traité par RCT :
 - Stratégie de "Watch and Wait" : analyser l'apport de l'analyse de la réaction immunitaire naturelle pour mieux prédire les patients à inclure qui ne vont pas récidiver.
 - Association RCT + anti-MCI : analyser les modifications immunitaires induites par la RCT (en particulier des MCI et de leurs ligands) afin d'étudier le rationnel biologique de cette association.

Matériels et Méthodes

I. Cohortes et populations

Cinq cohortes rétrospectives de cancers du rectum traités par RCT ont été étudiées (Tableau 4). Pour la majorité des patients, le traitement consistait en une association de 5-FU et de 45 Gy de radiothérapie. Cependant il existait des variations inter-centres et intra-centres du protocole de RCT (Type de radiothérapie : radiothérapie externe, radiothérapie de contact, ainsi que type de chimiothérapie : 5-FU, Xeloda).

Une analyse de survie a été réalisée sur la cohorte de Belgique, la médiane de suivi des patients était de 55 mois (1-180 mois).

Cohortes	Nombre de patients		Date d'inclusion	Stades TNM (n)	Matériel	Analyses réalisées
COHORTES RCT + TME	Belgique	204	1999-2012	I : 1	Coupe FFPE biopsie et pièce opératoire (4µm et 20 µm)	- Immunohistochimie (CD3, CD8)
				II : 21		- Analyses
				III : 60		transcriptomiques
				IV : 16		(Nanostring)
COHORTES RCT + TME	Roumanie	45 (13 cas sans RCT)	2013-2014	I : 2	Coupe FFPE biopsie et pièce opératoire (4 µm et 20 µm)	- Immunohistochimie (CD3, CD8, PD1, PD-L1, LAG-3, TIM3)
				II : 4		- Analyses
				III : 37		transcriptomiques
				IV : 3		(Nanostring)
COHORTES « WATCH AND WAIT »	Brésil	36	2008-2012	I : 4	Coupes FFPE biopsies (4 µm)	-Immunohistochimie (CD3, CD8)
				II : 10		
				III : 18		
				IV : 1		
	Argentine	18	2008-2016	I : 4	Coupes FFPE biopsies (4 µm)	-Immunohistochimie (CD3, CD8)
				II : 3		
				III : 11		
				IV : 0		
France (Nice)	20	2002-2014	NA	Coupes FFPE biopsies (4 µm)	-Immunohistochimie (CD3, CD8)	
France (Poitiers)	2	2002-2004	I : 1	Coupes FFPE biopsies (4 µm)	-Immunohistochimie (CD3, CD8)	
			II : 0			
			III :1			
			IV :0			

Tableau 4 : Descriptif des cohortes analysées

II. Immunohistochimie

Les coupes de 4 microns de biopsies et de pièces opératoires ont été immunomarquées, numérisées et quantifiées sur la plateforme d'Immunomonitoring de l'HEGP. Après avoir été placées à l'étuve sèche à 56 °C pendant 12 h, les lames ont été immunomarquées sur l'automate Benchmark XT (Roche Ventana) avec l'anticorps CD3 et CD8 suivant les protocoles déjà mis au point sur la plateforme (Tableau 2).

Les protocoles de marquage des molécules PD-1, PD-L1, TIM3 et LAG3 ont été mis au point sur automate Benchmark (Tableau 5) à partir de protocoles réalisés au laboratoire en technique manuelle.

L'objectif était d'obtenir un marquage de bonne intensité et spécifique avec un minimum de bruit de fond afin de quantifier ces marquages avec un logiciel d'analyse d'image dédié (Developer XD, Definiens). Les anticorps primaires ont été révélés avec le kit Ultra-View DAB (Ventana) constitué d'un cocktail d'anticorps secondaires couplés à des enzymes (HRP). Les complexes néoformés ont ensuite été révélés à l'aide d'un substrat (peroxyde d'hydrogène) et un chromogène (3,3'-diaminobenzidine-tétrahydrochloride, DAB) qui produisent un précipité marron. Un kit d'amplification (Amplification kit, Roche, Ventana) a été utilisé suivant les recommandations du fournisseur, afin d'accroître l'intensité du signal des marquages PD-1, PD-L1, TIM3 et LAG3. Des contrôles positifs (tissus contrôles de ganglion et de placenta) et négatifs (Ig de même isotype à la même concentration finale que l'anticorps primaire) ont été effectués pour chaque marqueur mis au point.

Marqueurs	Clone	Dilution	[finale]	Démasquage	Incubation	Révélation	Amplification (Kit Amplificatio, Roche, Ventana)	Coloration
CD3	2GV6 Ventana	Ready to use	0,4 µg/ml	CC1 pH8,4 ; 60 min	20 min 37 s °C	UltraviewDAB	Non	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.
CD8	C8/144B DAKO	1/50	3 µg/ml	CC1 pH 8,4 ; 60 min	32 min 37 s °C	UltraviewDAB	Non	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.
PD-1	NAT 105 Roche, E3L1	Ready to use	2,21 µg/ml	CC1 pH 8,4; 30 min	30 min 37 °C	UltraviewDAB	Oui	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.
PD-L1	Cell Signaling	1/100	10 µg/ml	CC2 pH 6 ; 60 min	60 min 37 °C	UltraviewDAB	Oui	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.
LAG3	11E3 AbCAm	1/2000	0,5 µg/ml	CC1 pH 8,4 60min	60 min 37 °C	UltraviewDAB	Oui	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.
TIM3	D5R5 CellSignaling	1/400	1 µg/ml	CC1 pH 8,4 ; §à min	60 min 37 °C	UltraviewDAB	Oui	Hematoxilline II 4 min. Bluing reagent 4 min.

Tableau 5 : Protocoles d'immunomarquage sur automate Benchmark XT (Roche)

III. Numérisation et quantification de l'infiltrat immunitaire

Les lames immunomarquées ont ensuite été numérisées 48 h après l'immunomarquage avec un scanner haute résolution (Scanner Hamamatsu Nanozoomer HT2.0) au grossissement 20x, et une résolution de 0,45 $\mu\text{m}/\text{pxl}$.

La quantification de l'infiltrat immunitaire (CD3, CD8, PD-1, TIM3 et LAG3) a été effectuée sur le logiciel Developer XD de la société Definiens, à l'aide du module « immune-reaction » développé par l'équipe.

Ce module permet une analyse de l'ensemble du tissu sélectionné suivant un comptage par tuiles (Figure 8) en calculant (i) le nombre de cellules immunomarquées (ii) la surface tissulaire (iii) la densité de cellules immunomarquées (iv) la moyenne et la médiane d'intensité de marquage des cellules détectées, représentées suivant un histogramme.

Analyse des biopsies : seule la zone tumorale de la biopsie, préalablement délimitée par un anatomopathologiste a été prise en compte pour la quantification immunitaire. La zone tumorale est ensuite divisée automatiquement en tuiles par le logiciel pour la quantification immunitaire. Une étape de validation de chaque tuile a été réalisée avec si besoin une correction manuelle de la détection erronée de cellules immunomarquées (marquage faux-positif : nécrose) (Figure 8).

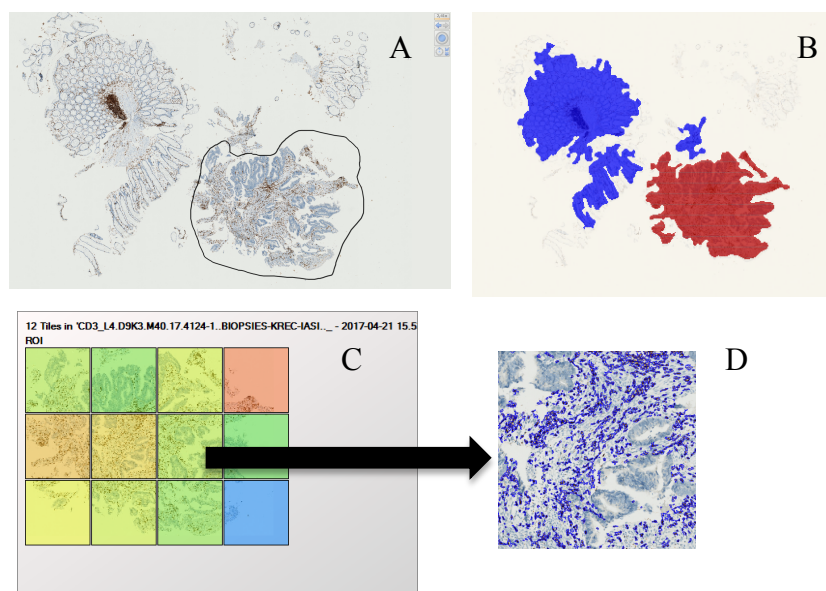


Figure 8 : Exemple d'analyse par le logiciel d'image Definiens. A. Délimitation de la zone tumorale par un anatomopathologiste B. Délimitation de la zone tumorale (rouge) sur le logiciel Definiens C. Cartographie de la densité (bleu = densité minimale, rouge=densité maximale) D : Détection des cellules immunomarquées (bleu) sur une tuile par le logiciel d'analyse d'image.

Analyse des pièces opératoires : une délimitation de la zone tumorale restante post-RCT a été réalisée avec l'aide d'un anatomopathologiste afin d'être prise en compte pour l'analyse. En présence de réponse complète à la RCT, l'ensemble du tissu résiduel (dépourvu de cellule tumorale) a été analysé.

Le marquage diffus et peu intense en PD-L1 des tissus tumoraux du rectum n'a pas permis de réaliser une quantification par le logiciel d'analyse d'image, un score semi-quantitatif a été appliqué en prenant en compte l'intensité du marquage des cellules marquées et la quantité de cellules tumorales et immunitaires marquées (données non incluses).

IV. Étude de l'expression de gènes, technologie Nanostring

Afin de procéder à l'analyse d'ARN extrait de tissus inclus dans la paraffine (FFPE) par nCounter, des coupes de 20 µm issues de blocs tumoraux FFPE de pièces opératoires (cohorte de Roumanie et de Belgique) ont été réalisées dans des conditions « RNase-free » nécessitant le port de gants, masques et un nettoyage des instruments au RNase AWAY (ThermoFisher). Les zones tumorales ont été prélevées dans des conditions RNase-free au scalpel après le repérage de celles-ci sur une coloration Hematoxyllin Eosine Safran (HES) de coupe tumorale adjacente, avec l'aide d'un anatomopathologiste. Après une étape de déparaffinage de 5 min dans du Clearan, la coupe a été déshydratée dans 2 bains successifs d'alcool absolu (5 minutes x2).

L'extraction d'ARN a été effectuée avec le kit d'extraction RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion) en suivant les recommandations du fabricant.

La quantité et la qualité des ARNm extraits ont été évaluées (i) au spectrophotomètre NanoDrop2000 (quantification totale des acides nucléiques extraits), (ii) au fluoromètre Qubit 3.0 avec le kit RNA BR Assay kit (InvitrogenTM) pour la quantification de l'ARN (iii) avec le kit dsDNA HS Assay Kit (InvitrogenTM) pour quantifier la contamination en ADN et enfin (iv) par puce Agilent RNA 6000 Nano Kit sur le bioanalyseur Agilent 2100 pour l'évaluation de la quantité et de la qualité des ARNm extraits. L'ARN extrait a été analysé par nCounter Analysis System (Nanostring). Cette technologie nécessite une faible quantité d'ARN extraits (100 ng d'ARN total purifié) pouvant être obtenue à partir d'une coupe unique issue d'un bloc inclus dans la paraffine. Cette technologie repose sur deux sondes conçues spécifiquement pour chaque cible (gène) d'intérêt. La sonde de capture, non spécifique, est couplée à la biotine et sera utilisée pour immobiliser les molécules d'intérêt sur le support dédié au comptage. La deuxième sonde « rapporteur », spécifique du gène d'intérêt

contient une succession de 6 fluorochromes de 4 couleurs différentes, réalisant ainsi un code-barre propre à chaque molécule d'intérêt.

Cette technologie ne nécessitant ni transcription-inverse, ni enzyme, ni étape d'amplification, elle permet l'analyse de faible quantité de matériel biologique et assure une très grande sensibilité. La première étape de l'analyse consiste en l'hybridation de sondes préalablement conçues sur l'ARN extrait, pendant au minimum 16 heures à 65 °C. Les complexes sondes-cibles sont ensuite alignés et immobilisés afin de procéder à la lecture du code-couleur (nCounter).

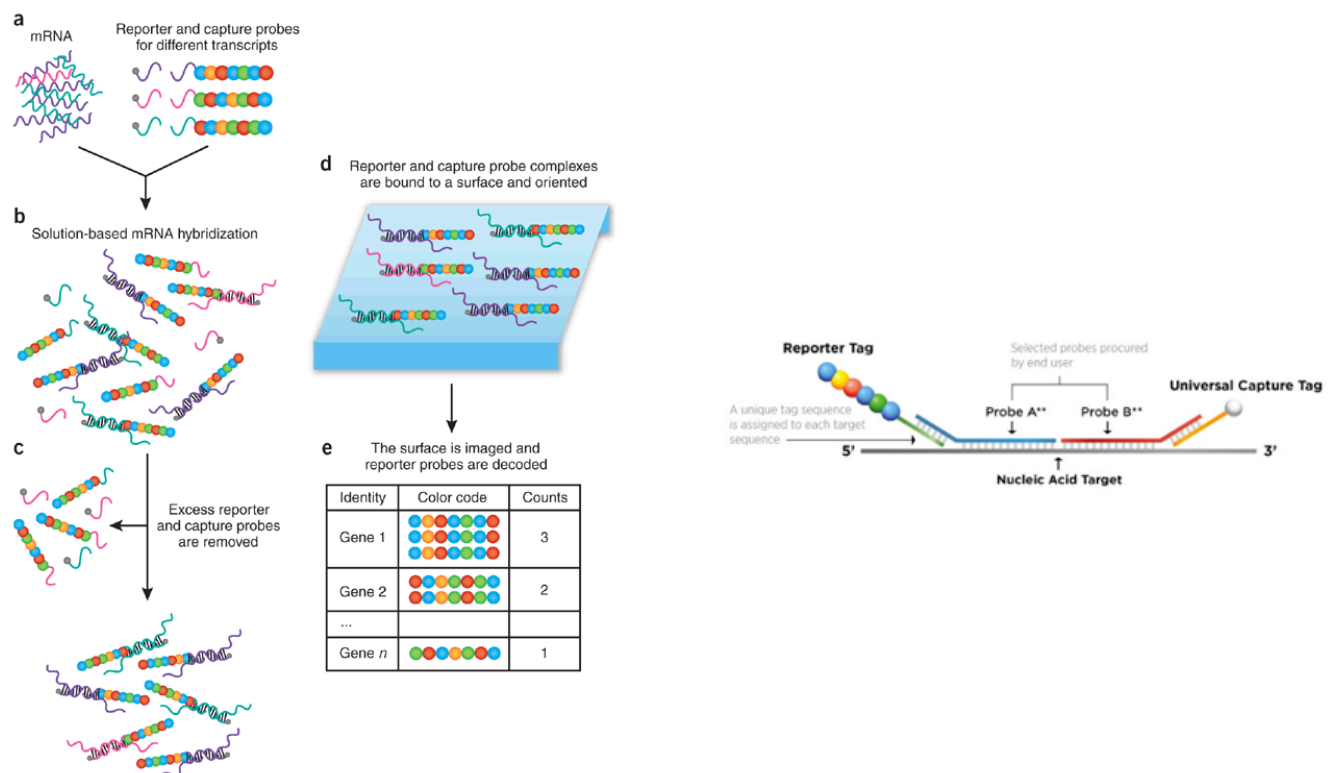


Figure 9 : Technologie NanoString. Après l'hybridation de la sonde de capture et de la sonde rapporteur, il y a formation d'un complexe possédant un code de couleur spécifique et se trouvant en solution. (Fortina and Surrey, 2008)

Pour cette analyse un panel de 48 gènes a été utilisé. Ce panel a été sélectionné à partir de travaux réalisés au sein de notre équipe sur la valeur pronostique de gènes immunitaires exprimés dans le cancer colorectal. Il regroupe principalement des gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GNLY*, *GZMA*, *CD8*), l'activation (*ICOS*, *CD69*), la costimulation positive ou négative (*CD274*, *PDCD1*, *LAG3*, *CTLA-4*), l'orientation Th1 (*TBX21*, *STAT4*), Th17 (*IL17*), le chimiotactisme des monocytes/macrophages (*CCR2*, *CCL2*, *CCL5*) ainsi que 4 gènes de ménage (*ACTB*, *GUSB*, *SP2*, *VPS33B*).

