



L'hyperleucocytose et la neutrophilie, facteurs pronostiques avant chimioradiothérapie des carcinomes épidermoïdes du canal anal

Antoine Schernberg

► To cite this version:

Antoine Schernberg. L'hyperleucocytose et la neutrophilie, facteurs pronostiques avant chimioradiothérapie des carcinomes épidermoïdes du canal anal. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01892394

HAL Id: dumas-01892394

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01892394>

Submitted on 10 Oct 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 - NoDerivatives 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 2018

N° 43

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINEL'hyperleucocytose et la neutrophilie, facteurs pronostiques avant
chimioradiothérapie des carcinomes épidermoïdes du canal analPrésentée et soutenue publiquement
le 4 avril 2018

Par

Antoine SCHERNBERG

Né le 23 janvier 1989 à Reims (51)

Dirigée par Mme le Professeur Florence Huguet, PU-PH

Jury :

M. Le Professeur Philippe Maingon, PU-PHPrésident
M. Le Professeur Éric Deutsch, PU-PH
M. Le Docteur Jean-Luc Marin, PH
M. Le Docteur Laurent Quéro, PHExcept where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

À mon Président de Jury, Monsieur le Professeur Philippe MAINGON,

de me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse et d'accepter de juger mon travail.

Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

À ma Directrice de Thèse, Madame le Professeur Florence HUGUET,

pour m'avoir fait confiance en acceptant de diriger ce travail.

Je te remercie pour ta disponibilité et tes conseils renouvelés depuis mon 3^{ème} semestre d'internat, de l'apprentissage la radiothérapie à la découverte de la Frick Collection. Je mesure la chance que j'ai de recevoir ta formation et suis si heureux de pouvoir continuer à travailler dans ton service.

À Monsieur le Professeur Éric DEUTSCH,

je vous serai toujours reconnaissant pour votre accueil 3 fois renouvelé au sein du département clinique et, durant un an, dans le laboratoire que vous dirigez. Je vous remercie d'avoir su m'inciter à aller jusqu'au bout de ma recherche. Trouvez ici l'expression de toute ma gratitude.

À Monsieur le Docteur Jean-Luc MARIN,

de me faire la faveur d'apporter votre savoir et votre expertise clinique à ce travail en siégeant dans mon jury de thèse. Je vous adresse mes vifs remerciements.

À Monsieur le Docteur Laurent QUÉRO,

pour votre investissement dans notre spécialité, la qualité de votre enseignement aux internes et pour avoir accepté de juger mon travail.

À Madame le Docteur Laurence MOUREAU ZABOTTO,

pour votre travail de recueil de données des patients traités à l'Institut Paoli-Calmettes, qui m'a permis de valider ce travail.

À tous les médecins qui, par leur aide, ont rendu ces travaux possibles.

À Alice, pour ton amour, ta présence, ton écoute et bien sûr ta patience et ta tendresse dans ton entreprise de faire de moi quelqu'un de bien. Au quotidien ta joie de vivre m'est indispensable et voir ton visage sur nos photos aux quatre coins du globe m'est essentiel. Merci aussi pour ta relecture de ce manuscrit.

À mes parents, Cécile et François, Mam' et Pap', pour votre exemple et votre soutien inconditionnel tout au long de mes études, du petit cancre à l'interne parisien. Vous êtes toujours là dans les moments qui comptent pour moi. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci pour tout. Mon amour pour vous est sans faille.

À ma grande sœur, Hélène, pour toutes les années passées à tes côtés. Nos différences sont pour moi une source d'enrichissement. Je suis peiné de la distance qui nous sépare. Je t'adore.

À ma belle-famille, particulièrement Michèle, et ses 3 fils Benjamin, Mathias et Simon, et aux autres. Vous m'avez accueilli comme votre fils. Vous avez une grande place dans mon cœur.

À mes chers confrères et amis, à ceux rencontrés sur les bancs de la faculté, compagnons d'externat, à mes co-internes, aux internes rencontrés au détour des salles de garde, aux membres de la SFJRO, du SIHP... Merci pour ces innombrables moments de rigolade (parfois studieux), nos vacances au ski, en bateau, en safari, ou en congrès outre-Atlantique et pour votre soutien. Toutes ces années m'auraient paru bien longues sans vous !

À mes enseignants au quotidien, chefs de clinique, assistants, séniors et universitaires qui m'ont supporté et accompagné depuis mon premier semestre d'internat.

Aux équipes paramédicales qui m'ont toujours si chaleureusement adopté, merci !

Aux amis non carabins, qui m'offrent un bol d'air frais ! Merci.

Et à tous ceux que j'ai oubliés.

Table des matières

I - Carcinome épidermoïde du canal anal : Introduction.....	9
1. Généralités, épidémiologie : cancer du canal anal	9
2. Examens complémentaires	9
3. Traitement du cancer du canal anal.....	10
4. Précautions durant le traitement	13
5. Efficacité du traitement.....	13
II - Inflammation et cancer	14
1. Contexte	14
1.1. Inflammation associée au cancer	14
1.2. Microenvironnement tumoral.....	14
1.3. Neutrophiles : Cellules effectrices du système immunitaire	14
1.4. Radiothérapie	15
6. Une interaction complexe	15
1.1. Les neutrophiles favorisent l'évolution du cancer.....	15
2.2. Le double jeu des polynucléaires neutrophiles	16
2.3. Radiothérapie, réponse immunitaire	17
2.4. Neutrophiles et radiothérapie	18
7. Biomarqueur de l'inflammation	22
3.1. Biomarqueurs dérivés de l'inflammation	22
3.2. Neutrophilie : biomarqueur pronostique	22
3.3. Neutrophilie : biomarqueur prédictif	23
8. Approches thérapeutiques	23
4.1. Thérapies ciblant les neutrophiles.....	23
4.2. Thérapies de manipulation des neutrophiles	24
4.3. Radiothérapie combinée à des thérapies ciblant les neutrophiles.....	25
4.4. Autres combinaisons avec des thérapies ciblant les neutrophiles	25
III - Objectif	27
IV - Matériels et Méthodes	28
1. Patients et tumeurs.....	28
2. Caractéristiques du traitement.....	29
3. Analyse de la numération formule sanguine	30

4. Suivi et analyse statistique	30
V - Résultats : cohorte d'entrainement	32
1. Caractéristiques cliniques et biologiques: cohorte d'entrainement.....	32
2. Traitement : cohorte d'entrainement	32
3. Suivi : cohorte d'entrainement	37
4. Valeur pronostique de l'hyperleucocytose et de la neutrophilie : cohorte d'entrainement	37
5. Patients séropositifs VIH et métastatiques au diagnostic : cohorte d'entrainement.....	43
VI - Résultats : cohorte de validation	44
1. Caractéristiques cliniques et biologique : cohorte de validation	44
2. Traitement : cohorte de validation	46
3. Suivi : cohorte de validation	46
4. Valeur pronostique de l'hyperleucocytose et de la neutrophilie : cohorte de validation	47
VII - Discussion	51
VIII - Conclusion.....	56
IX - Références	58
X - Annexe	68
1. ANNEXE 1 : Classification TNM clinique de l'AJCC et de l'UICC, 7ème édition (2011) :	68
2. ANNEXE 2 : Publications associées.	68

Table des tableaux et figures

FIGURE 1A. Dosimétrie prévisionnelle d'une tomothérapie pelviinguinale d'un carcinome épidermoïde infiltrant du canal anal T2 N1	12
FIGURE 1B. Histogramme Dose-Volume d'une tomothérapie pelvi-inguinale d'un carcinome épidermoïde infiltrant du canal anal T3 N1.....	12
FIGURE 2 : Polarisation des neutrophiles et interactions avec les tumeurs.....	20
FIGURE 3 : Interactions : radiothérapie et l'immunité antitumorale.....	21
TABLEAU 1A. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients inclus dans la cohorte d'entraînement.	34
TABLEAU 1B. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients séropositifs inclus dans la cohorte d'entraînement.....	35
TABLEAU 1C. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients métastatiques inclus dans la cohorte d'entraînement.	36
FIGURE 2A. Estimation de la survie globale chez les patients avec ou sans hyperleucocytose (cohorte d'entraînement).	38
FIGURE 2B. Estimation de la survie sans progression chez les patients avec ou sans hyperleucocytose (cohorte d'entraînement).....	39
TABLEAU 2. Résultats des analyses univariées et multivariées dans la cohorte d'entraînement (les facteurs significatifs sont en caractères gras).	41
FIGURE 3A. Pourcentages de rechute locorégionale et à distance dans notre cohorte par rapport aux facteurs de risque initiaux (analyse multivariée).	42
FIGURE 3B. Pourcentages de rechute locorégionale et à distance dans notre cohorte par rapport aux facteurs de risque initiaux (analyse multivariée).	42
TABLEAU 3. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients inclus dans la cohorte de validation.	45

FIGURE 4A. Estimation de la survie globale chez les patients avec ou sans neutrophilie (cohorte de validation).	48
FIGURE 4B. Estimation de la survie sans progression chez les patients avec ou sans neutrophilie (cohorte de validation).	48
TABLEAU 4. Résultats d'analyses univariées et multivariées (Cox) pour la cohorte de validation (facteurs significatifs en gras).	50

I - Carcinome épidermoïde du canal anal : Introduction

1. Généralités, épidémiologie : cancer du canal anal

Le canal anal est la partie terminale du tube digestif. Il mesure 3 à 4 cm, définissant la zone entre le rectum et la peau de la marge anale. Il est revêtu d'une muqueuse malpighienne. Les tumeurs de la marge anale sont classées avec les tumeurs cutanées (OMS).

Le carcinome épidermoïde du canal anal touche principalement les femmes, avec un sex-ratio de 4 femmes pour 1 homme (1). Dans près de 2/3 des cas, les patientes ont plus de 65 ans (1). L'HPV 16 est présent dans 89% des cancers de l'anus (2). Le carcinome épidermoïde du canal anal représente 2,5% des cancers digestifs. Son incidence en augmentation probablement en raison de la multiplication des partenaires sexuels responsable d'une réduction de la clairance naturelle de l'HPV (1,3). Dans les deux sexes, les facteurs de risques sont les infections liées à l'HPV, la séropositivité HIV, l'immunosuppression, le tabagisme, les rapports passifs anaux, la multiplication des partenaires sexuels et l'âge (4).

2. Examens complémentaires

Le bilan initial d'extension nécessite une collaboration étroite entre le chirurgien, l'oncologue radiothérapeute, le gastroentérologue et le radiologue. Il a pour objectif de décrire précisément les caractéristiques de la tumeur (localisation, taille, circonférence, extension aux organes de voisinage) et de rechercher une extension ganglionnaire (5,6). L'examen clinique comporte les touchers pelviens (rectal et vaginal le cas échéant), avec schéma annoté (examen sous anesthésie générale si nécessaire), une évaluation de la fonction sphinctérienne et une étude du périnée. Une anoscopie-rectoscopie avec biopsies est indispensable. La recherche d'adénopathies inguinales et sus-claviculaires est systématique lors de l'examen clinique, complété par une échographie en cas de doute. L'échoendoscopie permettra d'évaluer la profondeur d'invasion en cas de tumeur superficielle; l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'examen de choix pour l'évaluation fine de la profondeur d'invasion tumorale (6–8). La réalisation d'une tomographie par émission de positons couplée à un scanner (TEP-scanner) est

recommandée en cas de tumeur > T1 et/ou avec atteinte ganglionnaire (5). La tumeur sera classée selon la Classification TNM clinique de l'AJCC et de l'UICC, 7ème édition (2011) (ANNEXE 1) (7).