Ces gènes sont résumés dans le Tableau 6.

Les résultats ainsi obtenus ont ensuite été analysés grâce au logiciel nSolver™ Analysis Software 3.0.

V. Analyses statistiques

Des tests paramétriques (Student t-test, $n > 30$) et non paramétriques (test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $n < 30$) ont été réalisés afin de déterminer les marqueurs significativement associés à une bonne réponse à la RCT.

Les courbes de Kaplan-Meier ont été utilisées afin d'illustrer l'influence des critères immunologiques sur la survie sans récives (DFS) et la survie globale (OS). La significativité de ces paramètres a été calculée à l'aide du test log-rank.

Nous avons ensuite définis les valeurs seuils de densité à la médiane de la cohorte et aussi après détermination du cut-off optimal de discrimination des patients fortement infiltrés (Hi) et faiblement infiltrés (Lo). Les valeurs de p pour les cut off optimaux ont été pondérées par un facteur de correction de Altman (Altman et al., 1994).

Le modèle multivarié de Cox a été appliqué afin de calculer les « hazard ratio » (HRs). Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative. Toutes les analyses ont été faites à l'aide du logiciel R et Graphpad.

GÈNE	FONCTION	GÈNE	FONCTION	GÈNE	FONCTION	GÈNE	FONCTION
<i>CCL2</i>	Chimiokine chimioattractive pour les monocytes, lymphocytes et les PNB	<i>CD247= CD3 zeta chain</i>	COMPLEXE CD3	<i>IL15</i>	Régulation de l'activation et de la prolifération T et NK	<i>STAT1</i>	Facteur de transcription activé par IFN-γ
<i>CCL5</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes T et les PNB et les PNE	<i>CD3D</i>		<i>IL17A</i>	Th17	<i>STAT4</i>	Facteur de transcription TH1
<i>CCR2</i>	Récepteur de CCL2	<i>CD3E</i>		<i>TNFRSF9 =CD137</i>	Molécule de costimulation lymphocytes T	<i>IHH (Indian hedgehog homolog)</i>	Régulation développement T
<i>CX3CL1</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes T et les monocytes	<i>CD3G</i>		<i>CD274 = PD-L1</i>	Molécule de costimulation inhibitrice	<i>IRF1 (Interferon regulatory factor 1)</i>	facteur de transcription , rôle dans l'activation de p53
<i>CXCL10</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes T, NK, les cellules dendritiques, rôle dans l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales	<i>CD103 = ITGAE</i>	Integrine, rôle dans le homing des lymphocytes T au niveau intestinal	<i>CTLA4</i>		<i>LTK (Leukocyte receptor tyrosine kinase)</i>	Rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire
<i>CXCL11</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes T activés	<i>CD8A</i>	Cytotoxicité	<i>ICOS</i>		<i>PROM1 (prominin-1)=CD133</i>	glycoprotéine cellule souche hématopoïétique
<i>CXCL9</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes T	<i>GNLY</i>		<i>LAG3</i>		<i>REN</i>	Activation du système rénine angiotensine
<i>CXCR3</i>	Récepteur des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11	<i>GZMA/B/H/K/M</i>		<i>PDCD1</i>		<i>TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)</i>	Rôle dans la maturation des lymphocytes T
<i>PF4 (Platelet Factor 4)</i>	Chimiokine chimioattractive pour les PNN, Monocytes, fibroblastes	<i>PRF1</i>		<i>TNFRSF18 =GITR</i>		<i>VEGF</i>	Facteur de croissance rôle dans l'angiogenèse
<i>CXCL13</i>	Chimiokine chimioattractive pour les lymphocytes B	<i>CD69</i>	Marqueur d'activation T et NK	<i>IFNG</i>	Th1		
				<i>TBX21</i>			

Tableau 6 : Gènes analysés par la technologie Nanostring

Résultats

I. Représentativité des populations immunitaires évaluées sur des biopsies de cancer du rectum

La représentativité de l'infiltrat immunitaire estimé sur les biopsies diagnostiques a été évaluée en référence à celle observée sur les pièces opératoires de ces mêmes tumeurs du rectum (n=12) non traitées par RCT. En moyenne, la surface tumorale d'une biopsie représentait 12 % de la surface tumorale d'une coupe d'anatomopathologie issue de la pièce opératoire correspondante (Figure 10 A). Les densités en LT CD3+ et en LT CD8+ des biopsies comparées aux densités observées sur les coupes tumorales issues des pièces opératoires des mêmes patients étaient comparables ($p>0,05$) (Figure 10 B).

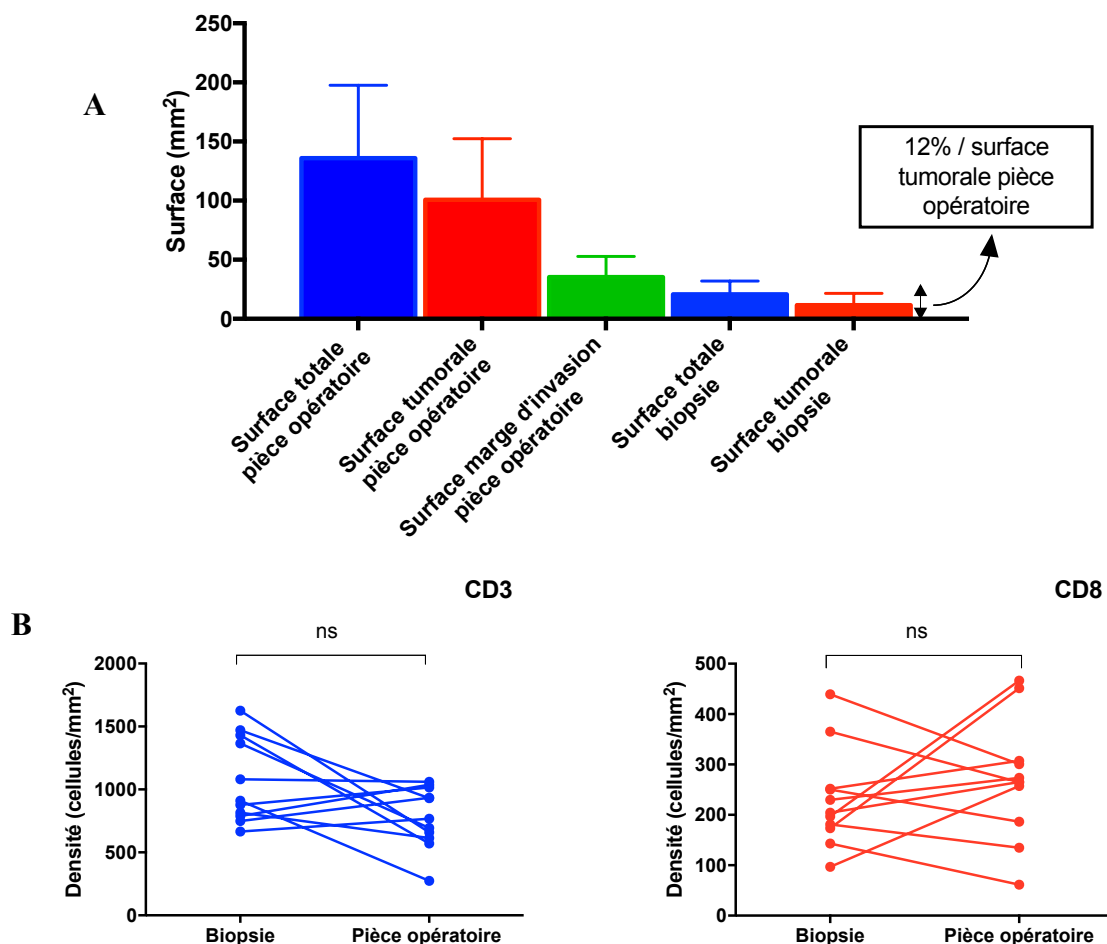


Figure 10 : Représentativité des populations immunitaires évaluées sur biopsie. A- Surfaces totale (= tumorale + marge d'invasion) et tumorale obtenues sur une lame d'un bloc tumoral inclus en paraffine (pièce opératoire) en comparaison d'une lame de biopsie sur 12 cas de cancers du rectum non traités par RCT. B- Comparaison des densités en CD3 (bleu) et en CD8 (rouge) observées dans les régions tumorales des biopsies et des coupes tumorales de pièce opératoire correspondantes ($p>0,05$).

II. Infiltration immunitaire et prédiction de la réponse à la RCT

Deux cent quatre patients présentant un cancer du rectum traité par RCT de la cohorte rétrospective « Belgique » ont été analysés. Les caractéristiques de la cohorte sont résumées dans le Tableau 7.

		Effectif (n)	Pourcentage (%)
Sexe	Femme	55	36
	Homme	99	64
Âge moyen (ans)	65		
Localisation	Haut rectum	31	20
	Moyen rectum	45	29
	Bas rectum	78	51
cTNM	I	1	1
	II	21	14
	III	60	39
	IV	16	10
	NA	56	36
Dworak	0	4	3
	1	32	21
	2	55	36
	3	38	25
	4	14	9
	NA	11	7

Tableau 7 : Caractéristiques principales de la cohorte de Belgique étudiée en IHC. cTNM : clinical TNM évaluation clinique de la progression tumorale avant tout traitement. . N/A : non disponible (not available).

Après relecture histologique des biopsies par un anatomopathologiste (Dr C. Lagorce), 50 patients ont été exclus, car les biopsies disponibles correspondaient à des zones de dysplasie, seules les biopsies présentant une zone tumorale ont été analysées.

Les immunomarquages des biopsies pour CD3 et CD8 ont été numérisés puis quantifiés par un programme d'analyse d'image dédié (Definiens®).

La détermination de la densité en LT CD3+ et LT CD8+ des zones tumorales a été réalisée par le calcul de la densité globale sur l'ensemble de la zone tumorale.

Une grande variabilité de densité moyenne d'infiltration immunitaire entre les patients était observée pour CD3 (min=10.1 – max=6291 cellules/mm²) et CD8 (min=3.2 – max=3017 cellules/mm²).

La densité en CD3 et CD8 n'était pas associée à l'âge (< 65 ans et > 65 ans), au sexe ou à la localisation de la tumeur (haut, moyen et bas rectum) (t-test > 0,05 ; données non incluses).

Une corrélation significative était observée entre la densité immunitaire moyenne en CD3 (Figure 11) et CD8 et la réponse à la RCT évaluée selon le score de Dworak (groupe non répondeur (Dworak 0-1), moyenne = 1316/mm² vs groupe répondeur (Dworak 3-4), moyenne = 1814/mm² ; CD3 $p=0,0257$, Test Mann Whitney).

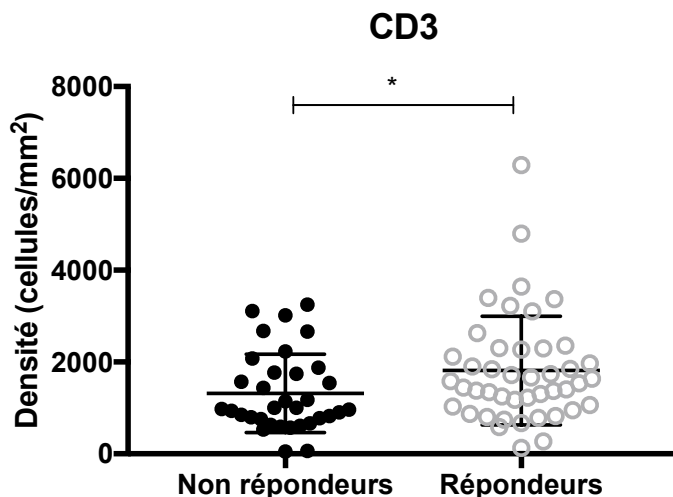
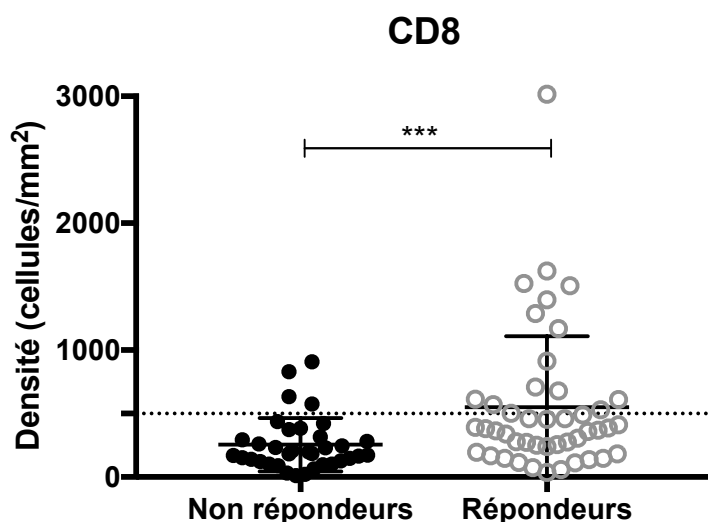


Figure 11 : Comparaison des densités moyennes en lymphocytes CD3+ et CD8+ sur l'ensemble de la zone tumorale des biopsies de patients non répondeurs (n=35) à la RCT néoadjuvante (Dworak 0-1) et bons répondeurs (n=45) (Dworak 3-4). CD3+ $p=0,0257$, test de Mann-Whitney



	Répondeurs	Non répondeurs	Total
Test positif (densité CD8+> 500/mm ²)	15	4	19
Test négatif (densité CD8+< 500/mm ²)	30	31	61
Total	45	35	80

Tableau 8 : Tableau de contingence évaluant la densité en CD8 sur la biopsie diagnostique comme test prédictif de réponse à la RCT néoadjuvante. Seuil fixé à 500 cellules/mm². Se=33% ; Sp=89% ; VPP=79%, VPN=51%. *** $p<0,001$.

Au vu des résultats obtenus, une densité supérieure à 500 cellules CD8+/mm² sur les biopsies diagnostiques permettait de prédire une bonne réponse à la RCT (Tableau 8).

De la même façon, la densité en CD3 (Figure 12) et en CD8 (données non incluses) sur les biopsies diagnostiques était significativement corrélée à la classification ypTNM (TNM déterminé sur la pièce opératoire après RCT). Les cancers les plus invasifs post-RCT, de stade ypTNM IV, présentaient une densité immunitaire significativement inférieure à celle observée pour tous les autres stades.

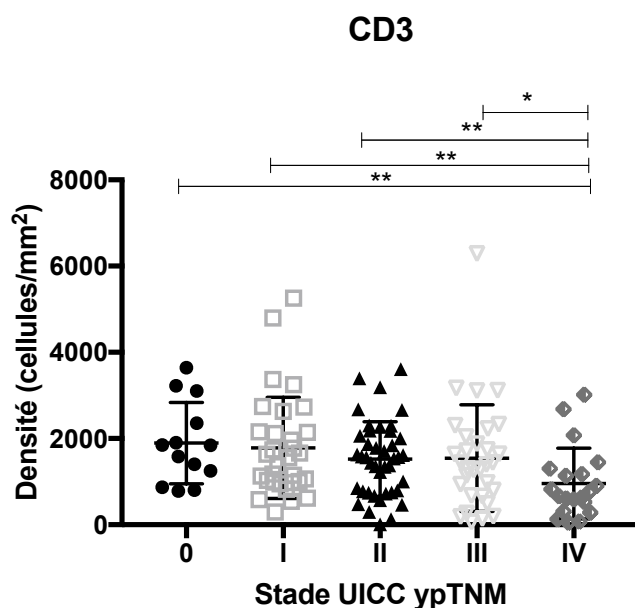


Figure 12 : Comparaison des densités moyennes en lymphocytes CD3+ selon le stade ypTNM des patients traités par RCT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Test de Mann-Whitney

Ainsi, une bonne réponse initiale à la RCT pouvait s'observer en l'absence de forte infiltration immunitaire initiale. Cependant, une forte infiltration immunitaire T CD3 et CD8 avant traitement augmentait la probabilité de bonne réponse à la RCT.

III. Modifications immunitaires induites par la RCT

La corrélation entre la réponse à la RCT et la qualité de la réaction immunitaire naturelle intratumorale suggérait une activité de la RCT sur la composante immune, nous incitant à évaluer l'influence de la RCT sur les populations immunitaires.

III.1 Analyses d'expression de gènes immunitaires par la technologie Nanostring

L'ARN de 76 tumeurs du rectum traitées ($n=63$, cohorte Roumanie et Belgique) ou non ($n=13$, cohorte Roumanie) par une RCT néoadjuvante a été extrait à partir de coupes tissulaires épaisses (20 microns) issues des blocs tumoraux fixés en formol et inclus en paraffine.

La concentration moyenne d'ARN obtenue évaluée selon la méthode Agilent était de 113ng/ μ L (min=8 ng/ μ L – max=856 ng/ μ L).

Le pourcentage d'ARN extraits de plus de 300 paires de bases (peu dégradés) et la quantité totale d'ARN extraits étaient similaires entre les tumeurs traitées ou non traitées par RCT (Figure 13).

On note une diminution significative de la concentration d'ARN en fonction du degré de réponse à la RCT (concentration moyenne ARN Dworak 0 = 393 ng/μL, concentration moyenne ARN Dworak 4 = 81 ng/μL), ceci peut être expliqué par le fait que les réponses complètes sont le plus souvent constituées d'un reliquat fibreux avec une cellularité pauvre.

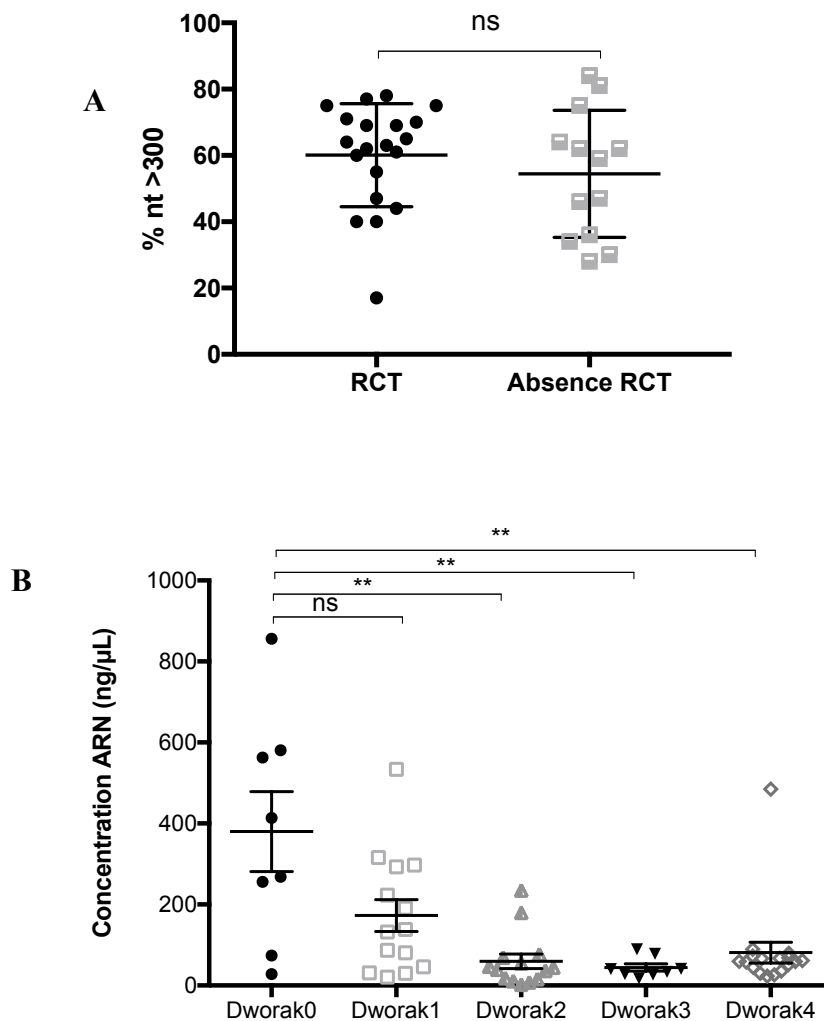


Figure 13 : **A**- Comparaison du pourcentage d'ARN extraits supérieures à 300 nucléotides, mesuré sur puce Agilent pour des tumeurs traitées (noir) ou non par RCT (gris). **B**- Concentration d'ARN extraits en fonction du stade Dworak.

Dans un premier temps, nous avons comparé le niveau d'expression des 48 gènes « immunitaires » du panel chez 45 patients de la cohorte roumaine (32 patients traités par RCT et 13 patients non traités par RCT).

Dix-huit gènes parmi les 48 étaient significativement plus exprimés dans les tumeurs post-RCT. Les gènes codant en particulier des protéines impliquées dans la cytotoxicité (*GNLY*, *GZMA*, *GZMK*, *GZMH*, *GZMM*, *PRF1*), dans la réponse Th1 (*CX3CL1*, *IFN γ* , *TBX21*) et dans l'activation T (*CD69*) étaient significativement plus exprimés dans le groupe traité par de la RCT par rapport au groupe non traité. Une représentation hiérarchique non supervisée (clustering) portant sur ces 18 gènes immunitaires permettait d'individualiser le groupe de patients n'ayant pas reçu de RCT ainsi qu'un groupe de patients tous bons répondeurs à la RCT (Dworak3-4) (Figure 14).

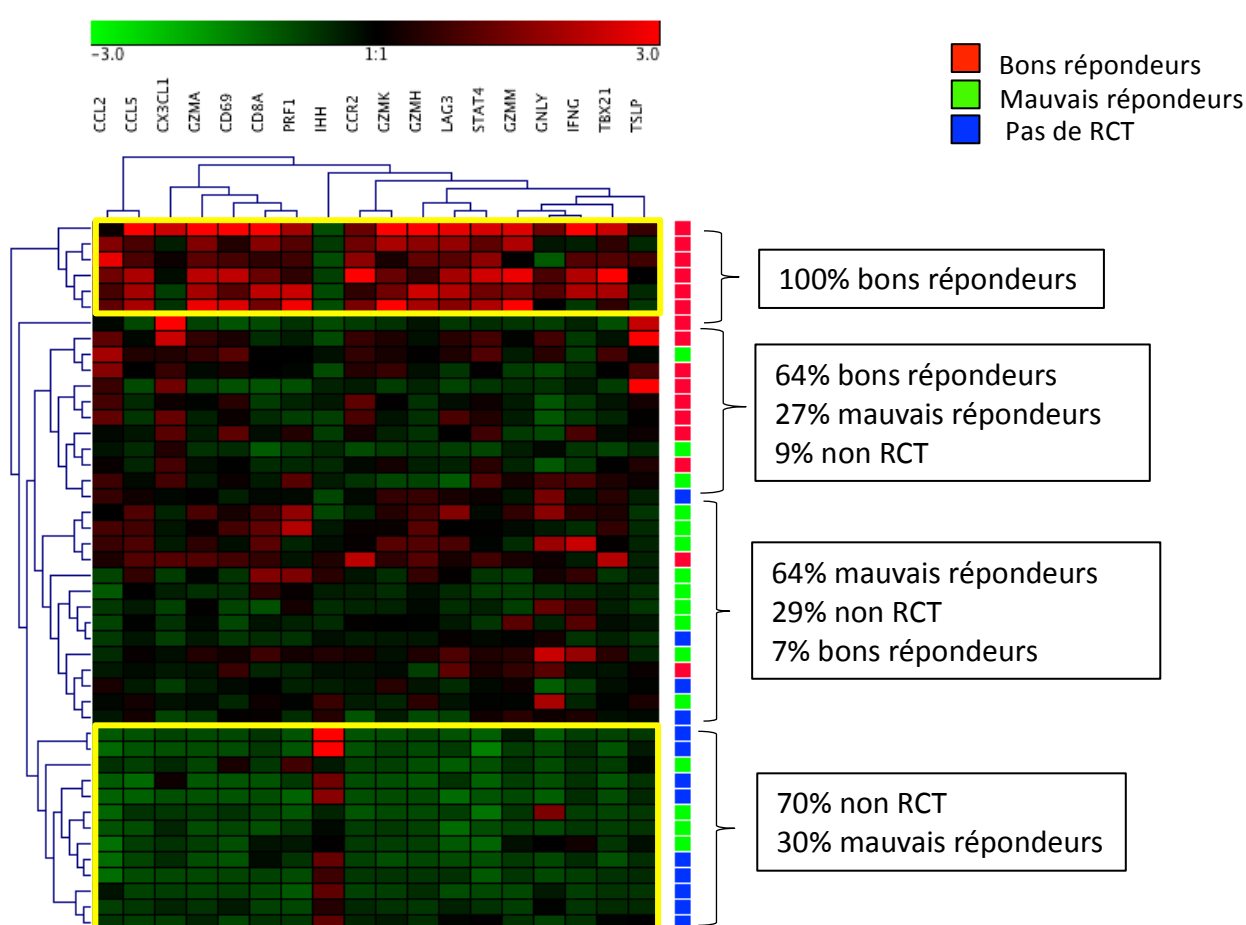


Figure 14 : : Expression intra-tumorale du niveau de gènes pour 32 patients traités par RCT et 13 patients non traités par RCT. 18 gènes sur les 48 analysés étaient différemment exprimés (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$) entre les 2 groupes de patients. Un clustering hiérarchisé non supervisé de ces gènes a été réalisé. Parmi les différents clusters, on note un cluster composé de la majorité des patients sans RCT et un cluster composé de patients très bons répondeurs à la RCT (Dworak 3-4).

III.2 Profil d'expression des gènes associés à une bonne réponse à la RCT

La comparaison du niveau d'expression de gènes immunitaires entre les tumeurs ayant (Dworak 3-4) ou non (Dworak 0-1) répondu à la RCT a révélé l'existence d'une augmentation significative du niveau d'expression de gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GZMB*, *GZMK*, *GZMM*), dans la réponse Th1 (*TBX21*, *STAT4*), dans l'activation T (*ICOS*, *CD69*), ainsi que des gènes codants pour des MCI (*LAG3*) chez les patients répondeurs. Le VEGF était quant à lui significativement plus faiblement exprimé chez les patients répondeurs (Figure 15). Au total 17 gènes avaient une expression significativement différente entre les deux groupes.