3. *Traitement du cancer du canal anal*

Depuis les années 1990, le traitement standard des carcinomes épidermoïdes du canal anal a évolué de la chirurgie radicale vers la chimioradiothérapie à visée curative avec conservation de la fonction sphinctérienne anale (9,10). En effet, ce type tumoral est particulièrement radio et chimio sensible (6,8). Le pronostic des patients est équivalent après chimioradiothérapie qu'après chirurgie radicale, tout en offrant de meilleurs résultats fonctionnels (9,11,12). L'objectif est d'obtenir un contrôle locorégional tout en conservant un sphincter anal fonctionnel.

Le traitement du carcinome épidermoïde du canal anal localement avancé (stade II et III) consiste en la chimioradiothérapie concomitante (deux cycles de 5-FU - mitomycine C, cycle de 28 jours) (13). Ce doublet de chimiothérapie a été démontré supérieur à un doublet associant cisplatine et 5-FU, dans l'essai Intergroup RTOG 98-11, avec un bénéfice en survie globale et sans récurrence à distance (13). La radiothérapie délivre une dose de 36 à 45 Gy en 1.8 Gy par fractions à un volume pelvien prophylactique, avec une dose séquentielle additionnelle de 14 à 20 Gy délivrée au volume tumoral (5,6).

L'irradiation nécessaire de la totalité du pelvis à cette dose dite prophylactique expose à un risque de complications du fait de la présence d'organes à risque, tels que l'intestin grêle, le côlon sigmoïde, le rectum, la vessie, les organes génitaux externes, les vaisseaux et les volumes osseux dont les têtes fémorales, le pubis et les branches ilio-pubiennes.

Alors que la radiothérapie a longtemps été réalisée selon une technique conformationnelle avec trois ou quatre faisceaux, de nouvelles modalités d'irradiation sont actuellement développées. Elles font l'objet d'une évaluation prospective et comparative : radiothérapie conformationnelle en modulation d'intensité (RCMI), tomothérapie hélicoïdale et Irradiation avec modulation d'intensité volumétrique par arthrothérapie (Volumetric Modulated Arc Therapy ou VMAT) (5,6).

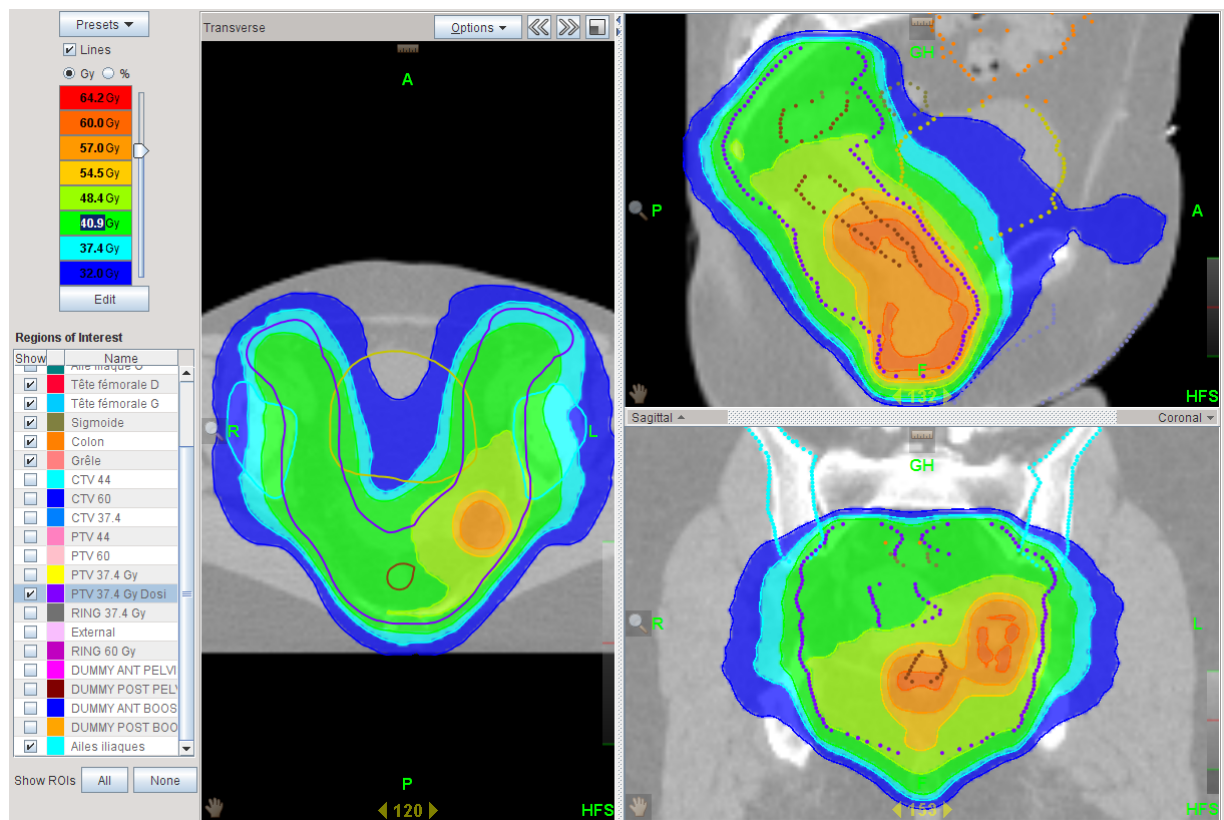
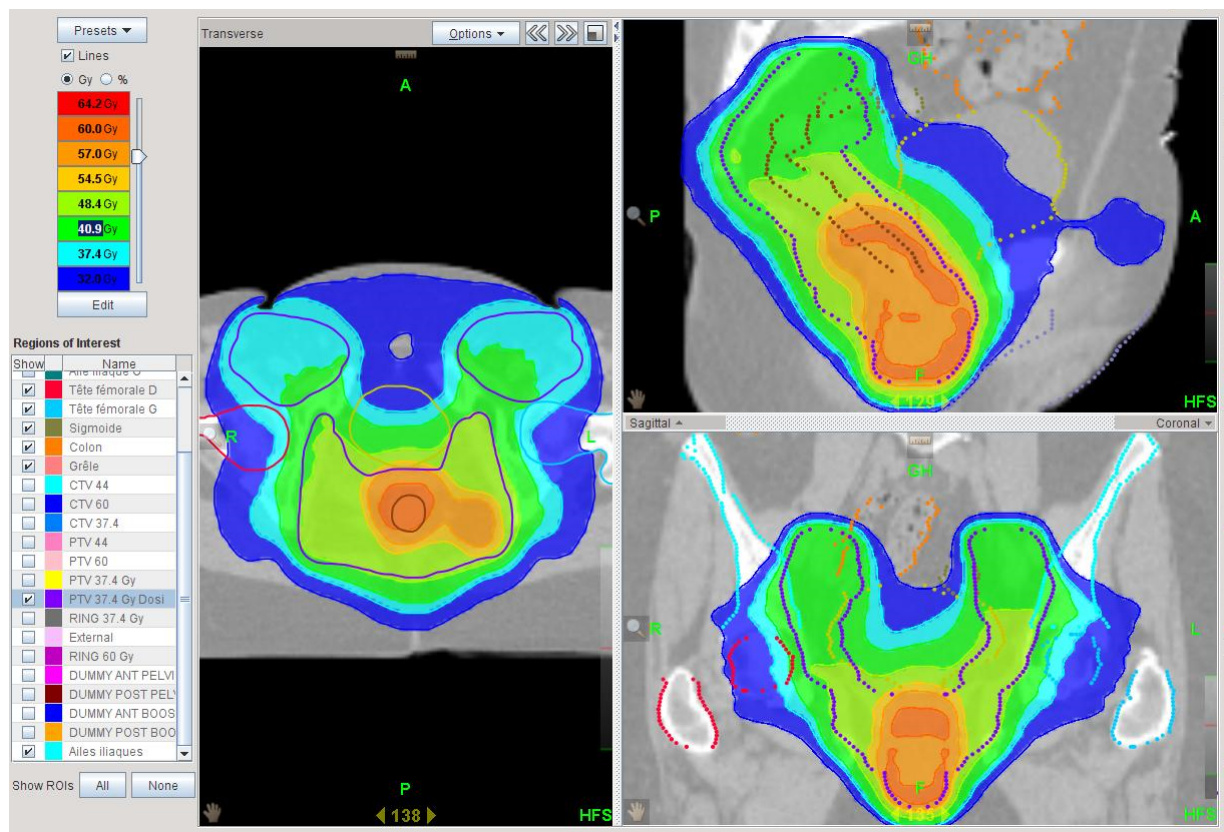


FIGURE 1A. Dosimétrie prévisionnelle d'une tomothérapie pelviinguinale d'un carcinome épidermoïde infiltrant du canal anal T2 N1

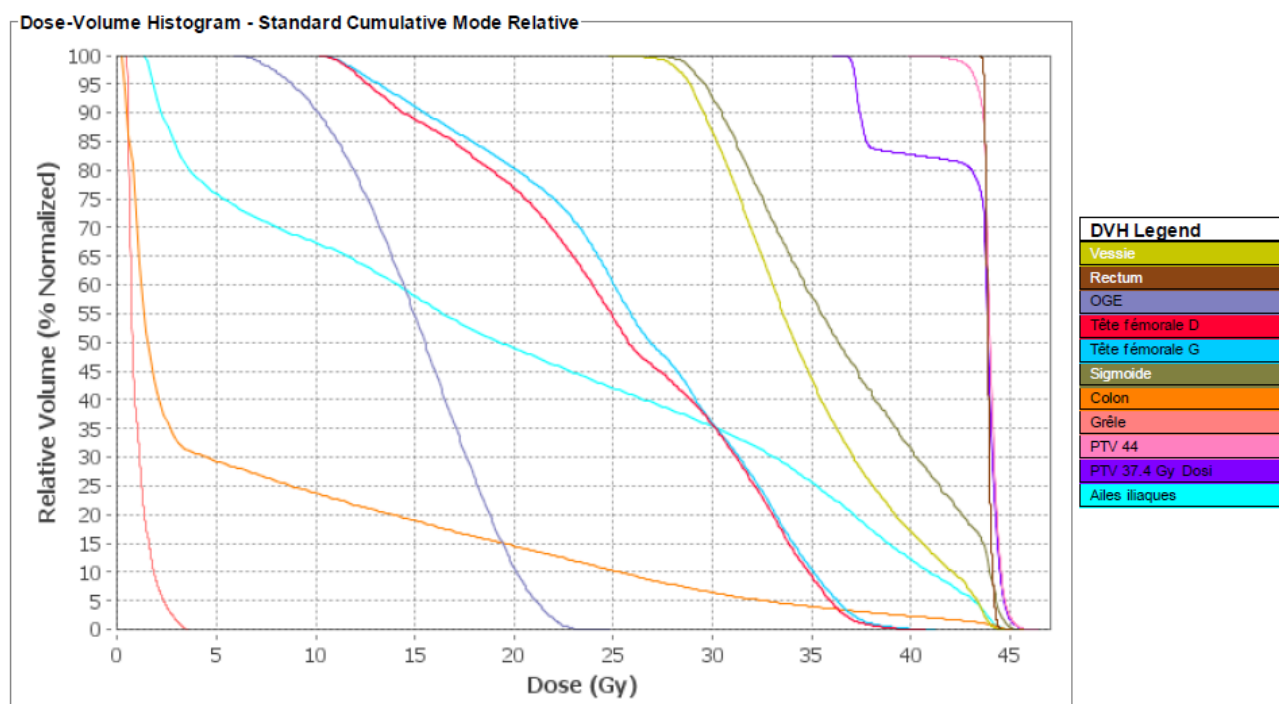


FIGURE 1B. Histogramme Dose-Volume d'une tomothérapie pelvi-inguinale d'un carcinome épidermoïde infiltrant du canal anal T3 N1.

Le traitement se déroule le plus souvent en décubitus dorsal. L'acquisition d'une double imagerie en position de traitement par scanner + IRM +/- TEP scanner au 18-FDG permet de visualiser et de délinéer les volumes cibles, les aires ganglionnaires ainsi que les organes à risque. La délinéation des volumes cibles a été décrite dans les recommandations du RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) (14).

La radiothérapie est associée à une chimiothérapie concomitante pour les tumeurs de plus de 4 cm de grand axe ou présentant une atteinte ganglionnaire péri tumorale, pelvienne ou inguinale. Pour les tumeurs les plus volumineuses, la radiothérapie pelvienne est réalisée dans un premier temps, en association à la chimiothérapie, à la dose préopératoire de 45 Gy (5 × 1,8 Gy par semaine). L'examen clinique et le bilan radiologique permettent ensuite

d'apprécier la réponse à la chimioradiothérapie et de décider de l'indication d'une poursuite de l'irradiation ou d'une amputation abdominopérinéale, en l'absence de régression tumorale, voire en cas de progression locorégionale (8,15,16).

4. Précautions durant le traitement

En pratique, l'irradiation doit être conduite sous régime pauvre en fibres, protecteurs de la muqueuse digestive et soins locaux du périnée visant à pallier les réactions de radio épithélite de ce dernier, du sillon inter fessier ou des plis inguinaux. Dans le cas d'une chimioradiothérapie concomitante, un bilan biologique hebdomadaire permet de juger de la toxicité hématologique. Une surveillance de la fonction rénale est également requise en cas d'administration de cisplatine. Des traitements symptomatiques anti diarrhéiques, anti-inflammatoires et/ou antalgiques sont administrés selon la clinique (5,6).

Les patients VIH + peuvent tolérer des modalités thérapeutiques identiques lorsque le taux de lymphocytes CD4 est supérieur à 400/mm³ et la charge virale indétectable. Il est souhaitable que le patient ait consulté par son médecin référent infectiologue au début, au cours et au décours de la chimioradiothérapie (8,17,18). Les surveillances cutanée et hématologique doivent être rapprochées eu égard d'un risque de toxicité accrue. Les troubles digestifs sont également plus fréquents chez ces patients, étant donné l'accélération du transit intestinal déjà observée avec le traitement antirétroviral (8,17,18).

5. Efficacité du traitement

Malgré une prise en charge thérapeutique adaptée, la survie globale à 5 ans est de 66% (1). Les principaux facteurs de mauvais pronostic sont le sexe masculin, l'atteinte ganglionnaire et la taille de la tumeur (19). L'anémie au diagnostic a également été associée à une survie globale inférieure, et à un risque majoré de rechute métastatique (20). Cependant, les rechutes se produisent souvent chez des patients ayant peu de facteurs de risque (11). Des biomarqueurs pronostiques supplémentaires sont donc nécessaires.

II - Inflammation et cancer

1. Contexte

1.1. Inflammation associée au cancer

Le cancer est une maladie chronique qui repose sur l'interaction entre des cellules tumorales et leur environnement. La réponse inflammatoire est un facteur essentiel à l'initiation et au développement du cancer (21,22). L'inflammation est responsable d'une immunosuppression, créant un environnement privilégié pour le développement des tumeurs (23,24). Les principaux médiateurs de l'inflammation associée aux tumeurs sont le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), le transducteur de signaux et activateur des voies de transcription 3 (STAT3), les espèces réactives d'oxygène et d'azote (ROS), les cytokines inflammatoires, les œstrogènes, les prostaglandines et certains microARN (25). Leur activité collective est responsable d'une réponse inflammatoire protumorale ou antitumorale par des modifications de la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la sénescence cellulaire, les taux de mutation de l'ADN, la méthylation de l'ADN et l'angiogenèse (23,24).

1.2. Microenvironnement tumoral

L'évolution tumorale est sous l'influence de son microenvironnement, composé de cellules hôtes diverses, y compris des cellules immunitaires (26). L'influence des macrophages et des lymphocytes associés aux tumeurs est relativement bien caractérisée, mais le rôle des neutrophiles, en tant que composant du microenvironnement ou en tant que cellules circulantes, n'a pas encore été pleinement caractérisé (27).

1.3. Neutrophiles : Cellules effectrices du système immunitaire

Les polynucléaires neutrophiles ont été initialement décrits par Ehrlich en 1879 (28). Ce sont les globules blancs circulants en plus grand nombre dans le sang. Ils sont produits en permanence dans la moelle osseuse à partir des précurseurs, en raison de leur durée de vie inférieure à 24 heures. Ils ont longtemps été considérés comme des cellules "kamikazes", se

sacrifiant en tuant les agents pathogènes par divers mécanismes: phagocytose, sécrétion d'espèces réactives oxygénées, et protéines antimicrobiennes (défensine, lysozyme et protéases réactives telles que l'élastase et la cathepsine), ou extrusion active d'ADN pour générer des pièges extracellulaires de neutrophiles (NET) (29).

De plus en plus d'études contredisent cette thèse, suggérant que les neutrophiles peuvent réguler le système immunitaire inné et adaptatif pendant l'évolution tumorale. La recherche considérable au cours des dernières années dans le domaine des immunothérapies anticancéreuses a généré une quantité croissante de connaissances sur les mécanismes d'implications des neutrophiles dans le cancer (22,30).

1.4. Radiothérapie

Les effets de la radiothérapie dépendent de la radiorésistance intrinsèque des cellules cancéreuses et de l'influence extrinsèque du microenvironnement tumoral (31). De nombreuses populations de cellules non cancéreuses associées à des tumeurs sont impliquées dans la promotion de la récurrence tumorale après traitement (31). Dans les suites d'une radiothérapie, les cellules tumorales recrutent des cellules inflammatoires dans la moelle osseuse, y compris les cellules myéloïdes CD11b⁺ et les macrophages (32,33). Les cellules recrutées peuvent reconnaître les composants de cellules en cours de mort cellulaire, qui comprennent les agonistes des récepteurs Toll Like (TLR) (31,34,35). Des études suggèrent que les cellules myéloïdes pourraient stimuler la restauration des vaisseaux sanguins tumoraux après une radiothérapie (31,36). Cependant, les mécanismes biologiques sous-jacents à la résistance tumorale après radiothérapie restent à définir.

6. Une interaction complexe

1.1. Les neutrophiles favorisent l'évolution du cancer

Une relation complexe entre les neutrophiles et les cellules cancéreuses favorise la progression du cancer et le processus métastatique (37). Les cellules cancéreuses et les cellules stromales du microenvironnement tumoral entraînent la génération et la libération des neutrophiles de la moelle osseuse, et ce dès le début de leur évolution (30). Les cellules cancéreuses génèrent une polarisation phénotypique et fonctionnelle des neutrophiles

capables de stimuler la croissance tumorale, localement et de manière systémique dans les organes cibles des métastases (30). Les neutrophiles et les cellules cancéreuses produisent des enzymes régulatrices, comme les métalloprotéases matricielles (MMP), la lysyl oxydase (LOX), l'urokinase (uPA), qui modifient la matrice extracellulaire tumorale (38). Cette matrice extracellulaire modifiée agit à son tour comme médiateur de la fonction des cellules myéloïdes et cancéreuses (38). De plus, grâce à la sécrétion de MMP, les neutrophiles inhibent l'activité des lymphocytes "natural killer" (NK) et stimulent l'extravasation des cellules tumorales (39). Une telle protection contre les attaques du système immunitaire inné et adaptatif offre un avantage compétitif majeur aux cellules tumorales en transit (40). Par conséquent, les neutrophiles associés aux tumeurs ont récemment été présentés comme la pierre angulaire de l'initiation tumorale, de l'angiogenèse, de la croissance tumorale et du processus métastatique (30,37).

Les neutrophiles ont été associés à la progression tumorale par de multiples voies. Par exemple, dans le cancer du sein, l'estradiol favorise la migration des cellules tumorales par le recrutement et l'activation des neutrophiles (41). Les œstrogènes ont été associés à une diminution de l'activité inflammatoire des neutrophiles et la progestérone à une augmentation de la chimiotaxie des neutrophiles (29). Ces deux hormones semblent avoir un effet anti-apoptotique sur les neutrophiles (29,41). La formation de pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs, par le processus de NETose) est une forme unique de mécanisme de mort cellulaire caractérisée par la libération de réseaux de fibres extracellulaires, principalement composées d'ADN provenant de neutrophiles, qui enchevêtrent les pathogènes (40,42). Les cellules tumorales enchevêtrées seraient plus aptes à survivre dans le milieu intraluminal, à adhérer aux cellules endothéliales, et à subir ensuite une extravasation dans les organes cibles des cellules métastatiques (40). Des données récentes montrent que les NETs produites par l'infection ou induites par les cellules cancéreuses en l'absence d'infection peuvent favoriser le processus métastatique (43).

2.2. Le double jeu des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles peuvent exercer une activité antitumorale (phénotype N1) ou protumorale (phénotype N2) selon le microenvironnement tumoral (44). Les neutrophiles

associés aux tumeurs sont par exemple polarisés d'un phénotype N2 à un phénotype N1 en l'absence de facteur de croissance TGF- β (44). Inversement, les neutrophiles associés aux tumeurs de phénotype N1 (antitumoraux) ne sont pas induits en l'absence d'interféron alpha (IFN- α) (45). Les neutrophiles antitumoraux N1 induisent un effet cytotoxique par la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, réduisent la tumorigénèse par sécrétion de MMP-8, induisent l'apoptose des cellules tumorales par la voie du Fas-ligand et la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (46). Ils stimulent le recrutement de leucocytes et l'activation immunitaire en produisant diverses chemokines et cytokines (46). D'autre part, les neutrophiles de phénotype N2 protumoraux stimulent la cancérogénèse et diminuent l'apoptose des cellules tumorales par la production de MMP-9, favorisent l'extravasation des cellules tumorales par la sécrétion de collagénase et l'activation d'AKT par l'élastase, stimulent l'angiogénèse par le recrutement des MMP et des chemokines, et génèrent le recrutement de leucocytes et la suppression immunitaire par des chemokines et la sécrétion d'arginase (46).

Il existe également une interaction complexe entre les neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) et les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs) (44,46). Les cellules suppressives dérivées de lignées myéloïdes se développent pendant l'inflammation et répriment les réponses des lymphocytes T (47). Des niveaux accrus de TILs CD8⁺ ont été associés à un meilleur pronostic dans différents types histologiques de cancers (48,49). Des études ont confirmé une corrélation négative entre le nombre de TANs et le nombre de TILs CD8⁺ (50,51). L'interaction entre les neutrophiles et les TILs illustre le comportement bipolaire des neutrophiles au cours du processus néoplasique.