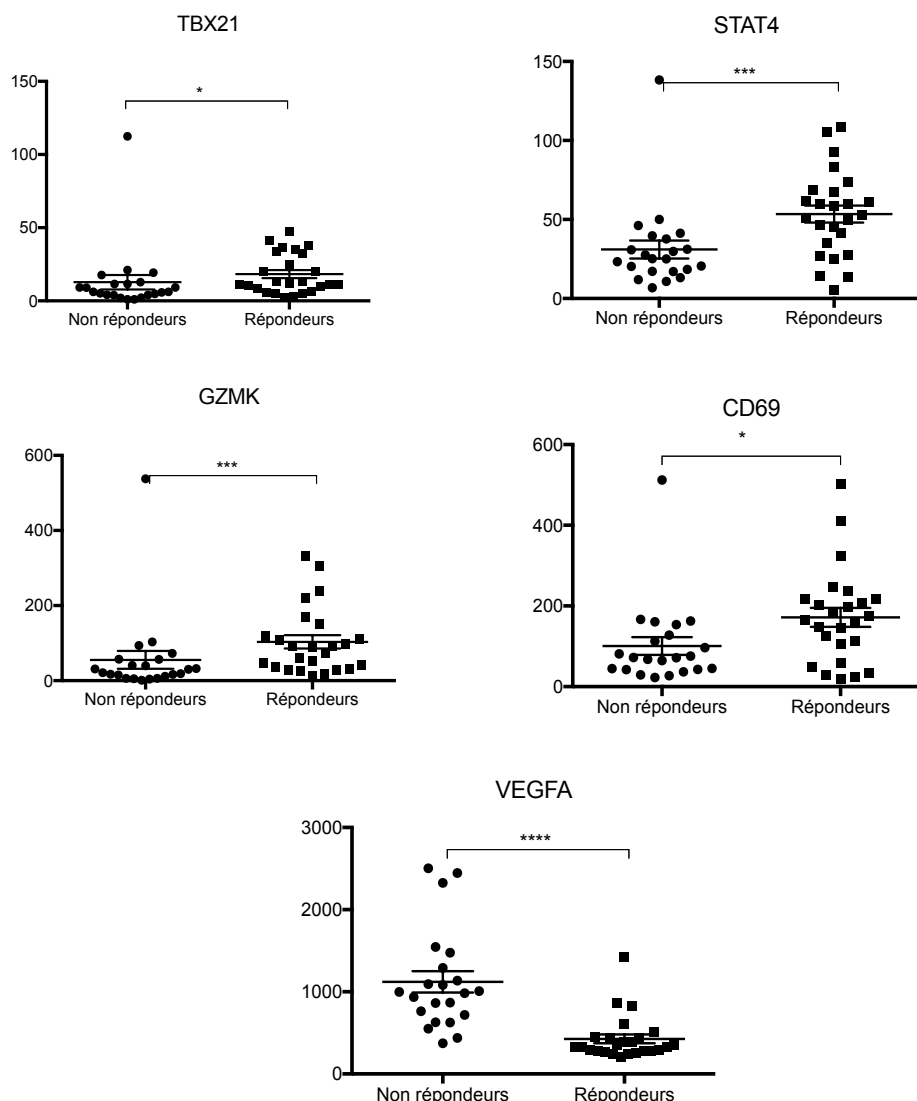


Figure 15 : Comparaison du niveau d'expression de gènes immunitaires entre les patients non répondeurs (Dworak 0-1) et répondeurs (Dworak 3-4). Les gènes impliqués dans l'orientation Th1 (*TBX21*, *STAT4*), l'activation lymphocytaire (*CD69*), la cytotoxicité (*GZMK*) étaient significativement plus exprimés chez les répondeurs. Le *VEGFA* était quant à lui plus exprimé chez les non-répondeurs. Test de Mann-Whitney, $p < 0,05$

Une analyse en matrice de corrélation du niveau d'expression de tous les gènes analysés 2 à 2 a montré la présence de groupes de gènes co-modulés au sein des tumeurs répondant à la RCT. Parmi ceux-ci se distinguait un cluster composé de gènes Th1 cytotoxiques (*CD8*, *GZMM*, *CCL5*, *GZMA*, *GZMB*, *GZMK*, *GZMM*, *CD3G*, *CD3D*, *TBX21*, *PRF1*) et des MCI : *PD-L1* (*CD274*), *PD-1*, *CTLA-4* et *LAG-3*. Le niveau d'expression de ces gènes, en particulier des MCI, était inversement corrélé à celui de la *TSLP* (Thymic stromal lymphopoietin) et du *VEGFA* (Figure 16), pour les tumeurs répondant ou non à la RCT.

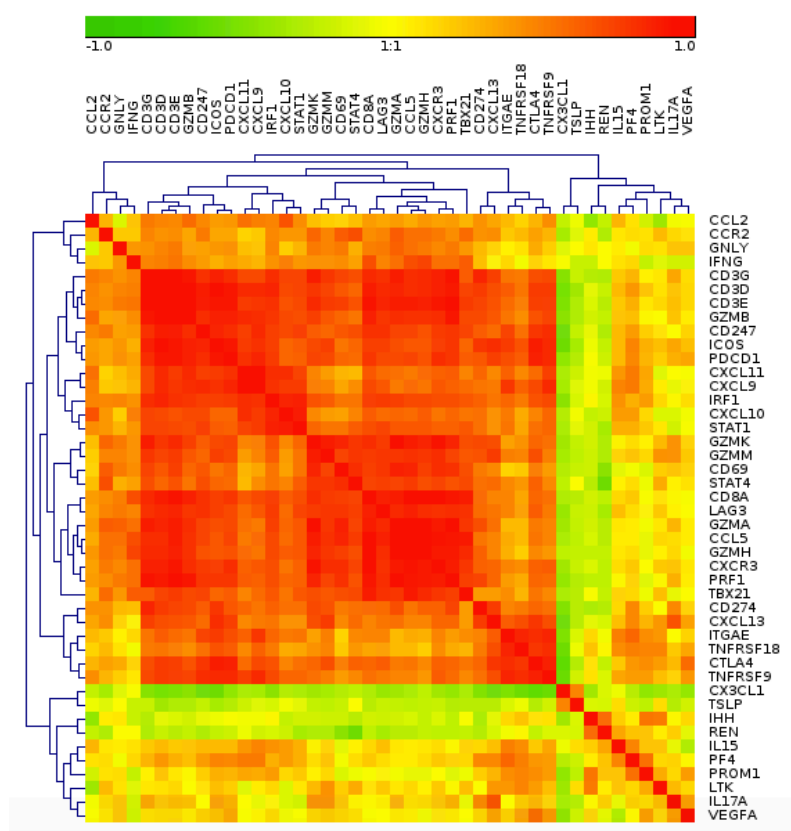


Figure 16 : Matrice de corrélation générée chez les patients bons répondeurs à la RCT. Des analyses de corrélation parmi les 48 gènes ont été faites à l'aide du logiciel Genesis. La matrice de corrélation suivie d'un clustering hiérarchique non supervisé (méthode de Pearson) est représentée d'un $r=-1.0$ (corrélation négative, vert) à $r=1.0$ (corrélation positive, rouge).

IV. Évaluation de la modulation des MCI post RCT

Les résultats du transcriptome suggéraient que les niveaux d'expression des MCI pouvaient être augmentés par la RCT en particulier en présence d'une bonne réponse au traitement. Nous avons donc cherché à évaluer la traduction protéique potentielle de ces observations par la technique d'immunohistochimie sur coupe tumorale.

L'analyse de la densité des MCI (PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3) a été effectuée sur 12 cancers colorectaux non traités par RCT et sur 22 cancers du rectum traités par RCT.

Les molécules LAG-3 (Figure 17), PD-1 (Figure 18), et TIM3 (données non illustrées) étaient significativement plus exprimées chez les patients traités par RCT.

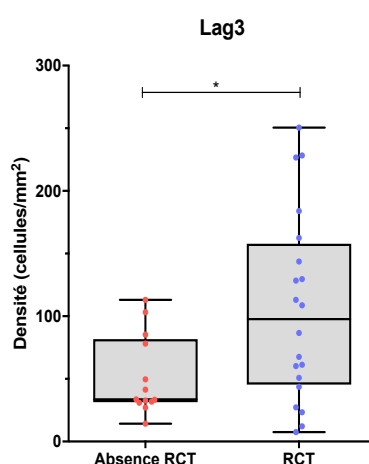
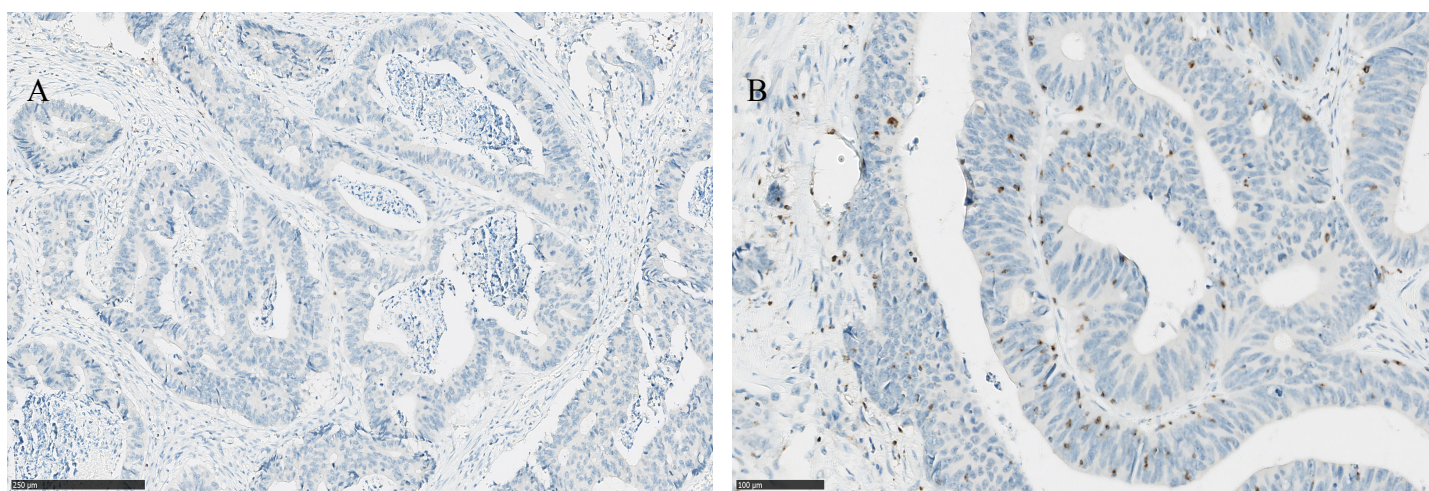


Figure 17 : Comparaison du marquage immunohistochemique de LAG-3 d'un cancer du rectum non traité par RCT (A : densité= 85/mm²) et traité par RCT (B : densité =226/mm²). Grossissement x200. C- Densité en cellules LAG3+ de tumeurs (n=35) traitées ou non par la RCT. * p<0,05 test de Mann et Whitney.

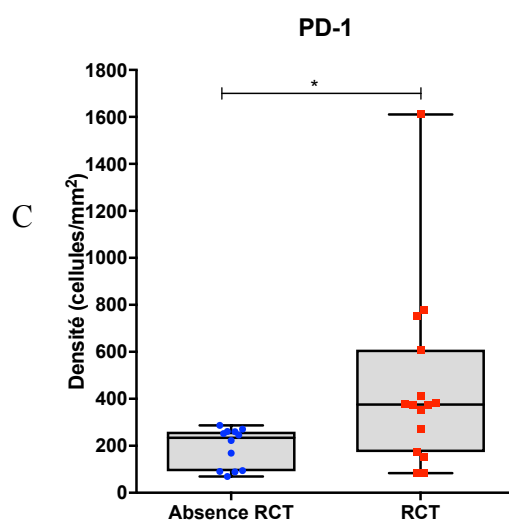
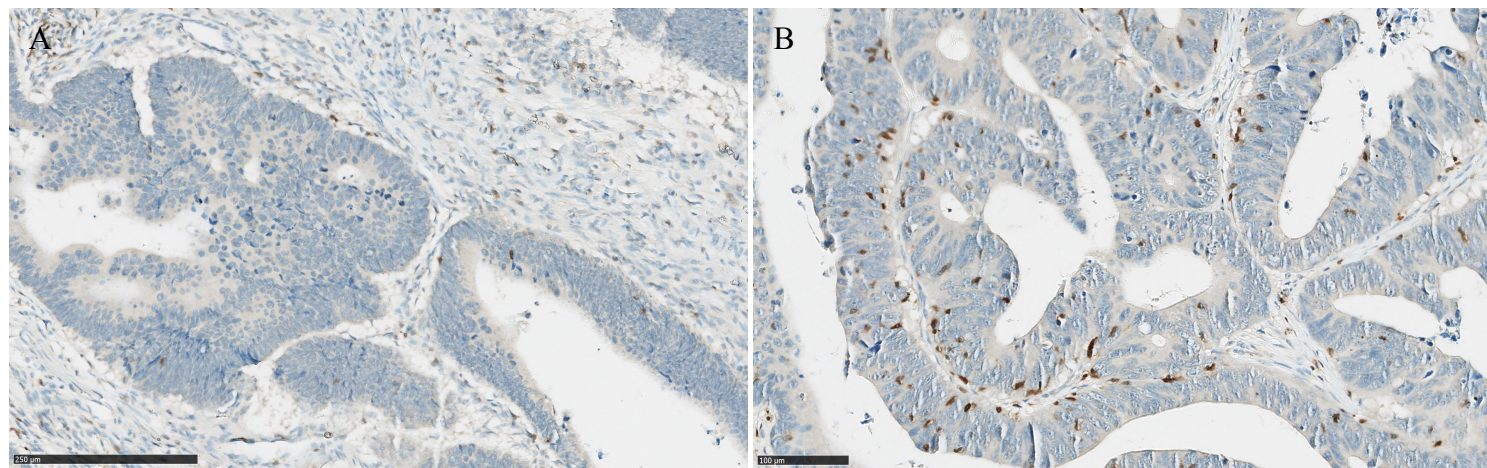


Figure 18 : Comparaison du marquage immunohistochimique de PD-1 d'un cancer du rectum non traité par RCT (A : densité = 168/mm²) et traité par RCT (B : densité = 382/mm²). Grossissement x200. C- Densité en cellules PD-1 de tumeurs (n=15) traitées ou non par la RCT (n=12). * p<0,05 test de Mann et Whitney.

V. Infiltrat immunitaire et données de survie

V.1 L'infiltrat immunitaire prédit la DFS

Une corrélation entre la densité immunitaire des biopsies diagnostiques et les données de survie sans récurrence (DFS) des patients (n=144) traités par RCT a été recherchée après détermination du seuil de densité optimal en CD3 et CD8 pour la discrimination des patients forts (Hi) vs faibles (Lo) pour ces marqueurs.

A titre d'exemple, pour CD3, un seuil optimal de 823 LT CD3/mm² a été retenu (méthode de mesure de la densité sur la totale de la biopsie) avec 71,5 % de patients Hi et 28,5 % de patients Lo. Les courbes de Kaplan-Meier illustrent les différences significatives observées entre les groupes fort et faible (Figure 19) pour CD3 sur le critère de la DFS (CD3 HR corrigé= 3,23 et p corrigé=0.00469 ; CD8 HR corrigé=2.65 et p corrigé=0,116).