2.3. Radiothérapie, réponse immunitaire

La conception traditionnelle de la radiothérapie et son activité immunosuppressive a été remise en question par les résultats des recherches sur sa synergie potentielle avec l'immunothérapie (52). La radiothérapie amplifie les réponses immunitaires adaptative et innée des tumeurs en induisant la libération de cytokines pro-inflammatoires, favorisant le recrutement de lymphocytes T effecteurs dans les tumeurs, l'extravasation des cellules immunitaires et la mort immunitaire induite par les lymphocytes T cytotoxiques (53). Les ligands du récepteur 9 (TLR9) libérés par les tumeurs ont été décrits comme des acteurs

majeurs de l'inflammation associée aux cellules myéloïdes et à la régénération tumorale après un traitement par radiothérapie (31). Les effets tumorigènes du TLR9 dépendraient de l'expression de l'interleukine (IL)-6 médiée par MyD88/NF- κ B, ce qui entraînerait l'activation en aval de la voie de signalisation Jak/STAT3 dans les cellules myéloïdes (31).

Des études cliniques ont révélé que la radiothérapie peut déclencher des réactions en dehors du volume irradié, appelé "l'effet abscopal" par Mole et al. dès 1953 (53–55). Les tumeurs irradiées induisent une augmentation de la présentation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, conduisant à la reconnaissance tumorale (53). Ils libèrent également des signaux de danger, activant les lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux (53). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris et faiblement exploités sur le plan thérapeutique (55).

2.4. Neutrophiles et radiothérapie

La radiothérapie active l'immunité innée par des mécanismes dépendants du TLR (52). Les neutrophiles reconnaissent les agonistes des TLR après une radiothérapie localisée (31,34,35). La liaison des TLRs stimulerait les réponses immunitaires dirigées contre les antigènes associés aux tumeurs, augmentant à la fois l'immunité antitumorale et le ciblage à médiation immunitaire du stroma tumoral, en plus de diminuer l'activité régulatrice des lymphocytes T (52). STAT3 a également été décrit comme un acteur rôle majeur de stimulation de la réponse immunitaire et de régulation des TLR dans les cellules myéloïdes (56). L'inactivation de STAT3 dans les cellules hématopoïétiques a été associée à l'activation de l'immunité innée par les TLR, à une production accrue d'IFN- α , de TNF- α , d'IL-12, à l'activation des neutrophiles et à une activité antitumorale accrue (56).

Les tumeurs irradiées recrutent un grand nombre de cellules myéloïdes CD11b⁺ dérivées de la moelle osseuse exprimant la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9), restaurant ainsi la croissance vasculaire et tumorale (57). Cette hypothèse a été étayée par l'observation d'une amélioration significative de l'effet antitumoral de la radiothérapie avec traitement concomitant par anticorps anti-CD11b, inhibant l'adhésion et la transmigration des cellules dérivées de la moelle osseuse (32).

Le rôle clé des neutrophiles dans la réponse immunitaire antitumorale radio-induite a été récemment rapporté lors de travaux étudiant les effets immunologiques de la radiothérapie sur le microenvironnement tumoral (58). L'expression du TGF- β dans le microenvironnement tumoral favorise le processus métastatique et la progression tumorale, en induisant une population de TANs avec un phénotype protumoral N2 (59). TGF β intervient dans l'activation des voies SMAD, PI3K-AKT, RHOA et MAPK (29). Il a également été décrit que la radiothérapie inhibe la voie TGF- β , stimulant ainsi la polarisation neutrophilique vers un phénotype N1 antitumoral (44,58).

Les interactions entre les cellules tumorales, le microenvironnement, les neutrophiles périphériques ainsi que les interactions avec la radiothérapie et les cellules immunitaires sont résumées dans les **FIGURES 2 et 3**.

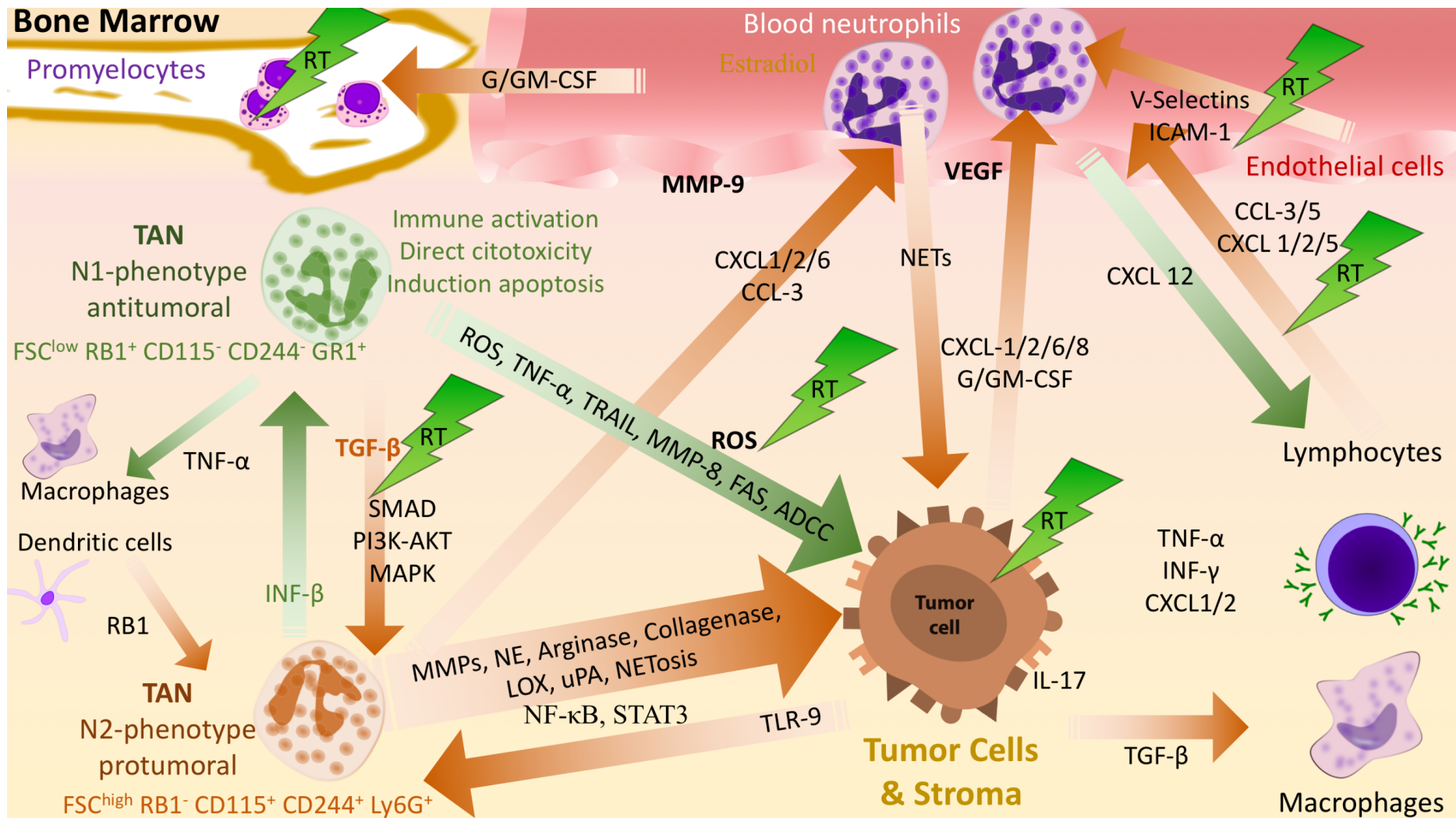


FIGURE 2 : Polarisation des neutrophiles et interactions avec les tumeurs.

Phénotype N1 : Activation immunitaire, Cytotoxicité directe, Apoptose par induction ; Phénotype N2 : Suppression immunitaire, angiogenèse tumorale, prolifération tumorale, activité prométastatique ; TAN: neutrophiles associés aux tumeurs

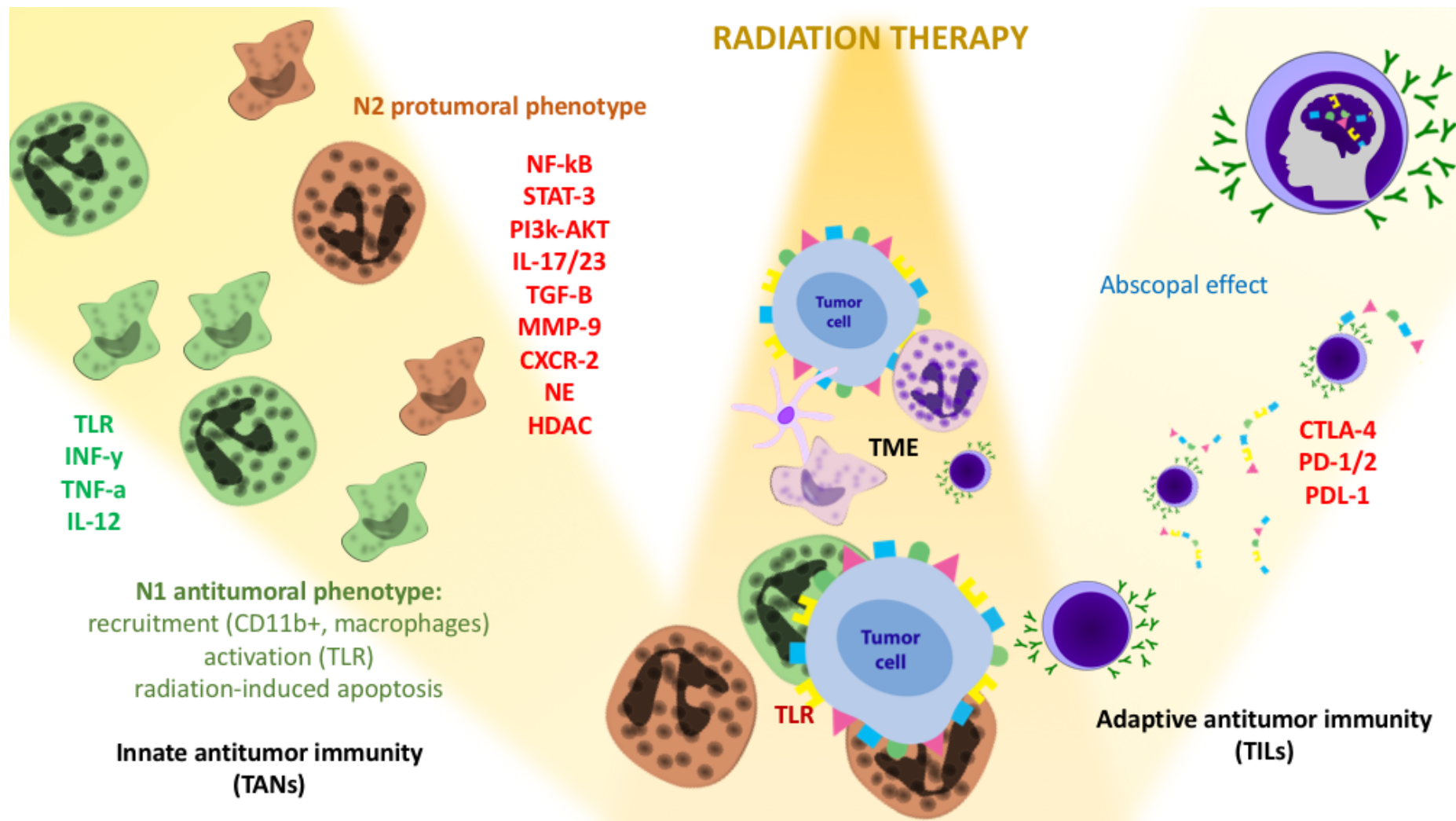


FIGURE 3 : Interactions : radiothérapie et l'immunité antitumorale

TANs : neutrophiles associés aux tumeurs ; TILs : lymphocytes infiltrant les tumeurs

7. Biomarqueur de l'inflammation

3.1. Biomarqueurs dérivés de l'inflammation

Des dosages ou des scores basés sur des marqueurs de l'inflammation ont été largement étudiés en tant que biomarqueurs pronostiques chez les patients atteints de cancer. La combinaison de la protéine C réactive (CRP) et de l'albumine, le Glasgow Prognostic Score (GPS), est validé dans divers types histologiques de cancer (60). Le rapport neutrophile/lymphocyte (NLR), le rapport plaquettaire/lymphocyte (PLR) entre autres sont également des biomarqueurs bien établis (61,62). Cependant, le NLR illustre (i) une augmentation isolée du nombre de neutrophiles, (ii) une diminution du nombre de lymphocytes ou (iii) une association des deux (63). Ces marqueurs sont efficaces parce qu'ils mettent en évidence un état inflammatoire mais ne sont pas des marqueurs spécifiques avec des cibles actionnables.

3.2. Neutrophilie : biomarqueur pronostique

Dans le domaine de la radiothérapie ainsi que de l'immunothérapie, il est nécessaire que les biomarqueurs prédisent et évaluent la réponse immunitaire (53). Les neutrophiles constituent une part importante de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le microenvironnement tumoral. Ils ont même été établis comme étant le type de cellules immunitaires le plus répandu dans le microenvironnement des adénocarcinomes bronchiques (46,64). Une association négative entre des niveaux élevés de TANs et une survie globale, sans récurrence, sans récurrence et spécifique au cancer a été décrite dans divers types de cancer (65).

La question est de savoir si les propriétés immunosuppressives des TANs sont présentes ou non chez leurs homologues circulants (66). Des études rétrospectives ont associé le nombre de neutrophiles circulants $> 7 \text{ G/L}$, c'est-à-dire la neutrophilie, avec une survie globale inférieure dans différents modèles tumoraux, principalement des carcinomes épidermoïdes, chez des patients traités par radiothérapie (67–71). Dans l'étude EORTC 18951, la neutrophilie au diagnostic était un facteur pronostique indépendant associé à une survie globale inférieure chez les patients atteints de mélanome métastatique soumis à une immunothérapie à base d'interleukine 2 (72). L'inflammation pulmonaire extrinsèque a également été associée au recrutement de neutrophiles dérivés de la moelle osseuse par

l'expression excessive de la glycoprotéine thrombospondine-1 (TSP-1) dans le stroma tumoral, ce qui favorise le processus métastatique (73). Ces résultats pourraient expliquer en partie pourquoi environ 80% des patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules ne répondent pas aux immunothérapies actuelles ("checkpoint inhibiteurs") (64).

3.3. *Neutrophilie : biomarqueur prédictif*

L'association prédictive entre la neutrophilie et la résistance au traitement a été mal étudiée, la plupart des études se concentrant sur l'association avec la survie globale des patients. Une analyse post hoc d'une étude clinique randomisée menée chez des patients atteints d'un cancer du pancréas localement avancé non résécable (LAP-07) a révélé une association prédictive entre la neutrophilie et l'évolution du nombre de neutrophiles avec une réponse locale à la chimioradiothérapie (74). Cette observation appuie le besoin d'une évaluation prospective du taux de neutrophiles circulants dans les essais cliniques, pour mettre en évidence des associations prédictives de la réponse aux traitements.

8. *Approches thérapeutiques*

4.1. *Thérapies ciblant les neutrophiles*

Des thérapies ciblant les neutrophiles sont actuellement mises au point pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes (30). Par exemple, pour les patients atteints d'une broncho-pneumopathie chronique, l'utilisation de l'antagoniste du CXCR2 diminue le nombre de neutrophiles absolus, réduit l'inflammation biologique et les symptômes de la maladie (75). L'inhibition de la signalisation CXCL8-CXCR1/2 par les anticorps CXCL8, ou de petites molécules ciblant CXCR1 et/ou CXCR2, diminue également la croissance et la progression tumorale dans des modèles pré-tumoraux (27). L'inhibition du CXCR2 a également été associée à une majoration de l'action antitumorale en cours de chimiothérapie (76). Des essais cliniques en cours évaluent la reparixine, un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 (30).

Compte tenu du rôle critiques des neutrophiles pour la défense de l'hôte contre les

infections, leur ciblage peut cependant être associé à des effets secondaires (27). Une autre approche pourrait consister à cibler spécifiquement les neutrophiles du microenvironnement tumoral et non l'ensemble des neutrophiles circulants, par migration inverse et repolarisation (27). De plus, les approches de ciblage des neutrophiles en clinique nécessiteront une évaluation des stratégies optimales de traitement d'association (30). Par exemple, la neutrophilie a été associée à une résistance à la thérapie anti-VEGFA, ce qui suggère une potentialisation des thérapies ciblées anti-angiogéniques et anti-neutrophiles (30). En effet, une synergie thérapeutique a été observée lorsque la thérapie anti-VEGF-A est associée à l'appauvrissement des neutrophiles (77).

4.2. Thérapies de manipulation des neutrophiles

Les neutrophiles n'ont pas tous des effets protumoraux. Les neutrophiles ayant un phénotype N2 protumoral sont caractérisés par une forte expression de CXCR4, VEGF et de la gélatinase B/MMP9 (27). Le TGF- β induit dans le microenvironnement tumoral une population de TANs avec un phénotype protumoral N2 (44). Le blocage du TGF- β ralentit la croissance de la tumeur par l'activation des lymphocytes T CD8+, des macrophages et des neutrophiles associés à la tumeur avec un phénotype N1 antitumoral (44,59). Des études ont montré une association entre les neutrophiles N1 qui expriment des cytokines et/ou des chimiokines immunoactivantes, ainsi que de faibles taux d'arginase et une activité antitumorale induite par le blocage du TGF (27). Il sera ainsi crucial de comprendre comment les neutrophiles sont polarisés et de savoir s'ils peuvent être reprogrammés, et comment ils peuvent l'être (27). Les inhibiteurs de la TGF- β représentent donc une voie d'action prometteuse ; des essais cliniques sont en cours (78,79).

La modification épigénétique des neutrophiles pour moduler leur polarisation ne se limite pas seulement au domaine de la recherche: les inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDACi) ont obtenu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis (29). Les HDACi ont un impact sur la différenciation, la prolifération et la survie des populations distinctes de leucocytes (80). Ils influencent positivement l'angiogenèse et le système immunitaire dans une perspective antitumorale (80). Ils améliorent également l'activité des

médicaments anticancéreux, y compris le cisplatine et les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance antiépidermique (anti-EGFR) (81).

4.3. Radiothérapie combinée à des thérapies ciblant les neutrophiles

Dans des modèles précliniques ont rapporté qu'un appauvrissement des neutrophiles - anti-Ly6G+ était associé à une meilleure efficacité de la radiothérapie (30). A l'inverse, la combinaison d'une radiothérapie ciblée à un agent stimulant la production de neutrophiles peut renforcer l'immunité antitumorale (58). L'administration concomitante de G-CSF améliore l'activité antitumorale médiée par la radiothérapie en activant les neutrophiles avec le phénotype N1-antitumoral (58). Ce mode d'action a été confirmé dans un essai clinique de preuve de concept, combinant le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et une radiothérapie localisée, afin de générer des réponses abscopales chez les patients atteints de tumeurs solides métastatiques (82,83).

Cependant, si l'on considère les combinaisons de radiothérapie et d'immunothérapie, les principaux problèmes demeurent sans réponse: la dose totale et le fractionnement, la chronologie optimale de la radiothérapie et les immunothérapies (53). La combinaison de traitements ciblant les neutrophiles avec la radiothérapie est intéressante mais une meilleure compréhension des effets immunologiques de la radiothérapie est nécessaire pour concevoir les prochains essais thérapeutiques (53,55).

4.4. Autres combinaisons avec des thérapies ciblant les neutrophiles

Une approche thérapeutique à l'étude consiste en l'association de l'immunothérapie par inhibition des "checkpoints" des lymphocytes T et de la manipulation des neutrophiles (30). Des études expérimentales ont montré que la protéine 1 (PD1) et l'anticytotoxique T lymphoïde associé à l'anticytotoxique 4 (CTLA4) agissent en synergie avec les anti-CXCR2 ou anti-Ly6G, respectivement, pour retarder la croissance tumorale (84,85).

La chimiothérapie est un autre partenaire potentiel de la combinaison, bien que de nombreux types de chimiothérapie eux-mêmes affectent négativement la production de

neutrophiles. La profondeur de la neutropénie induite par la chimiothérapie a d'ailleurs été associée à une amélioration de la survie (30). Si l'on considère la neutropénie comme un marqueur biologique de l'efficacité de la chimiothérapie, l'absence de neutropénie peut indiquer un dosage insuffisant et une efficacité inadéquate. Cependant, l'avantage de la neutropénie induite par chimiothérapie pour la survie globale du patient pourrait découler de la réduction des neutrophiles protumoraux, qui contrecarrent l'efficacité de la chimiothérapie (30). La gemcitabine et le 5-fluorouracile réduisent directement la viabilité et/ou modifient la fonctionnalité des cellules myéloïdes, ce qui influe alors sur l'efficacité anticancéreuse de ces médicaments (30)

III - Objectif

L'objectif de cette étude était d'analyser l'impact pronostique de l'hyperleucocytose systémique et de la neutrophilie sur la survie globale, la récurrence locale et la récurrence métastatique à distance dans deux cohortes multicentriques de patients traités de façon homogène par chimioradiothérapie conservatrice à visée curative pour un carcinome épidermoïde du canal anal.

IV - Matériels et Méthodes

1. Patients et tumeurs

Les dossiers cliniques des patients traités à l'Institut Gustave Roussy consécutivement entre 2006 et 2016 ont été analysés pour constituer la cohorte d'entraînement. Ceux des patients traités dans deux autres centres, (i) l'Institut Paoli-Calmettes (Marseille, France) entre mai 2000 et novembre 2014, et (ii) l'Hôpital Tenon (Paris, France) entre octobre 2011 et juin 2015 ont été analysés pour constituer une cohorte de validation bicentrique. L'extraction des données a été effectuée indépendamment dans chaque institution.

Les patients inclus devaient avoir été traités dans un but curatif et conservateur par chimioradiothérapie pour un carcinome épidermoïde du canal anal histologiquement prouvé. Les explorations au moment du diagnostic comprenaient une échoendoscopie anorectale, une tomodensitométrie (TDM) permettant l'exploration des régions thoracique, abdominale et pelvienne, ainsi qu'une IRM pelvienne. Un TEP-scanner eu 18-FDG a été prescrit chez les patients atteints d'une tumeur > T1 et/ou avec atteinte ganglionnaire (5). La stadification de la maladie a été définie selon le manuel publié par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2002, 7ème édition (Annexe 1).