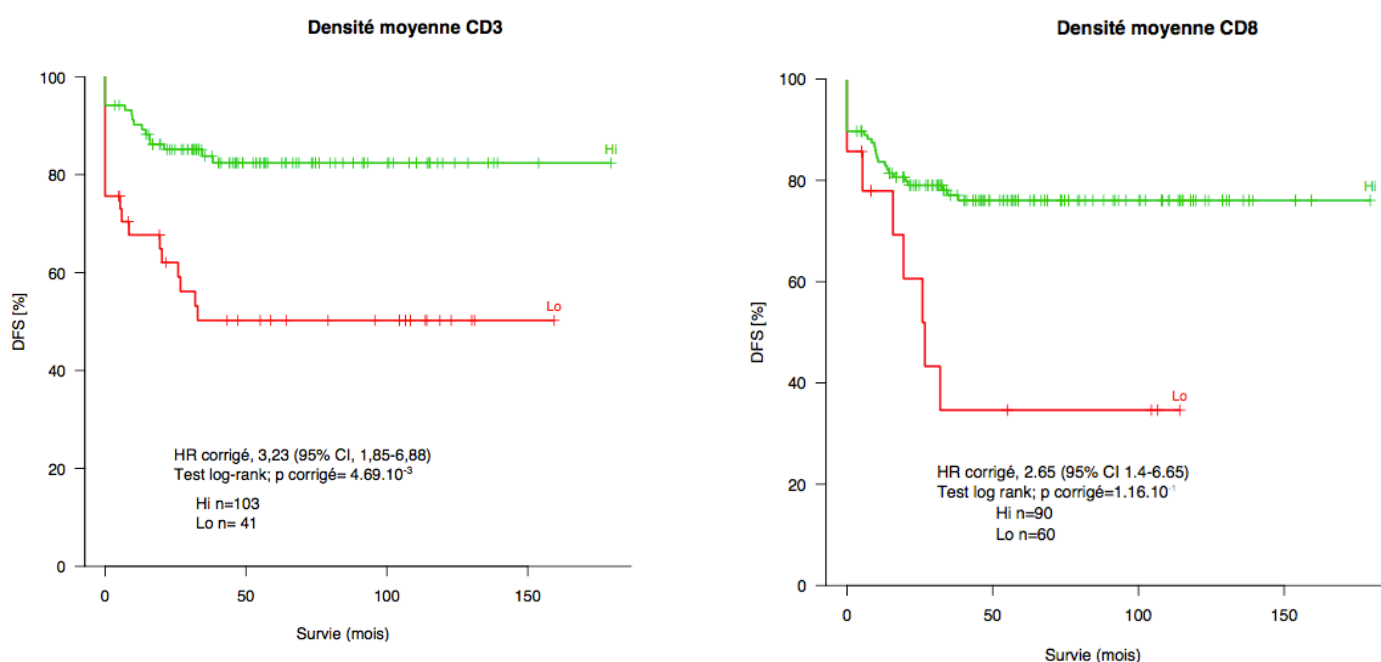


Figure 19 : Courbes de Kaplan Meier illustrant les différences de survie sans récurrence des patients forts (Hi ; courbes vertes) vs faible (Lo ; courbes rouges) en CD3+ (A) ou CD8+ (B). Test de Logrank avec correction de Altman

En analyse univariée, les paramètres significativement associés à la DFS étaient : (i) le score de Dworak (ii) la classification ypTNM et (iii) les critères immunitaires (CD3 et CD8) (données non incluses).

L'analyse multivariée selon le modèle de Cox, montrait que le critère immunitaire (CD3 et CD8) restait significatif en présence de l'ensemble des critères cliniques et histopathologiques (

DFS				
Critères	CD3		CD8	
	HR (95 % CI)	p	HR (95 % CI)	p
Sexe	0.59 (0.27-1.25)	0,167	0.72 (0.34-1.5)	0,374
Âge (<65 ans ; >65 ans)	0.86 (0.41-1.81)	0,7	1.03 (0.5-2.09)	0,942
Localisation (haut, moyen, bas rectum)	0.80 (0.5-1.28)	0,353	0.78 (0.51-1.2)	0,259
Dworak (0-1 vs 2 vs 3-4)	0.70 (0.39-1.27)	0,24	0.59 (0.32-1.09)	0,094
ypTNM	3.87 (2.38-6.31)	5,7. 10 ⁻⁰⁸	3.45 (2.14-5.58)	4,2. 10 ⁻⁰⁷
Densité (CD3 ou CD8)	0.45 (0.2-1)	0,049	0.46 (0.22-0.94)	0,033

Tableau 9). Ces résultats suggèrent qu'une forte infiltration initiale en CD3 ou en CD8 est un facteur prédictif de réponse à la RCT et pronostic de l'absence de récurrence des patients.

Tableau 9 : Analyse multivariée selon le modèle de Cox sur le critère DFS sur l'ensemble de la cohorte

V.2 Combinaison des données immunitaires et de la réponse à la RCT

Dans l'optique de pouvoir mieux individualiser les patients pouvant bénéficier d'une stratégie de conservation d'organe, le critère immunitaire (CD3 et CD8) a été combiné au stade TNM évalué en imagerie (IRM ou écho-endoscopie) 6 à 8 semaines post RCT (ycTNM) et à l'évaluation histologique de la régression tumorale (score de Dworak). Les patients fortement infiltrés ont été classés en Hi et les patients faiblement infiltrés en Lo.

V.2.1. Association données immunitaires et évaluation clinique par imagerie de la réponse à la RCT (ycTNM)

Les courbes de Kaplan-Meier (Figure 20) illustrent la survie dans récurrence en fonction de la combinaison du critère immunitaire (infiltration CD3 initiale) et du critère clinique de réponse à la RCT néoadjuvante (ycTNM). Une différence significative entre les différents groupes de patients sur le critère de la DFS était observée. Les patients les plus faiblement infiltrés (Lo) avaient une survie sans récurrence plus courte par rapport aux patients fortement infiltrés pour un même stade ycTNM. Les mêmes résultats étaient obtenus en combinant la densité CD8 initiale et le ycTNM (données non montrées).

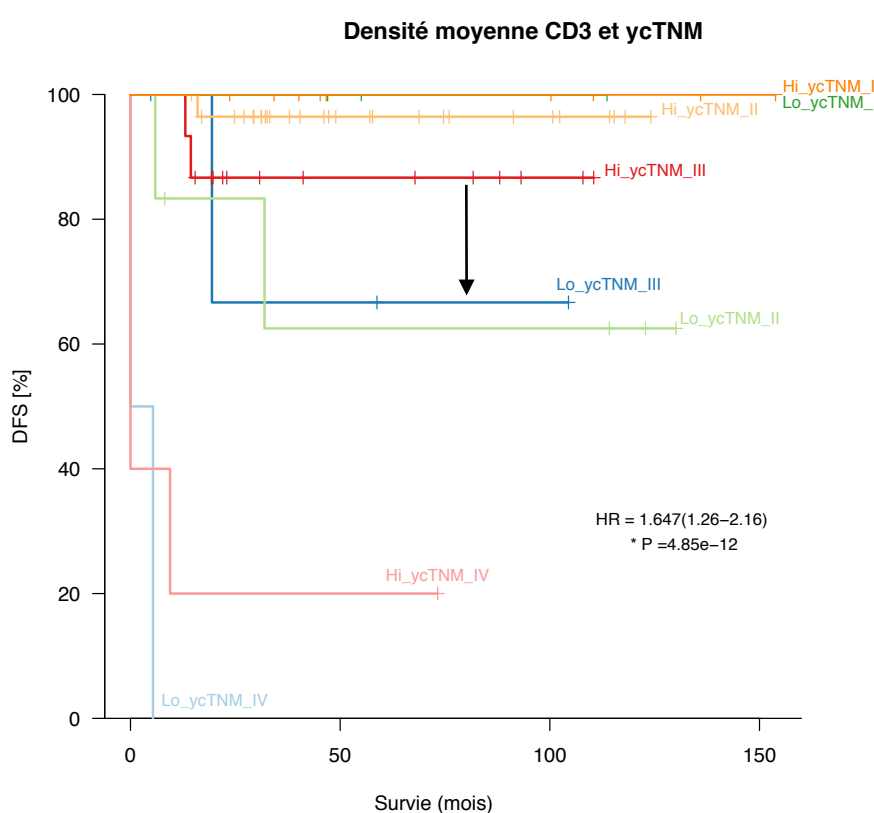


Figure 20 : Représentation graphique (courbes de Kaplan Meier) de la fonction de survie sans récurrence (DFS) en fonction de la combinaison des informations de l'infiltration immunitaire (CD3 et CD8) avec l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (ycTNM).

V.2.2. Association données immunitaires et évaluation histologique de la réponse à la RCT sur la pièce opératoire (Score de Dworak)

Les courbes de Kaplan-Meier (Figure 21) illustrent la DFS en fonction de la combinaison du critère immunitaire (infiltration CD3 initiale) et du critère histologique de réponse à la RCT néoadjuvante (score de Dworak). Ces courbes illustrent une séparation significative des différentes catégories de patients (Hi vs Lo) pour un même score de Dworak. Les patients ayant une forte infiltration immunitaire initiale et un bon score de Dworak ne récidivent presque pas. Les patients Hi et mauvais répondeurs à la RCT (Hi_D0_D1) ont une meilleure DFS que les patients Lo ayant une bonne réponse histologique à la RCT (Lo_D3_D4).

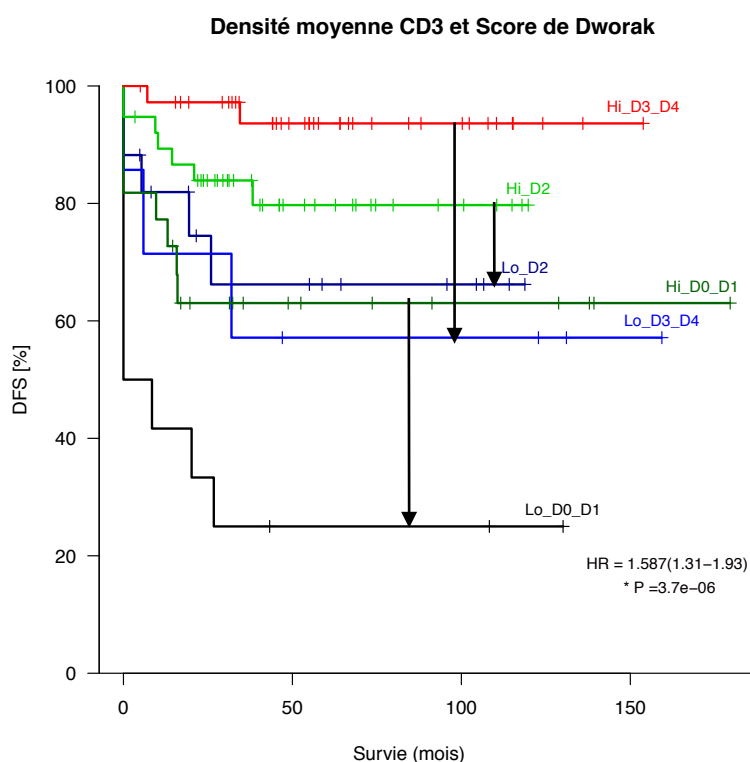


Figure 21 : Représentation graphique (courbes de Kaplan Meier) de la fonction de survie sans récurrence (DFS) en fonction de la combinaison des informations de l'infiltration immunitaire (CD3 et CD8) et de l'évaluation histologique sur la pièce opératoire de la réponse à la RCT (score de Dworak).

VI- Conséquences thérapeutiques potentielles : stratégie de watch and wait

Nous avons pu obtenir des coupes de biopsies diagnostiques de 52 patients en réponse clinique complète post-RCT néoadjuvante non traités par chirurgie première selon la stratégie de « Watch and Wait » grâce à la collaboration de plusieurs centres pratiquant la stratégie de conservation d'organes : Sao Paulo (Pr Habr Gama), Buenos Aires (Dr Soledad Iseas), Nice (Pr Gérard) et Poitiers (Pr Tougeron) (Figure 22).

Ces prélèvements précieux nous ont permis d'aborder la question de l'intérêt en pratique clinique de l'évaluation immunitaire des biopsies initiales pour mieux identifier les patients éligibles à cette nouvelle option thérapeutique moins agressive.

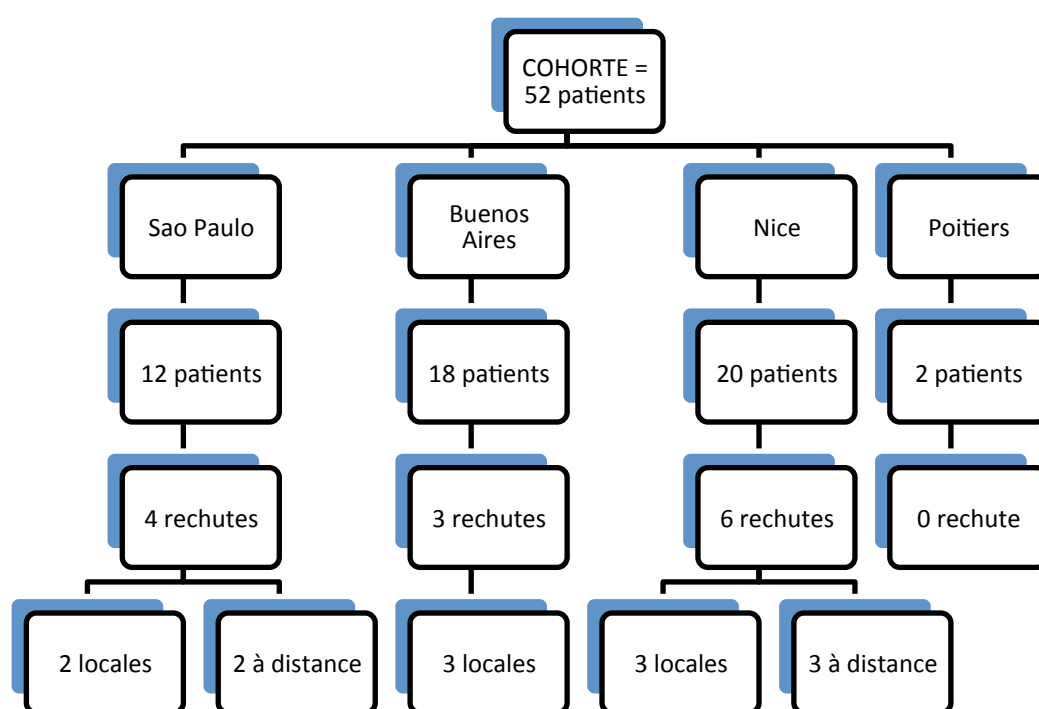


Figure 22 : Diagramme descriptif des cohortes suivies en watch and wait.

La stratégie de « Watch and Wait » étant encore à l'étape d'évaluation clinique, les protocoles de prise en charge ne sont pas standardisés. Ainsi, les traitements par RCT néoadjuvante varient selon les centres, mais tous les patients ont reçu une chimiothérapie par 5-FU ou par capecitabine (Xeloda®) –précurseur oral de la 5-FU – et une radiothérapie externe. Le centre de Nice se distingue du reste des cohortes, car la plupart des patients ont reçu une radiothérapie de contact.