Dans la cohorte d'entraînement, nous avons enregistré et analysé à part les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au moment du diagnostic s'ils étaient traités par chimioradiothérapie concomitante. Les patients atteints d'une maladie métastatique d'emblée traités par chimioradiothérapie standard avec une intention de contrôle locorégional, suivie d'une chimiothérapie, ont également été analysés séparément. Nous avons exclu les patients traités à visée palliative par radiothérapie hypofractionnée ainsi que les patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante, et ceux présentant un syndrome inflammatoire chronique (ex : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [MICI], ou traités pour une maladie immunitaire, une infection aiguë ou chronique (hors VIH), ou sous traitement médicamenteux confondant (corticostéroïdes, antibiotiques pour une infection

récente...).

2. Caractéristiques du traitement

Les patients traités à l'Institut Gustave Roussy ont reçu une radiothérapie externe (45 Gy en 25 fractions de 1,8 Gy ou 44 Gy en 22 fractions de 2 Gy) dans un volume prophylactique comprenant les aires ganglionnaires iliaques et inguinales bilatérales. La plupart des patients avant 2009 ont été traités par une technique conformationnelle en 3D sur un accélérateur linéaire selon avec une technique mono-isocentrique ; ceux traités après 2009 ont reçu une RCMI (86). Un complément de dose de 15 à 20 Gy était délivré au volume cible clinique (CVT), généralement défini à partir du volume tumoral macroscopique (GTV) additionné d'une marge de 1 à 2 cm. Ce complément de dose était délivré de manière séquentielle. Les organes à risque étaient la vessie, le rectum, l'intestin grêle et les os du bassin. Tous les organes à risque ont été délinéés de façon à générer des histogrammes dose-volume avec des doses et des volumes maximums tolérés. Le traitement était réalisé avec un accélérateur linéaire d'au moins 6 MV. Les patients atteints d'une tumeur >T1 et/ou d'une atteinte ganglionnaire ont reçu une chimiothérapie concomitante IV associant mitomycine C (10 mg/m² les jours 1 et 29) et 5-fluorouracile (5FU) (1 000 mg/m² les jours 1 à 4 et 29 à 32) ou une dose équivalente de capécitabine (5). Les patients présentant une maladie T1N0 ont été traités par radiothérapie exclusive selon des recommandations spécifiques (5,87). Certains patients atteints d'une petite tumeur sans atteinte ganglionnaire ont reçu un complément séquentiel par curiethérapie, avec une implantation interstitielle délivrée par une seule application en utilisant une source d'iridium (Ir-192) avec dosimétrie et implantation réalisée selon le système de Paris. L'objectif de la planification du traitement était de délivrer au moins 60-65 Gy à l'isodose de référence (85% du débit de dose minimal entre les plans) en tenant compte de la dose délivrée par radiothérapie externe, après conversion des doses en doses biologiques efficaces normalisées en équivalent de dose radiobiologique à 2 Gy par fraction ($\alpha/\beta = 10$ Gy). Les patients séropositifs ont été traités selon des modalités similaires, (88).

Les patients traités à l'hôpital Tenon ont reçu une radiothérapie externe pelvienne (49,5 Gy en 30 fractions de 1,65 Gy) dans un volume prophylactique comprenant les aires

ganglionnaires iliaques et ganglions inguinaux bilatéraux. Pour les tumeurs > T1, 30 fractions de 2 Gy par jour étaient prescrites au PTV de la tumeur anale primitive, tandis que les adénopathies inguinales ont reçu une dose de 54 Gy en 30 fractions (1,8 Gy par jour) par RCMI planifiée avec une technique de boost intégré simultané (« Simultaneous Integrated Boost », SIB).

Les patients traités à l'Institut Paoli Calmettes ont reçu une radiothérapie externe à la dose de 45 Gy en 25 fractions de 1,8 Gy dans un volume prophylactique et un complément séquentiel de 15 à 20 Gy a été délivrée au PTV comprenant la tumeur primitive anale et les ganglions macroscopiquement envahis. Les patients traités avant 2010 ont reçu une radiothérapie par technique de conformationnelle en 3D délivrée par un accélérateur linéaire de 6 MV avec une technique mono-isocentrique. Les patients traités après avril 2010 ont été traités par RCMI séquentielle. A la discrétion du médecin, les patients ont reçu un complément de dose par curiethérapie avec implantation interstitielle délivrée par une seule application en utilisant une source d'iridium (Ir-192) avec dosimétrie et implantation selon le système de Paris, visant à délivrer au moins 60 à 65Gy à l'isodose de référence, en tenant compte de la dose délivrée par radiothérapie externe.

3. Analyse de la numération formule sanguine

Les analyses sanguines prélevées avant toute chimiothérapie ont été utilisées pour la présente étude. Les patients avaient ensuite une numération formule sanguine (NFS) systématique une fois par semaine pendant la chimioradiothérapie. L'hyperleucocytose et la neutrophilie ont été établies à plus de 10 G/L et 7 G/L respectivement (seuils pathologiques de référence dans les différents laboratoires), tandis que l'anémie a été définie comme un chiffre d'hémoglobine inférieur à 12 g/dL. Ces trois paramètres ont été analysés pour établir une corrélation statistique avec la survie globale, la survie sans progression, la survie sans rechute locale et la survie sans rechute métastatique à distance.

4. Suivi et analyse statistique

La surveillance débutait à 6 semaines de la fin de la chimioradiothérapie, puis tous les 3 mois

pendant 2 ans, puis tous les 6 mois. Une échoendoscopie rectale était systématique à 1, 5 à 3 mois de la fin du traitement, puis tous les six mois. L'IRM et le TEP-scanner n'étaient pas faites de manière systématique. La chirurgie était réalisée en cas d'échec local isolé ou de troubles fonctionnels invalidants, après une réévaluation de la maladie par TEP-scanner. Les durées de survie ont été calculées à partir du diagnostic et les taux de survie ont été estimés à l'aide de la méthode de Kaplan Meier. Des analyses univariées ont été effectuées à l'aide du test du log-rank. Les analyses multivariées ont été effectuées pour les variables ayant une valeur p inférieure à 0,2 lors de l'analyse univariée, selon la méthode de Cox. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version 3.3.2).

V - Résultats : cohorte d'entraînement

1. Caractéristiques cliniques et biologiques: cohorte d'entraînement

Dans la cohorte d'entraînement, 103 patients séronégatifs pour le VIH atteints d'un carcinome épidermoïde du canal anal confirmé histologiquement et non métastatique ont été inclus. L'âge médian était de 61 ans (de 33 à 86 ans), et la grande majorité des patients inclus (90%) était des femmes. Cinquante-sept patients présentaient une maladie T3-T4 (55%) et 57 patients (55%) avaient des ganglions pelviens macroscopiquement envahis. Tous les patients présentaient un indice de performance de 0 ou 1 selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

La numération formule sanguine complète était disponible pour 97 patients ; les données manquantes correspondaient à des patients présentant une petite tumeur, sans envahissement ganglionnaire, qui n'ont pas reçu de chimiothérapie. La stadification des 6 patients sans numération disponible était T1 (2 patients, 40%) ou "petit T2" (3 patients, 60%) sans atteinte ganglionnaire au moment du diagnostic ; aucun d'entre eux n'a présenté de rechute dans le suivi ni n'est décédé après un suivi moyen de 42,9 mois.

Au moment du diagnostic, 57 patients (59%) présentaient une anémie. Une hyperleucocytose ou une neutrophilie ont été retrouvées chez 12 patients (12%) et 8 patients (8%), respectivement. L'hyperleucocytose était associée à une tumeur plus infiltrante au moment du diagnostic (T1 - T2 contre T3 - T4) ($p = 0,061$).

2. Traitement : cohorte d'entraînement

Tous les patients ont reçu une irradiation pelvienne étendue aux aires ganglionnaires bilatérales iliaques et inguinales, délivrée selon une technique conformationnelle 3D chez 48 patients (47%) et une technique RCMI chez 55 patients (53%). Il n'y avait pas d'impact significatif de la technique sur la survie globale ($p = 0,899$) ou sur la survie sans progression ($p = 0,523$). Quatre-vingts patients (78%) ont reçu une chimiothérapie concomitante, à base de 5FU & mitomycine C chez 61 patients (76%) et de 5FU & cisplatine chez 15 patients (19%).

Quatre patients ont reçu d'autres schémas de chimiothérapie concomitante : cisplatine & 5FU & cetuximab (n = 2), carboplatine (n = 1) ou capécitabine (n = 1).

La dose totale médiane reçue par la tumeur anale après complément de dose séquentiel était de 60 Gy (40 à 74 Gy), administrée par curiethérapie interstitielle chez 10 patients (10%) (6 patients atteints d'un stade T1, 60%). La dose médiane délivrée de manière séquentielle aux zones ganglionnaires envahies était de 15 Gy (9 à 20 Gy, 1,8 à 2 Gy par fraction). La durée médiane du traitement était de 47 jours (24 à 84 jours).

Les caractéristiques des patients, les résultats de la numération des cellules sanguines et les caractéristiques des traitements sont présentés dans le **TABLEAU 1A**. Nous avons analysé séparément 6 patients séropositifs et 7 patients atteints d'une maladie métastatique initiale et naïfs de traitement anticancéreux. Leur tumeur, leur numération des cellules sanguines et leurs caractéristiques thérapeutiques sont détaillées dans les **TABLEAUX 1B et 1C**.

TABLEAU 1A. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients inclus dans la cohorte d'entraînement.

Caractéristiques		Médiane (min-max) ou nombre (%) n=103
Age (années)		61 (33 - 86)
Femmes		93 (90%)
TNM (UICC 7th)		
T	T1	15 (14,5%)
	T2	31 (30%)
	T3	42 (41%)
	T4	15 (14,5%)
N	N0	46 (44,5%)
	N1	39 (38%)
	N2	13 (12,5%)
	N3	5 (5%)
Numération formule sanguine initiale		
Disponible	Oui	97 (94%)
	Non	6 (6%)
Hémoglobine (g/dl)		12,8 (8.9 – 16.1)
Plaquettes (G/L)		266 (73 – 499)
Leucocytes (G/L)		7,6 (3,1 – 17,6)
Neutrophiles (G/L)		4,6 (1,7 – 14,9)
Hyperleucocytose	Oui	12 (12%)
	Non	85 (88%)
Neutrophilie	Oui	8 (8%)
	Non	89 (92%)
Anémie	Oui	57 (59%)
	Non	40 (41%)
NLR > 4.5	Oui	21 (14%)
	Non	77 (86%)
Radiothérapie		
Dose à la tumeur (Gy)		60 (40 – 74)
Dose prophylactique (Gy)		45 (36 – 50)
Complément ganglionnaire		55 (53%)
Dose médiane du complément (Gy)		15 (9 – 20)
RCMI	Oui	55 (53%)
	Non	48 (47%)
Complément par curiethérapie	Oui	10 (10%)
	Non	93 (90%)
Etalement (jours)		47 (24 – 84)
Chimiothérapie concomitante	Oui	80 (78%)
	Non	23 (22%)
Type de chimiothérapie concomitante		
Mitomycine C + 5FU		29 (36%)
Mitomycine C + Capécitabine		32 (40%)
Cisplatine + 5FU		14 (18%)
Autres		5 (6%)

TABLEAU 1B. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients séropositifs inclus dans la cohorte d'entraînement.