L'âge moyen de la cohorte « Watch and Wait » analysée était de 70 ans (25-93 ans) avec 60 % d'hommes et 40 % de femmes.

La densité moyenne en CD3 de la cohorte « Watch and Wait » était de 1387 cellules/mm² (261-3328), la densité moyenne en CD8 était de 346 cellules/mm² (58-1146).

On note une variabilité de la densité en CD3 (Figure 23) et en CD8 (données non incluses) en fonction des différents centres. La cohorte du Brésil ayant une densité en CD3 sur les biopsies diagnostiques inférieure aux deux autres cohortes.

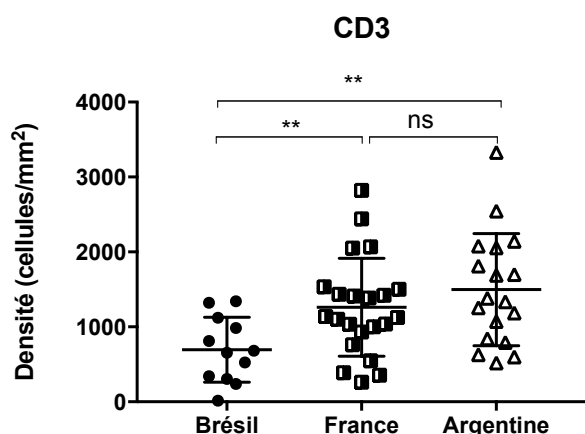


Figure 23 : Densité en CD3 sur les biopsies diagnostiques dans les différents centres « watch and wait » (Brésil moyenne densité CD3=695,5/mm², France moyenne densité CD3=1262/mm², Argentine moyenne densité CD3=1497/mm²). ** $p < 0,01$ Test de Mann-Whitney

Sur les 52 patients suivis en « watch and wait », 13 ont présenté une rechute : locale (n=8) et/ou à distance (n=6).

On note une différence significative entre la densité en CD3 des biopsies diagnostiques des patients ayant rechuté (densité moyenne = 862.8/mm²) et ceux n'ayant pas rechuté (densité moyenne = 1329/mm²) (Figure 24). La densité en CD8 était également plus faible dans le groupe avec rechute sans toutefois atteindre la significativité (données non incluses).

En analysant la date de la rechute, on note que les patients ayant fait une rechute précoce (< 2 ans) avaient une densité en CD3 significativement plus basse que le groupe sans rechute (Figure 24). Ainsi la densité initiale en CD3 pourrait permettre de prédire les patients à risque de rechute, tout particulièrement dans les premières années suivant le traitement.

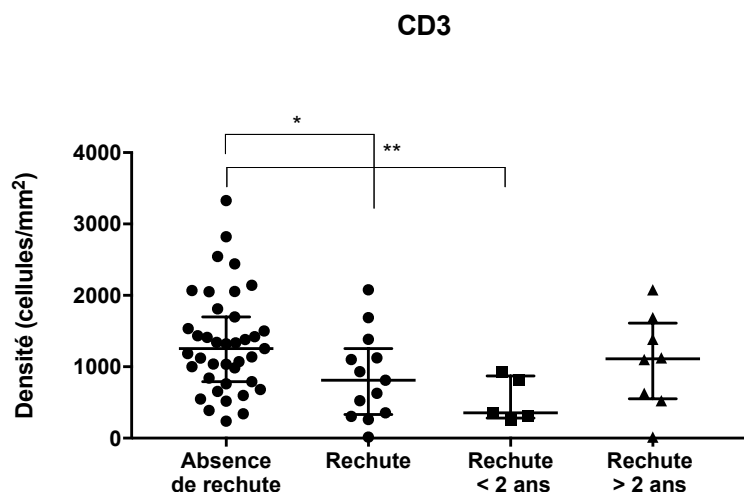


Figure 24 : Moyenne des densités en CD3 sur les biopsies diagnostiques de patients suivis en « watch and wait » dans les groupes absence de rechute, rechute, rechute précoce (<2 ans) et rechute tardive (>2 ans). Une différence significative entre les groupes de patients sans rechute et avec rechute est retrouvée ($p=0,0373$, test de Mann Whitney) ainsi qu'avec le groupe de rechute tardive ($p=0,0048$, test de Mann Whitney).

L'analyse en quartile des densités montre que les 25% des patient avec le plus faible infiltrat (1^{er} quartile : 0-675/mm²) présentent 46 % de rechute locale ou à distance, alors que les patients les plus infiltrés (4^e quartile : 1511-3328/mm²) ne présentent que 15 % de rechute (Figure 25). La même observation était faite avec la densité de CD8.

% de rechute par quartile (densité CD3)

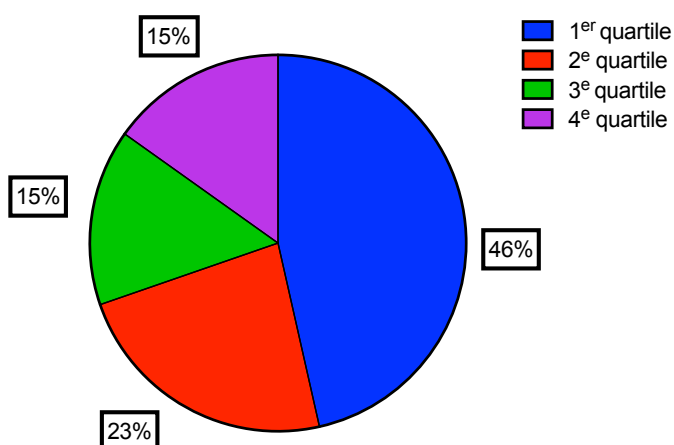


Figure 25 : Répartition des rechutes (locale et à distance) dans les 4 quartiles de densité en CD3 sur les biopsies diagnostiques.

Une analyse combinée des marqueurs CD3 et CD8 évalués sur la biopsie diagnostique a été effectuée. Les patients présentant une forte densité en CD3 et CD8 ont été qualifiés de HiHi, les patients ayant une faible densité pour ces deux marqueurs ont été classifiés en LoLo, si une des densités était élevée les patients étaient alors classifiés d'hétérogène ou Het. Les courbes de Kaplan-Meier (Figure 26) illustrent la DFS en fonction de l'infiltration immunitaire (combinaison CD3 et CD8). Une tendance ($p=0.514$, test du log rank) était observée entre les différents groupes de patients (HiHi, LoLo et Het) sur le critère de la survie sans récidive.

Afin d'atteindre la significativité, le recrutement de nouveaux patients suivis selon cette stratégie de suivi est en cours.

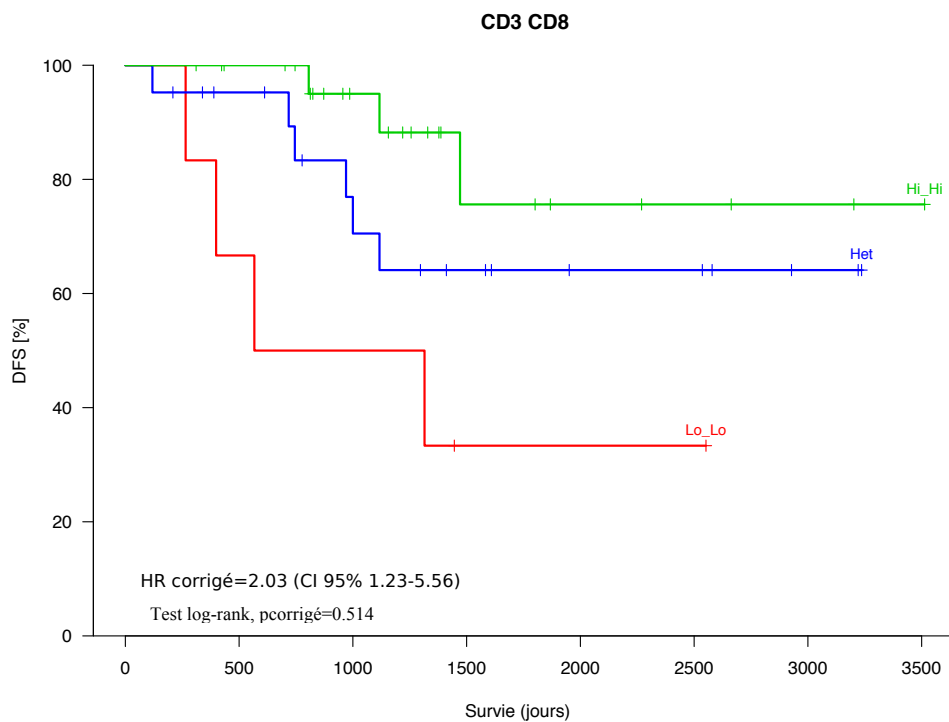


Figure 26 : Représentation graphique (courbes de Kaplan Meier) de la fonction de survie sans récidive en fonction de l'infiltration immunitaire (combinaison CD3 et CD8).

Discussion

I. Pertinence de l'évaluation immunitaire sur une biopsie

Aujourd'hui, les biopsies réalisées lors de la coloscopie initiale dans les cancers colorectaux sont utilisées à titre diagnostique. Ce matériel précieux pourrait cependant également être utilisé à titre pronostique (indicateur de réponse à la RCT néoadjuvante, risque de récurrence) grâce à l'étude de l'infiltration immunitaire. Ainsi, l'évaluation de la composante immunitaire des cancers sur les biopsies tumorales apparaît de plus en plus nécessaire. En effet :

- i) certaines tumeurs sont inopérables et la valeur pronostique immunitaire ne peut s'évaluer que sur les biopsies diagnostiques,
- ii) en situation de tumeur opérable après traitement néoadjuvant, l'évaluation immunitaire à des fins de prédiction de réponse au traitement ne peut se réaliser que sur les biopsies initiales,
- iii) certaines indications thérapeutiques des anticorps anti-MCI concernent les tumeurs non opérables d'emblée, la biopsie diagnostique serait alors utile afin d'évaluer la réaction immunitaire et tenter de prédire la réponse aux anti-MCI. On peut à ce sujet noter que la place des immunothérapies dans le schéma thérapeutique se situerait idéalement en néoadjuvant, avant l'ablation de la tumeur, de ses antigènes et de ses ganglions drainants.

Après avoir évalué la performance et la robustesse de l'évaluation immunitaire sur pièce opératoire (test immunoscore), il était important d'aborder l'analyse issue des biopsies afin d'évaluer la faisabilité et la qualité des informations recueillies.

Le cancer du rectum représente une excellente situation clinique où l'analyse des biopsies peut s'avérer très utile pour la prise en charge thérapeutique des patients.

Nos analyses ont montré qu'en dépit d'une faible représentation du contingent tumoral (12 % de la surface analysée sur une coupe tumorale de pièce opératoire), l'analyse de marqueurs robustes tels que CD3 et CD8 en immunohistochimie quantifiée permettait de recueillir des informations cliniques pertinentes pouvant être très utiles pour la prise en charge des patients.

II. Importance de l'infiltrat immunitaire initial dans l'évaluation de la réponse au traitement

Nous avons observé une corrélation entre la densité de l'infiltrat lymphocytaire initial (CD3 et CD8) évaluée sur les biopsies diagnostiques et la réponse à la RCT néoadjuvante.

Les patients présentant une tumeur fortement infiltrée ont une très forte probabilité de réponse à la RCT associée à un bénéfice très significatif en termes de survie sans récurrence. Ceci confirme les données préliminaires obtenues par notre équipe (Anitei et al., 2014) ainsi que les données publiées dans l'équipe de Yasuda et al. (Yasuda et al., 2011).

Ces données immunitaires sont en accord avec des travaux menés dans les cancers ORL, du sein et du poumon où la présence d'une forte réponse immunitaire initiale était associée à une meilleure réponse à la RCT (Balermipas et al., 2014 ; Denkert et al., 2010 ; Kawai et al., 2008).

Il apparaît cependant dans notre étude qu'il ne semble pas indispensable d'avoir une forte infiltration immunitaire CD3 et/ou CD8 pour répondre à la RCT. Le calcul de la densité immunitaire initiale ne permet donc pas d'exclure les patients non répondeurs à la RCT.

Cependant, en présence d'une forte infiltration immunitaire, la réponse à la RCT est plus probable et induit également un bénéfice sur la prévention des récurrences à long terme.

On peut poser comme hypothèse que la sensibilité à la RCT dépend fortement de la sensibilité intrinsèque de la cellule tumorale aux agents ionisants et chimiotoxiques. Si celle-ci est excellente, le « boost immunitaire » pourrait ne pas être indispensable à une pleine efficacité. En situation de sensibilité intermédiaire, la composante immunitaire pourrait être déterminante et à l'inverse être inopérante si la tumeur est complètement insensible au traitement.

La combinaison de l'information immunitaire initiale à l'évaluation clinique après la RCT (ycTNM) semble permettre de prédire les patients ayant un faible risque de rechute. Cette association de marqueurs permettrait ainsi de distinguer les patients ayant un bon pronostic pouvant bénéficier d'une stratégie de conservation d'organe.

Ainsi se dégage une perspective d'analyse combinée des critères intrinsèques à la tumeur, des critères immunitaires et des critères d'évaluation clinique de réponse à la RCT pour tenter d'encore mieux cerner ce que sera la réponse à la RCT.

De nombreux marqueurs cliniques, anatomopathologiques et biologiques ont été décrits comme étant prédictifs de la réponse à la RCT dans les cancers du rectum. Il semblerait

intéressant de combiner ces différents marqueurs connus pour tous les patients (localisation de la tumeur, taux de CEA initial...) à la composante immunitaire initiale évaluée sur les biopsies diagnostiques afin d'obtenir un score prédictif robuste de réponse à la RCT.

III. Impact de la RCT et réponse clinique : induction d'une réponse Th1 cytotoxique et des MCI

Malgré un nombre limité de patients (61 traités par RCT vs 12 non traités par RCT), nos analyses de transcriptome par Nanostring montrent l'induction d'une réponse immunitaire d'orientation Th1 cytotoxique (eg. *IFN γ* , *TBX21*) par la RCT. Ceci est en accord avec les données actuelles sur la mort immunogène induite par la chimiothérapie (Kroemer et al., 2013). En effet, certaines chimiothérapies -notamment le 5-fluorouracile- peuvent agir sur les cellules tumorales en modifiant leur immunogénicité en augmentant l'expression d'antigènes tumoraux à leur surface ou leur capacité de présentation de ces antigènes aux lymphocytes T. La chimiothérapie peut également agir sur les cellules infiltrant les tumeurs en activant les lymphocytes Th1 et Th17.

Nous avons également montré par technique d'immunohistochimie une différence significative des MCI tels PD-1 et LAG-3 chez les patients traités vs non traités par RCT.

Cet effet pourrait être dû à un afflux de lymphocytes T au niveau du site tumoral et/ou à une modification phénotypique des lymphocytes déjà présents dans la tumeur par augmentation de l'expression de PD-1 et LAG-3 suite à la RCT.

Il existait une forte corrélation inverse entre le niveau d'expression du cluster Th1 cytotoxique et des MCI et l'expression du VEGFA et de la cytokine TSLP. La cytokine TSLP (Thymic stroma lymphopoietin), de la famille de l'IL2, est essentiellement produite par les cellules épithéliales et joue un rôle clé dans l'activation des cellules dendritiques et l'induction d'une réponse T auxiliaire de type Th2. Elle est exprimée de manière constitutive dans l'épithélium intestinal avec des niveaux plus élevés dans le côlon. Récemment TSLP a été décrit comme un facteur pouvant contribuer au développement de certains cancers notamment du sein ou du pancréas en induisant une inflammation chronique de type Th2 (Kuan and Ziegler, 2014; Olkhanud et al., 2011; Takahashi et al., 2016). Dans le cancer colorectal, une étude récente a montré que TSLP était plus exprimé dans les tissus tumoraux de cancer colorectal que dans l'épithélium normal et pouvait induire l'apoptose sélective des cellules tumorales (Yue et al., 2016).

IV. Modifications de l'attitude thérapeutique

Ces 30 dernières années, la prise en charge des cancers du rectum a beaucoup évolué notamment grâce au développement et la mise en place de nouvelles modalités de traitement, cependant la chirurgie ayant néanmoins une place centrale (Kosinski et al., 2012). L'amélioration des techniques chirurgicales avec la standardisation de la TME, le développement de la TME par voie laparoscopique, mais aussi les avancées des traitements néoadjuvants ont permis de proposer une prise en charge plus adaptée à chaque patient. Cependant, dans certaines séries, jusqu'à 42 % des patients sont en réponse pathologique complète après la RCT néoadjuvante (Sanghera et al., 2008). L'identification des patients bons répondeurs avant ou après la RCT néoadjuvante mais surtout avant la chirurgie semble nécessaire afin de leur proposer une stratégie de conservation d'organe et de surveillance simple.

Le développement récent des immunothérapies par blocage des molécules de costimulation inhibitrice et leurs résultats dans de nombreux cancers jusqu'alors résistants à plusieurs lignes de chimiothérapie ouvrent encore plus de perspectives dans le traitement des cancers.

Les résultats obtenus suggèrent que la RCT pourrait orienter la tumeur vers un profil lymphocytaire compatible avec une réponse au traitement par anti-MCI. De plus des données précliniques récentes montrent l'intérêt de l'association RCT et anti-MCI qui limiterait la progression tumorale et pourrait ainsi augmenter les taux de réponse clinique aux traitements anti-cancéreux (Reynders et al., 2015 ; Twyman-Saint Victor et al., 2015). De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité de cette association (Daly et al., 2015).

Ainsi se manifeste l'utilité d'une évaluation du statut immunitaire initial en CD3/CD8 et en MCI compte tenu de l'efficacité de ces traitements chez les bons répondeurs. Une forte densité en CD3/CD8 nous renseignerait sur une très forte probabilité de bonne réponse à la RCT avec un gain de survie associé. Un bénéfice de l'ajout des MCI pourrait sans doute s'observer chez les patients initialement forts et intermédiaires.

Malgré un nombre limité de patients suivis selon la stratégie du « Watch and Wait », les résultats obtenus vont dans le sens d'une probabilité de rechute plus importante chez les patients peu infiltrés initialement.

La confirmation de ces résultats pourrait permettre une sélection plus étroite des patients bénéficiant d'un suivi seul.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons analysé la densité de l'infiltrat immunitaire initial et évalué son rôle pronostique sur une cohorte de patients atteints de cancer du rectum traités par RCT. Nous avons également étudié son influence sur la réponse à la RCT et les modifications immunitaires induites par la RCT au sein de la tumeur par des techniques de transcriptomique et d'analyse protéique. Nous avons montré l'importance de la quantification de l'infiltrat immunitaire initial comme marqueur prédictif de la réponse au traitement néoadjuvant et de la survie sans récurrence. Ce travail a également permis de montrer l'intérêt de la combinaison de (i) l'évaluation de la réaction immunitaire initiale et de (ii) l'évaluation par imagerie de la réponse à la RCT (ycTNM) afin de mieux discriminer les patients qui pourraient bénéficier d'une chirurgie a minima ou d'une stratégie de suivi simple (« watch and wait »).

De plus, l'ADN de 60 tumeurs de rectum ayant ou non répondu à la RCT a pu être extrait, grâce à une collaboration avec le service d'Hématologie moléculaire de la Pitié-Salpêtrière, nous allons pouvoir étudier le répertoire T de ces tumeurs (étude du TCR gamma). En effet, il a été décrit dans plusieurs types de tumeurs qu'une expansion clonale de lymphocytes T pourrait être un facteur critique associé à une bonne réponse à la radiochimiothérapie, mais également aux immunothérapies récentes (Park et al., 2016 ; Weber et al., 2016).

Nous avons eu également accès à une cohorte de cancer du rectum (Nice) dans laquelle l'expression de gènes par puce Affymetrix a été étudiée, les résultats pourraient se révéler utiles, car il s'agit de patients dont nous disposons de l'analyse des biopsies pré- et post-RCT. La modification de l'expression de gènes notamment au niveau de l'immunome (Bindea et al., 2013a) dans cette cohorte pourrait renforcer et compléter nos résultats, notamment sur la question de la modification du contingent immunitaire après la RCT.

Les résultats obtenus nous encouragent à poursuivre ces explorations à une échelle plus importante. Grâce au Pr J.-P. Gérard nous avons obtenu, un agrément pour étudier l'infiltration initiale dans les biopsies de cancer du rectum dans l'étude de phase III européenne OPERA (NCT02505750) comparant deux techniques de radiothérapie en association avec la RCT néoadjuvante : chez des patients présentant un adénocarcinome rectal

de stade II ou III. L'accès à cette large cohorte permettrait de valider à grande échelle nos résultats afin de proposer à terme l'ajout d'une exploration immunitaire avant traitement pour mieux guider la thérapeutique.

Annexes

Tumeur primitive (T)

Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques non péritonisés
T4	T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures

Ganglions régionaux (N)

Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastases dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoraux, c'est à dire satellite(s) dans la sous-séreuse, tissus non péritonisés péricoliques ou péirectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2a	Métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

Métastases (M)

M0	Pas de métastase à distance
M1a	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) autre que régional
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Annexe 1 : Classification TNM du cancer du rectum

Stade 0	Tis N0 M0
Stade I	T1-2 N0 M0
Stade II	T3, T4 N0 M0
Stade IIA	T3 N0 M0
Stade IIB	T4a N0 M0
Stade IIC	T4b N0 M0
Stade III	Tous T N1-2 M0
Stade IIIA	T1-2 N1 M0 ou T1 N2a M0
Stade IIIB	T 3-4 a N1 M0 ou T2-3 N2a M0 ou T1-2 N2b M0
Stade IIIC	T4a N2a M0 ou T3-4a N2b M0 ou T4b N1-2 M0
Stade IVA	Tout T, tout N, M1a
Stade IVB	Tout T, tout N, M1b

Annexe 2 : Stades du cancer du rectum

Bibliographie

- Agostini, M., Janssen, K.P., Kim, I.J., D'Angelo, E., Pizzini, S., Zangrando, A., Zanon, C., Pastrello, C., Maretto, I., Digito, M., et al. (2015). An integrative approach for the identification of prognostic and predictive biomarkers in rectal cancer. *Oncotarget* 6, 32561.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 834–846.
- Alix-Panabières, C., and Pantel, K. (2014). Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* 14, 623–631.
- Allemani, C., Weir, H.K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X.-S., Bannon, F., Ahn, J.V., Johnson, C.J., Bonaventure, A., et al. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet* 385, 977–1010.
- Altman, D.G., Lausen, B., Sauerbrei, W., and Schumacher, M. (1994). Dangers of using “optimal” cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 829–835.
- Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Tudosí, A.-M., Kirilovsky, A., Bindea, G., Ferariu, D., Danciu, M., et al. (2014). Prognostic and Predictive Values of the Immunoscore in Patients with Rectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 1891–1899.
- Appelt, A.L., Pløen, J., Harling, H., Jensen, F.S., Jensen, L.H., Jørgensen, J.C., Lindebjerg, J., Rafaelsen, S.R., and Jakobsen, A. (2015). High-dose chemoradiotherapy and watchful waiting for distal rectal cancer: a prospective observational study. *Lancet Oncol.* 16, 919–927.
- Arbman, G., Nilsson, E., Hallböök, O., and Sjö Dahl, R. (1996). Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br. J. Surg.* 83, 375–379.
- Balermipas, P., Michel, Y., Wagenblast, J., Seitz, O., Weiss, C., Rödel, F., Rödel, C., and Fokas, E. (2014). Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br. J. Cancer* 110, 501–509.
- Baxter, N.N., and Garcia-Aguilar, J. (2007). Organ Preservation for Rectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 1014–1020.
- Benoist, S., Panis, Y., Boleslawski, E., Hautefeuille, P., and Valleur, P. (1997). Functional outcome after coloanal versus low colorectal anastomosis for rectal carcinoma. *J. Am. Coll. Surg.* 185, 114–119.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W.-H., and Galon, J. (2011). The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. *Semin. Immunopathol.* 33, 335–340.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenaus, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013a). Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* 39, 782–795.

- Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013b). Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* 39, 782–795.
- Bitterman, D.S., Resende Salgado, L., Moore, H.G., Sanfilippo, N.J., Gu, P., Hatzaras, I., and Du, K.L. (2015). Predictors of Complete Response and Disease Recurrence Following Chemoradiation for Rectal Cancer. *Front. Oncol.* 5.
- Bosset, J.-F., Calais, G., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Daban, A., Bardet, E., Beny, A., Briffaux, A., and Collette, L. (2005). Enhanced Tumorocidal Effect of Chemotherapy With Preoperative Radiotherapy for Rectal Cancer: Preliminary Results—EORTC 22921. *J. Clin. Oncol.* 23, 5620–5627.
- Bouvier, A.-M., and Launoy, G. (2015). [Epidemiology of colorectal cancer]. *Rev. Prat.* 65, 767–773.
- Brenner, H., Bouvier, A.M., Foschi, R., Hackl, M., Larsen, I.K., Lemmens, V., Mangone, L., Francisci, S., and The EURO CARE Working Group (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EURO CARE study. *Int. J. Cancer* 131, 1649–1658.
- Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Incidence and mortality. *Lancet* 383, 1490–502.
- Burnet, F.M. (1970). The Concept of Immunological Surveillance. *13*, 1–27.
- Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *Br. Med. J.* 1, 841–847.
- Burnet, M. (1964). IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PROCESS OF CARCINOGENESIS. *Br. Med. Bull.* 20, 154–158.
- Cebrián, A., Gómez del Pulgar, T., Fernández-Aceñero, M.J., Borrero-Palacios, A., del Puerto-Nevado, L., Martínez-Useros, J., Marín-Arango, J.P., Caramés, C., Vega-Bravo, R., Rodríguez-Remírez, M., et al. (2016). Decreased PLK1 expression denotes therapy resistance and unfavourable disease-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Pathol. - Res. Pract.* 212, 1133–1137.
- Chen, M.-B., Wu, X.-Y., Yu, R., Li, C., Wang, L.-Q., Shen, W., and Lu, P.-H. (2012). P53 Status as a Predictive Biomarker for Patients Receiving Neoadjuvant Radiation-Based Treatment: A Meta-Analysis in Rectal Cancer. *PLOS ONE* 7, e45388.
- Clemente, C.G., Mihm, M.C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303–1310.
- Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* 14, 199–220.
- Collette, L., Bosset, J.-F., den Dulk, M., Nguyen, F., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Piérart, M., and Calais, G. (2007). Patients With Curative Resection of cT3-4 Rectal Cancer After Preoperative Radiotherapy or Radiochemotherapy: Does Anybody Benefit From Adjuvant Fluorouracil-Based Chemotherapy? A Trial of the European Organisation for

Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 25, 4379–4386.

Crowe, N.Y., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *J. Exp. Med.* 196, 119–127.

Daly, M.E., Monjazeb, A.M., and Kelly, K. (2015). Clinical Trials Integrating Immunotherapy and Radiation for Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1685–1693.

Das, P., Skibber, J.M., Rodriguez-Bigas, M.A., Feig, B.W., Chang, G.J., Hoff, P.M., Eng, C., Wolff, R.A., Janjan, N.A., Delclos, M.E., et al. (2006). Clinical and Pathologic Predictors of Locoregional Recurrence, Distant Metastasis, and Overall Survival in Patients Treated With Chemoradiation and Mesorectal Excision for Rectal Cancer: *Am. J. Clin. Oncol.* 29, 219–224.

Das, P., Skibber, J.M., Rodriguez-Bigas, M.A., Feig, B.W., Chang, G.J., Wolff, R.A., Eng, C., Krishnan, S., Janjan, N.A., and Crane, C.H. (2007). Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer* 109, 1750–1755.

Dayde, D., Tanaka, I., Jain, R., Tai, M.C., and Taguchi, A. (2017). Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 573.

Delmas, V. (2006). Dictionnaire d'anatomie, édition Masson, V. Delmas, 2006.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 105–113.

Dudley, J.C., Lin, M.-T., Le, D.T., and Eshleman, J.R. (2016). Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin. Cancer Res.* 22, 813–820.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 836–848.

Dworak, O., Keilholz, L., and Hoffmann, A. (1997). Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int. J. Colorectal Dis.* 12, 19–23.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie: 117-164.

Ehrlich, P. (1957). The Collected Papers of Paul Ehrlich of Paul Ehrlich: Immunology and cancer research (Pergamon P.).