Caractéristiques		Médiane (min-max) or nombre (%) n=6
Age (années)		58 (41 - 69)
Femmes		3 (50%)
TNM (UICC 6th)		
T	T1	0 (0%)
	T2	6 (100%)
	T3	0 (0%)
	T4	0 (0%)
N	N0	6 (100%)
	N1	0 (0%)
	N2	0 (0%)
	N3	0 (0%)
Numération formule sanguine initiale		
Disponibile		6 (100%)
Hémoglobine (g/dl)		12,8 (8.8 – 14.3)
Plaquettes (G/L)		311 (233 – 402)
Leucocytes (G/L)		8,3 (4,4 – 11,8)
Neutrophiles (G/L)		5,1 (2,5 – 6,6)
Hyperleucocytose		2 (33%)
Neutrophilie		0 (0%)
Anémie		3 (50%)
NLR > 4.5		2 (33%)
Radiothérapie		
Etalement (jours)		52 (41 – 70)
Dose à la tumeur (Gy)		64,5 (56 – 65)
Dose prophylactique (Gy)		44,5 (42 – 45)
Complément ganglionnaire		0 (0%)
RCMI		1 (17%)
Complément curiethérapie		1 (17%)
Chimiothérapie concomitante		4 (67%)
Mitomycine C + 5FU		1 (17%)
Mitomycine C + Capecitabine		1 (17%)
Cisplatine + 5FU		1 (17%)
Autre		1 (17%)

TABEAU 1C. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients métastatiques inclus dans la cohorte d'entraînement.

Caractéristiques		Médiane (min-max) or nombre (%) n=7
Age (années)		60 (45 - 77)
Femmes		7 (100%)
Séropositivité VIH		0 (0%)
TNM (UICC 6th)		
T	T1	0 (0%)
	T2	3 (43%)
	T3	1 (14%)
	T4	3 (43%)
N	N0	0 (0%)
	N1	1 (14%)
	N2	1 (14%)
	N3	5 (72%)
Numération formule sanguine initiale		
Disponible		7 (100%)
Hémoglobine (g/dl)		11.5 (10.8 – 13.5)
Plaquettes (G/L)		267 (146 – 430)
Leucocytes (G/L)		9,7 (6,3 – 15,3)
Neutrophiles (G/L)		7,6 (3,3 – 13,7)
Hyperleucocytose		3 (43%)
Neutrophilie		4 (57%)
Anémie		6 (86%)
NLR > 4.5		0 (0%)
Radiothérapie		
Etalement (jours)		44 (40 – 83)
Dose à la tumeur (Gy)		60 (59 – 61)
Dose prophylactique (Gy)		44 (44 – 45)
Complément ganglionnaire		5 (71%)
Dose au complément (Gy)		15 (14 – 15)
RCMI		55 (53%)
Complément par curiethérapie		0 (0%)
Chimiothérapie concomitante		7 (100%)
Mitomycine + 5FU		2 (29%)
Mitomycine + Capecitabine		4 (57%)
Cisplatine + 5FU		1 (14%)
Autre		0 (0%)

5FU : 5-Fluorouracile ; Anémie : hémoglobine < 12 g/dL ; Hyperleucocytose : leucocytes > 10 G/L ; Neutrophilie: neutrophiles > 7 GL/ ; NLR : Rapport neutrophiles / lymphocytes; RCMI : Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité

3. Suivi : cohorte d'entraînement

Avec un suivi médian de 38,7 mois (0,9 à 111,7 mois), 29 patients (28%) ont présenté une rechute, dont 24 rechutes locorégionales (23%) et 17 rechutes métastatiques à distance (17%). Une colostomie a été nécessaire chez 11 patients (11%).

Lors de la dernière consultation de suivi, 12 patients (12%) étaient décédés des suites d'une évolution tumorale.

Le taux de survie globale à 3 ans était de 88% (intervalle de confiance à 95% (IC95%) : 84 - 92%). Le taux de survie sans progression à 3 ans était de 67% (IC95% : 61 - 73%).

4. Valeur pronostique de l'hyperleucocytose et de la neutrophilie : cohorte d'entraînement

En analyse univariée, les facteurs significativement associés à une survie globale inférieure étaient l'hyperleucocytose ($p < 0,001$), la neutrophilie ($p < 0,001$), un étalement de la radiothérapie > 50 jours ($p = 0,032$), l'anémie ($p = 0,047$), le stade T3-4 ($p = 0,026$) et l'atteinte ganglionnaire ($p = 0,014$). Il n'y avait pas d'association entre le sexe masculin et la survie dans cette cohorte ($p = 0,682$).

La survie globale estimée à 2 ans était de 94% (IC95% : 91 - 97%) chez les patients ne présentant pas d'hyperleucocytose au diagnostic contre 43% (IC95% : 25 - 61%) chez ceux qui en présentait une. La survie globale à 2 ans était de 95% (IC95% : 92 - 98%) chez les patients ne présentant pas une neutrophilie contre 31% (IC95% : 13 - 49%) chez ceux en présentant une.

En analyse univariée, l'hyperleucocytose et la neutrophilie avant traitement étaient également associés à une survie sans progression inférieure ($p < 0,001$ et $p < 0,001$ respectivement). Le rapport neutrophile/ lymphocyte (NLR) $> 4,5$, l'anémie, la durée de traitement > 50 jours, le stade tumoral T ou N n'étaient pas significatifs ($p = 0,857$, $p = 0,053$, $p = 0,063$, $p = 0,132$ et $p = 0,149$ respectivement).

La survie sans progression à 2 ans était estimée à 93% (IC95% : 79 - 97%) chez les patients qui n'avaient pas d'hyperleucocytose contre 22% (IC95% : 8 - 36%) chez ceux qui en

présentaient une. En ce qui concerne la neutrophilie, la survie sans progression à 2 ans était de 8% (95%IC : 0 - 23%) contre 82% (95%CI : 78 - 86%) selon que les patients présentaient ou non une neutrophilie au diagnostic.

Les courbes de Kaplan Meier représentant la survie globale et la survie sans progression selon la présence ou non d'une hyperleucocytose sont détaillées dans les **FIGURES 2A et 2B**.

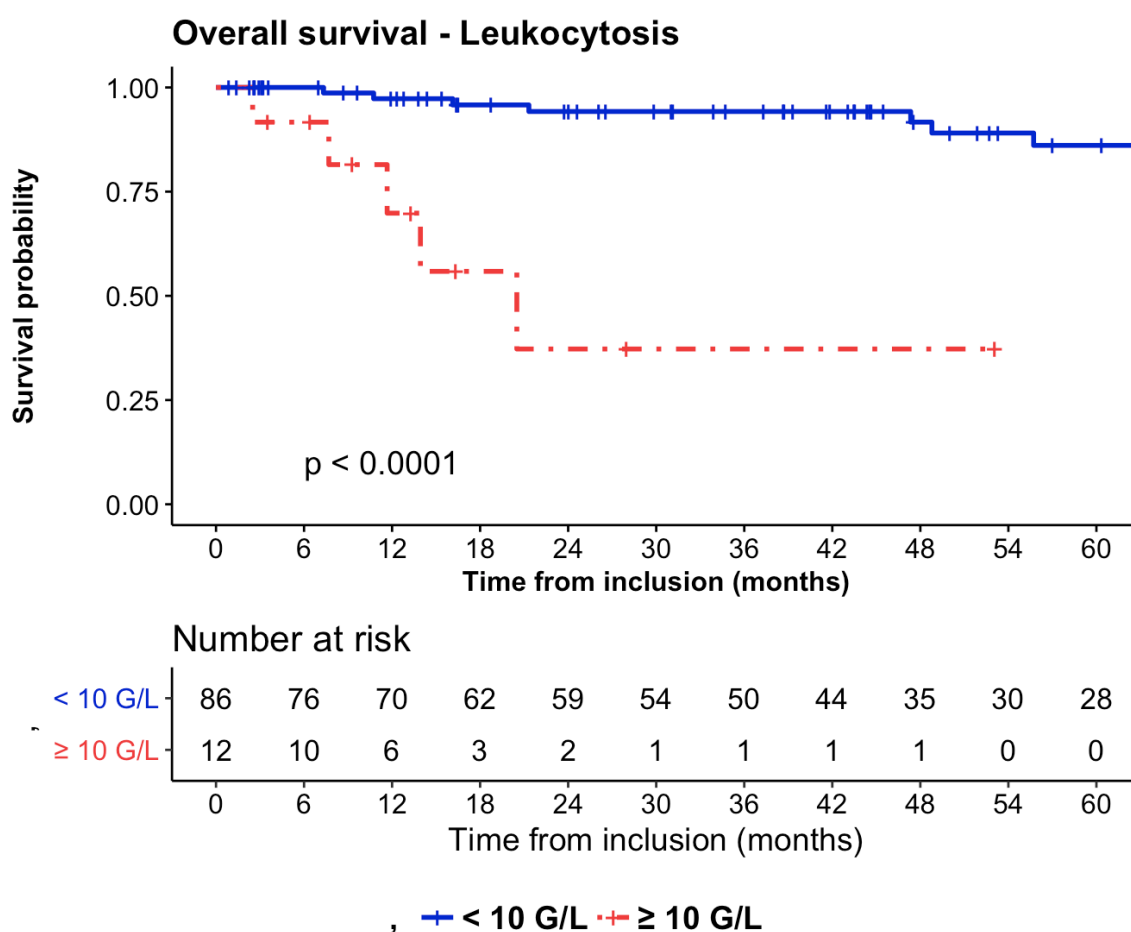


FIGURE 2A. Estimation de la survie globale chez les patients avec ou sans hyperleucocytose (cohorte d'entraînement).

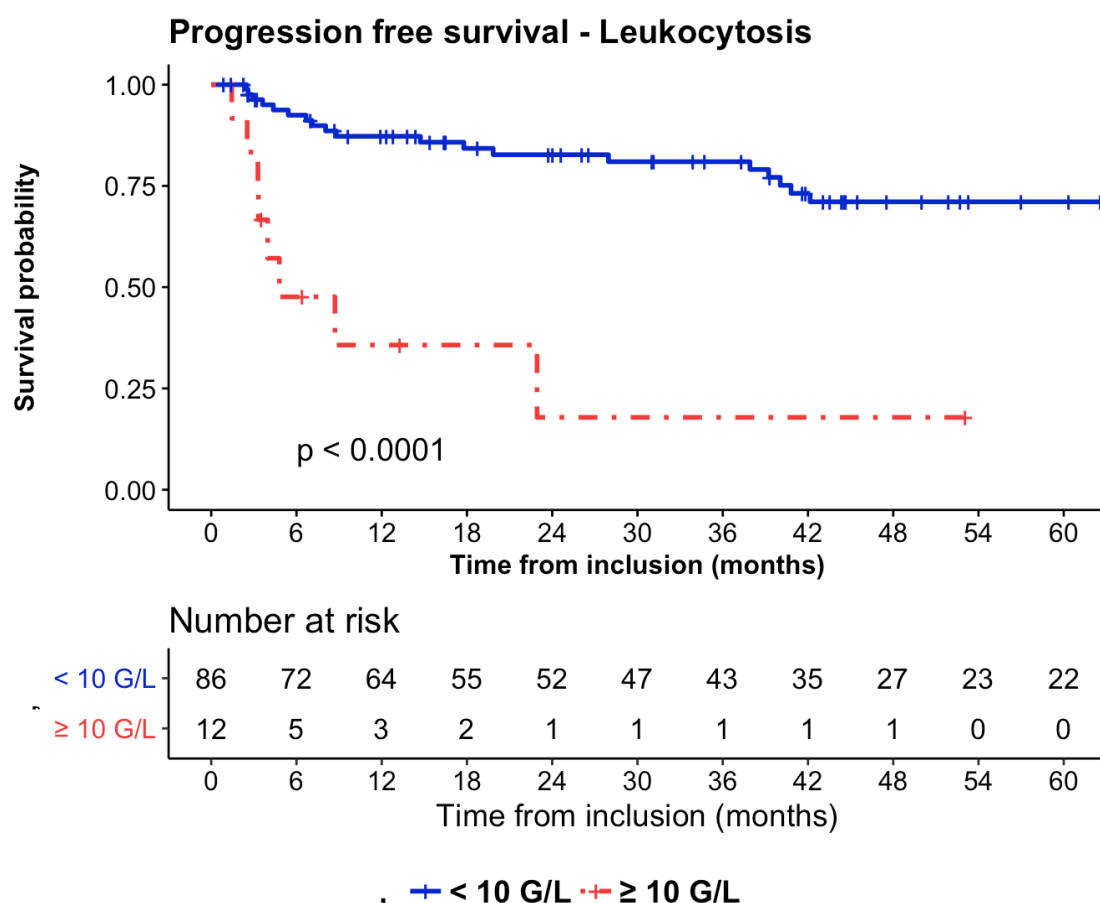


FIGURE 2B. Estimation de la survie sans progression chez les patients avec ou sans hyperleucocytose (cohorte d'entraînement).