- Endreseth, B.H., Romundstad, P., Myrvold, H.E., Bjerkeset, T., Wibe, A., and The Norwegian Rectal Cancer Group (2006). Rectal cancer treatment of the elderly. *Colorectal Dis.* 8, 471–479.
- Ferrari, L., and Fichera, A. (2015). Neoadjuvant chemoradiation therapy and pathological complete response in rectal cancer. *Gastroenterol. Rep.* 3, 277–288.
- Flammiger, A., Bayer, F., Cirugeda-Kühnert, A., Huland, H., Tennstedt, P., Simon, R., Minner, S., Bokemeyer, C., Sauter, G., Schlomm, T., et al. (2012). Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer. *APMIS* 120, 901–908.
- Fortina, P., and Surrey, S. (2008). Digital mRNA profiling. *Nat. Biotechnol.* 26, 293–294.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2016). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 97–111.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.
- Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). $\gamma\delta$ T Cells Provide an Early Source of Interferon γ in Tumor Immunity. *J. Exp. Med.* 198, 433–442.
- Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases: A literature review. *Cancer* 28, 89–98.
- George, T.J., Frampton, G.M., Sun, J., Gowen, K., Kennedy, M., Greenbowe, J.R., Schrock, A.B., Ali, S.M., Klempner, S.J., Hezel, A.F., et al. (2016). Tumor mutational burden as a potential biomarker for PD1/PD-L1 therapy in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 34, 3587–3587.
- Gerard, J.-P. (2006). Preoperative Radiotherapy With or Without Concurrent Fluorouracil and Leucovorin in T3-4 Rectal Cancers: Results of FFCD 9203. *J. Clin. Oncol.* 24, 4620–4625.
- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The Distinct Contributions of Murine T Cell Receptor (TCR) $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + T Cells to Different Stages of Chemically Induced Skin Cancer. *J. Exp. Med.* 198, 747–755.
- Grabenbauer, G.G., Lahmer, G., Distel, L., and Niedobitek, G. (2006). Tumor-Infiltrating Cytotoxic T Cells but not Regulatory T Cells Predict Outcome in Anal Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 3355–3360.
- Habr-Gama, A., Perez, R.O., Nadalin, W., Sabbaga, J., Ribeiro, U., Silva e Sousa, A.H., Campos, F.G., Kiss, D.R., and Gama-Rodrigues, J. (2004). Operative Versus Nonoperative Treatment for Stage 0 Distal Rectal Cancer Following Chemoradiation Therapy: Long-term Results. *Trans. Meet. Am. Surg. Assoc. CXXII*, 309–316.

Habr-Gama, A., Gama-Rodrigues, J., Julião, G.P.S., Proscurshim, I., Sabbagh, C., Lynn, P.B., and Perez, R.O. (2014). Local Recurrence After Complete Clinical Response and Watch and Wait in Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiation: Impact of Salvage Therapy on Local Disease Control. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 88, 822–828.

Heald, R.J., and Ryall, R.D.H. (1986). RECURRENCE AND SURVIVAL AFTER TOTAL MESORECTAL EXCISION FOR RECTAL CANCER. *The Lancet* 327, 1479–1482.

Huh, J.W., Kim, H.R., and Kim, Y.J. (2013). Clinical prediction of pathological complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 56, 698–703.

Jacob Bickels, M.D., Yehuda Kollender, M.D., Ofer Merinsky, M.D., and Isaac Meller, M.D. (2002). Medical Archaeology Coley's toxin: Historical Perspective.

Joye, I., Deroose, C.M., Vandecaveye, V., and Haustermans, K. (2014). The role of diffusion-weighted MRI and 18F-FDG PET/CT in the prediction of pathologic complete response after radiochemotherapy for rectal cancer: A systematic review. *Radiother. Oncol.* 113, 158–165.

Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Putter, H., Steup, W.H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Pahlman, L., Glimelius, B., van Krieken, J.H.J., et al. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 345, 638–646.

Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., Murata, Y., Naito, Y., Mizuno, T., Aokage, K., Saijo, N., Nishiwaki, Y., Gemma, A., et al. (2008). Predominant infiltration of macrophages and CD8+ T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 113, 1387–1395.

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.

Kim, C.H., Lee, S.Y., Kim, H.R., and Kim, Y.J. (2015). Prognostic Effect of Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Level: A Useful Tool for Prediction of Distant Metastasis in Locally Advanced Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Total Mesorectal Excision. *Medicine (Baltimore)* 94, e1291.

Kim, C.J., Yeatman, T.J., Coppola, D., Trotti, A., Williams, B., Barthel, J.S., Dinwoodie, W., Karl, R.C., and Marcet, J. (2001). Local Excision of T2 and T3 Rectal Cancers After Downstaging Chemoradiation. *Ann. Surg.* 234, 352.

Kim, S.H., Chang, H.J., Kim, D.Y., Park, J.W., Baek, J.Y., Kim, S.Y., Park, S.C., Oh, J.H., Yu, A., and Nam, B.-H. (2016). What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? *Cancer Res. Treat.* 48, 998–1009.

Klein, G. (1966). Tumor Antigens. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, 223–252.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907.

- Kosinski, L., Habr-Gama, A., Ludwig, K., and Perez, R. (2012). Shifting concepts in rectal cancer management. *CA. Cancer J. Clin.* 62, 173–202.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., and Zitvogel, L. (2013). Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 51–72.
- Kuan, E.L., and Ziegler, S.F. (2014). Thymic Stromal Lymphopoietin and Cancer. *J. Immunol.* 193, 4283–4288.
- L J Old, and Boyse, and E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annu. Rev. Med.* 15, 167–186.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520.
- Lee, Y.-E., He, H.-L., Shiue, Y.-L., Lee, S.-W., Lin, L.-C., Wu, T.-F., Chang, I.-W., Lee, H.-H., and Li, C.-F. (2015). The prognostic impact of lipid biosynthesis-associated markers, HSD17B2 and HMGCS2, in rectal cancer treated with neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Tumor Biol.* 36, 7675–7683.
- Lezoche, E., Guerrieri, M., Paganini, A.M., Baldarelli, M., De Sanctis, A., and Lezoche, G. (2005). Long-term results in patients with T2–3 N0 distal rectal cancer undergoing radiotherapy before transanal endoscopic microsurgery. *Br. J. Surg.* 92, 1546–1552.
- Llosa, N.J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E.C., Hechenbleikner, E.M., Taube, J.M., Blosser, R.L., Fan, H., Wang, H., Luber, B.S., et al. (2015). The Vigorous Immune Microenvironment of Microsatellite Instable Colon Cancer Is Balanced by Multiple Counter-Inhibitory Checkpoints. *Cancer Discov.* 5, 43–51.
- Maas, M., Beets-Tan, R.G.H., Lambregts, D.M.J., Lammering, G., Nelemans, P.J., Engelen, S.M.E., van Dam, R.M., Jansen, R.L.H., Sosef, M., Leijtens, J.W.A., et al. (2011). Wait-and-See Policy for Clinical Complete Responders After Chemoradiation for Rectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 4633–4640.
- Maeda, K., Koide, Y., and Katsuno, H. (2014). When is local excision appropriate for “early” rectal cancer? *Surg. Today* 44, 2000–2014.
- McCarthy, E.F. (2006). The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop. J.* 26, 154–158.
- Mccawley, N., Clancy, C., O’neill, B.D.P., Deasy, J., Mcnamara, D.A., and Burke, J.P. (2016). Mucinous Rectal Adenocarcinoma Is Associated with a Poor Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis. Colon Rectum* 59, 1200–1208.
- Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., et al. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536–541.

- Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J., and Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5656–5662.
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., et al. (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2654–2666.
- Pages, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 5944–5951.
- Park, J.-H., Jang, M., Tarhan, Y.E., Katagiri, T., Sasa, M., Miyoshi, Y., Kalari, K.R., Suman, V.J., Weinshilboum, R., Wang, L., et al. (2016). Clonal expansion of antitumor T cells in breast cancer correlates with response to neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Oncol.* *49*, 471–478.
- Park, S.S., Dong, H., Liu, X., Harrington, S.M., Krco, C.J., Grams, M.P., Mansfield, A.S., Furutani, K.M., Olivier, K.R., and Kwon, E.D. (2015). PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 610–619.
- Patel, U.B., Taylor, F., Blomqvist, L., George, C., Evans, H., Tekkis, P., Quirke, P., Sebag-Montefiore, D., Moran, B., Heald, R., et al. (2011). Magnetic Resonance Imaging–Detected Tumor Response for Locally Advanced Rectal Cancer Predicts Survival Outcomes: MERCURY Experience. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3753–3760.
- Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplant. Proc.* *31*, 1260–1262.
- Penn, I., Halgrimson, C.G., and Starzl, T.E. (1971). De Novo Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* *3*, 773–778.
- Probst, C.P., Becerra, A.Z., Aquina, C.T., Tejani, M.A., Hensley, B.J., González, M.G., Noyes, K., Monson, J.R.T., and Fleming, F.J. (2016). Watch and Wait?—Elevated Pretreatment CEA Is Associated with Decreased Pathological Complete Response in Rectal Cancer. *J. Gastrointest. Surg.* *20*, 43–52.
- Qin, C.-J., Song, X.-M., Chen, Z.-H., Ren, X.-Q., Xu, K.-W., Jing, H., and He, Y.-L. (2015). XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget* *6*, 32193–32204.
- Qiu, H.-Z., Wu, B., Xiao, Y., and Lin, G.-L. (2011). Combination of differentiation and T stage can predict unresponsiveness to neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Colorectal Dis.* *13*, 1353–1360.
- Redelman-Sidi, G., Glickman, M.S., and Bochner, B.H. (2014). The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat. Rev. Urol.* *11*, 153–162.
- Reynders, K., Illidge, T., Siva, S., Chang, J.Y., and De Ruyscher, D. (2015). The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 503–510.

- Sanghera, P., Wong, D.W.Y., McConkey, C.C., Geh, J.I., and Hartley, A. (2008). Chemoradiotherapy for Rectal Cancer: An Updated Analysis of Factors Affecting Pathological Response. *Clin. Oncol.* 20, 176–183.
- Senéjoux, A. (2011). Séquelles fonctionnelles digestives après chirurgie du cancer du rectum. *Lett. Hépatogastroentérologie* 14, 254–258.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sierro, S., Romero, P., and Speiser, D.E. (2011). The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 91–101.
- Smith, K.D., Tan, D., Das, P., Chang, G.J., Kattepogu, K., Feig, B.W., Skibber, J.M., and Rodriguez-Bigas, M.A. (2010). Clinical Significance of Acellular Mucin in Rectal Adenocarcinoma Patients With a Pathologic Complete Response to Preoperative Chemoradiation: *Ann. Surg.* 251, 261–264.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13, 459–463.
- Stornes, T., Wibe, A., and Endreseth, B.H. (2016). Complications and risk prediction in treatment of elderly patients with rectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 31, 87–93.
- Sun, W., Li, G., Wan, J., Zhu, J., Shen, W., Zhang, Z., Sun, W., Li, G., Wan, J., Zhu, J., et al. (2016). Circulating tumor cells: A promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy. *Oncotarget* 7, 69507–69517.
- Takahashi, N., Sugaya, M., Suga, H., Oka, T., Kawaguchi, M., Miyagaki, T., Fujita, H., and Sato, S. (2016). Thymic Stromal Chemokine TSLP Acts through Th2 Cytokine Production to Induce Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Res.* 76, 6241–6252.
- Teng, F., Mu, D., Meng, X., Kong, L., Zhu, H., Liu, S., Zhang, J., and Yu, J. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) before and after neoadjuvant chemoradiotherapy and its clinical utility for rectal cancer. *Am. J. Cancer Res.* 5, 2064–2074.
- Thies, S., and Langer, R. (2013). Tumor Regression Grading of Gastrointestinal Carcinomas after Neoadjuvant Treatment. *Front. Oncol.* 3.
- Thomas, L. (1959). Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitivity. Lawrence HS Ed. N. Y. Hoeber-Harper.
- Tougeron, D., Fauquembergue, E., Rouquette, A., Le Pessot, F., Sesboüé, R., Laurent, M., Berthet, P., Mauillon, J., Di Fiore, F., Sabourin, J.-C., et al. (2009). Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod. Pathol.* 22, 1186–1195.
- Twyman-Saint Victor, C., Rech, A.J., Maity, A., Rengan, R., Pauken, K.E., Stelekati, E., Benci, J.L., Xu, B., Dada, H., Odorizzi, P.M., et al. (2015). Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 520, 373–377.

Weber, J., Horak, C., Hodi, F.S., Chang, H., Woods, D., Sanders, C., Robins, H., and Yusko, E. (2016). Baseline tumor T cell receptor (TcR) sequencing analysis and neo antigen load is associated with benefit in melanoma patients receiving sequential nivolumab and ipilimumab. *Ann. Oncol.* 27.

Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol. Ther.* 64, 529–564.

Yasuda, K., Nirei, T., Sunami, E., Nagawa, H., and Kitayama, J. (2011). Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 6, 49.

You, Y.N. (2011). Local Excision: Is It an Adequate Substitute for Radical Resection in T1/T2 Patients? *Semin. Radiat. Oncol.* 21, 178–184.

Yue, W., Lin, Y., Yang, X., Li, B., Liu, J., He, R., Yue, W., Lin, Y., Yang, X., Li, B., et al. (2016). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) inhibits human colon tumor growth by promoting apoptosis of tumor cells. *Oncotarget* 7, 16840–16854.

Zaanan, A., Park, J.M., Tougeron, D., Huang, S., Wu, T.-T., Foster, N.R., and Sinicrope, F.A. (2015). Association of beclin 1 expression with response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 137, 1498–1502.

Zeng, W.-G., Liang, J.-W., Wang, Z., Zhang, X.-M., Hu, J.-J., Hou, H.-R., Zhou, H.-T., and Zhou, Z.-X. (2015). Clinical parameters predicting pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Chin. J. Cancer* 34, 41.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59–73.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2013). Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity* 39, 74–88.

Titre :

Analyse de l'infiltration immunitaire et conséquences thérapeutiques
potentielles dans les cancers du rectum traités par radiochimiothérapie
néoadjuvante

Résumé :

Les cancers du rectum sont traités par radiochimiothérapie (RCT) néoadjuvante avant l'exérèse chirurgicale. La réponse à la RCT est variable et de nouvelles options thérapeutiques sont actuellement en cours d'étude. Dans le cancer colorectal, la qualité et la densité de l'infiltrat immunitaire (CD3 et CD8) sont des facteurs pronostiques majeurs. L'intégration de cette composante immunitaire est en cours de translation clinique. Dans les cancers du rectum traités par RCT, la compréhension du rôle de l'infiltrat immunitaire nécessite l'analyse des biopsies diagnostiques prélevées avant tout traitement. L'analyse de la densité en CD3 et en CD8 par immunohistochimie sur ces biopsies nous a permis de montrer une corrélation entre la densité de l'infiltration immunitaire et la réponse à la RCT. Une bonne infiltration immunitaire était également corrélée à un meilleur taux de survie sans récurrence. Les analyses transcriptomique et protéomique sur des cancers du rectum traités ou non par RCT, nous ont permis de montrer l'induction d'une réponse Th1 cytotoxique ainsi qu'une surexpression de molécules de co-stimulation inhibitrices dans les cancers traités par RCT. L'association du critère immunitaire au critère de réponse clinique à la RCT permet d'individualiser les patients bons répondeurs à la RCT qui pourraient bénéficier d'une stratégie de conservation d'organe (watch and wait).

Mots clés :

Cancer du rectum, Infiltrat immunitaire, « watch and wait », Immunoscore

**Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06**