L'hyperleucocytose et de la neutrophilie étaient également significativement associés à un risque accru de rechute locorégionale (respectivement $p = 0,002$ et $p < 0,001$) et métastatique ($p < 0,001$ et $p = 0,001$, respectivement).

L'anémie était associée à une moins bonne survie sans rechute métastatique ($p = 0,021$). En revanche, elle n'était pas pronostique la survie sans rechute locorégionale ($p = 0,165$). L'étalement > 50 jours ($p = 0,046$), le stade T3-4 ($p = 0,039$) et l'atteinte ganglionnaire ($p = 0,028$) étaient également associés à une survie sans rechute métastatique inférieure.

En analyse multivariée, en considérant l'hyperleucocytose et la neutrophilie dans 2 modèles multivariés distincts, l'hyperleucocytose et la neutrophilie étaient des facteurs indépendants associés à une survie globale et une survie sans progression inférieure ($p < 0,01$), avec un

rapport de risque (Hazard Ratio, HR) de 6,9 et 7,6. L'anémie était un facteur pronostique péjoratif indépendant de la survie globale ($p = 0,034$), de la survie sans progression ($p=0,022$) et de la survie sans rechute métastatique ($p=0,024$). Une durée de traitement > 50 jours était associée à une diminution de la survie sans progression ($p=0,029$).

Les résultats des analyses univariées et multivariées sont détaillés dans le **TABLEAU 2**. Les pourcentages de patients présentant une récurrence tumorale (locorégionale ou à distance) dans notre population selon les facteurs de risque initiaux ou associés au traitement sont présentés dans les **FIGURES 3A et 3B**.

TABLEAU 2. Résultats des analyses univariées et multivariées dans la cohorte d'entraînement (les facteurs significatifs sont en caractères gras).

Variable	Survie globale		Survie sans progression	
	Log-rank	Cox (HR)	Log-rank	Cox (HR)
Hyperleucocytose *	< 0.001	< 0.001 (19.9)	< 0.001	< 0.001 (6.9)
Neutrophilie *	< 0.001	< 0.001 (22.7)	< 0.001	< 0.001 (7.6)
Anémie	0.047	0.034 (5.4)	0.053	0.022 (2.5)
Stade T	0.026	0.542	0.132	--
Stade N	0.014	0.039 (5.8)	0.149	--
Etalement > 50 jours	0.032	0.106	0.063	0.029 (2.3)

Variable	Survie sans rechute locorégionale		Survie sans rechute à distance	
	Log-rank	Cox	Log-rank	Cox
Hyperleucocytose *	0.002	0.003	< 0.001	0.004
Neutrophilie *	< 0.001	< 0.001	0.001	0.012
Anémie	0.165	--	0.021	0.024
Stade T	0.145	--	0.039	0.753
Stade N	0.157	--	0.028	0.088
Etalement > 50 jours	0.208	--	0.046	0.077

L'hyperleucocytose et la neutrophilie ont été étudiés dans 2 modèles multivariés distincts, en raison de la forte corrélation entre ces 2 paramètres, les polynucléaires neutrophiles étant une composante majoritaire des leucocytes.

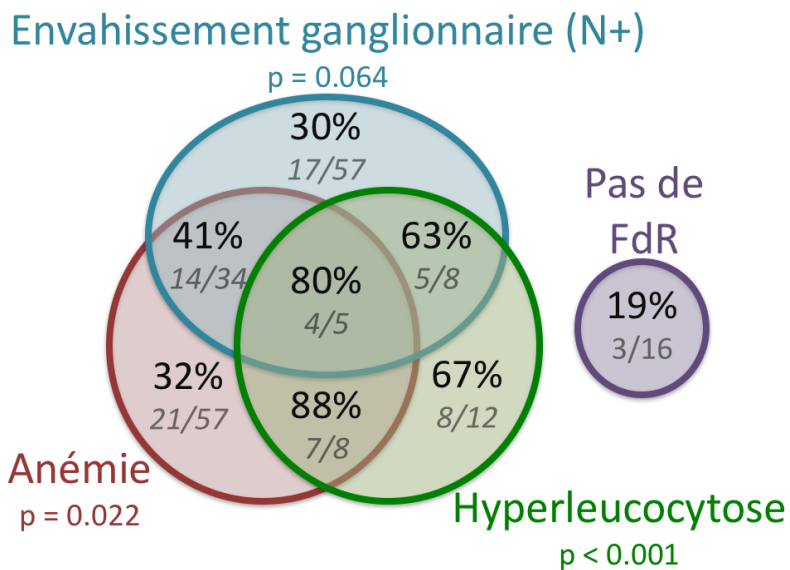


FIGURE 3A. Pourcentages de rechute locorégionale et à distance dans notre cohorte par rapport aux facteurs de risque initiaux (analyse multivariée).

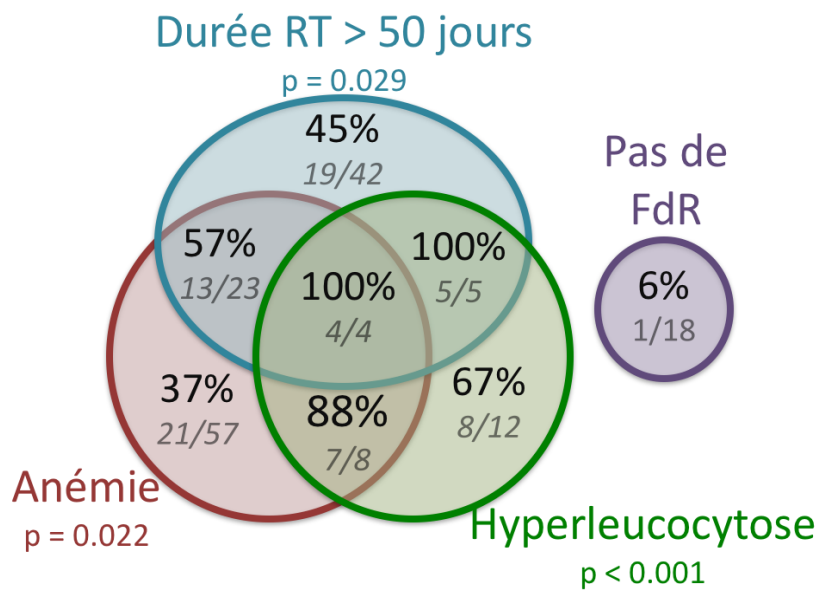


FIGURE 3B. Pourcentages de rechute locorégionale et à distance dans notre cohorte par rapport aux facteurs de risque initiaux (analyse multivariée).

RT : radiothérapie ; Anémie : hémoglobine < 12 g/dL ; Hyperleucocytose : leucocytes > 10 G/L

En gras : x% : x représente le pourcentage de patients en progression dans notre population ; x représente le pourcentage de patients en progression dans notre population ; x représente le pourcentage de patients.

Italique : n / N : n représentent les patients en progression / N représentent les patients présentant un facteur de risque ; N représentent les patients présentant un facteur de risque

Pas de FdR : facteurs de risque ; absence d'anémie ou d'hyperleucocytose au départ ou d'atteinte ganglionnaire

5. Patients séropositifs VIH et métastatiques au diagnostic : cohorte d'entraînement

Nous avons analysé séparément 6 patients séropositifs et 7 patients atteints d'une maladie métastatique initiale et naïfs de traitement anticancéreux. Leurs caractéristiques sont détaillées dans les **TABLEAUX 1B et 1C**.

Tous les patients séropositifs ont été diagnostiqués avec une tumeur T2 N0 M0. Après un suivi médian de 11 mois (3,6 - 80,3 mois), deux patients ont présenté une progression tumorale : un patient qui avait une hyperleucocytose (11 900 /mm³) a présenté une rechute locale ; un autre patient qui avait une anémie au diagnostic (8,6 g/dL) a développé une rechute métastatique à distance. Dans notre population métastatique, 6 patients (86%) avaient une anémie et 4 patients (57%) une hyperleucocytose et une neutrophilie au diagnostic.

VI - Résultats : cohorte de validation

1. Caractéristiques cliniques et biologique : cohorte de validation

De 2000 à 2015, 133 patients avec une numération formule sanguine disponible ont été inclus pour analyse : 68 traités à l'hôpital Tenon (Paris) et 65 à l'Institut Paoli Calmettes (Marseille). L'âge médian était de 62 ans (21 à 93 ans) et la majorité était des femmes (82%). La plupart des patients présentait une maladie T3-T4 (59%) et/ou des ganglions pelviens (52%) ; 30 patients (23%) présentaient un état général OMS 1.

Avant la première semaine de chimioradiothérapie, 47 patients (35%) présentaient une anémie, 10 patients (8%) une hyperleucocytose et 9 patients (7%) une neutrophilie. Les caractéristiques des patients sont présentées dans le **TABLEAU 3**.

TABLEAU 3. Caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients inclus dans la cohorte de validation.

Caractéristiques		Population totale	Leucocytes > 10 G/L		p
		n (%) or médiane [extrêmes]			
Nombre de patients		133	123	10	
Caractéristiques des patients					
Hôpital	Marseille (IPC)	65 (49%)	62 (50%)	3 (30%)	0,361
	Paris (Tenon)	68 (51%)	61 (49%)	7 (70%)	
Age (années)		62 [21, 93]	62 [21, 93]	67 [34, 79]	0,393
PS (OMS)	0	103 (78%)	98 (80%)	5 (50%)	0,050
	1	27 (20%)	22 (18%)	5 (50%)	
	2	3 (2%)	3 (2%)	0 (0%)	
Sexe	Femmes	109 (82%)	100 (81%)	9 (90%)	0,795
	Hommes	24 (18%)	23 (19%)	1 (10%)	
Tabagisme	Actif	94 (71%)	89 (72%)	5 (50%)	0,256
	Non actif	37 (28%)	32 (26%)	5 (50%)	
	NA	2 (1%)	2 (2%)	0 (0%)	
Statut VIH	négatif	133 (100%)	123 (100%)	10 (100%)	--
Stade T (TNM)	1	6 (4%)	6 (5%)	0 (0%)	0,610
	2	49 (37%)	46 (37%)	3 (30%)	
	3	56 (42%)	52 (42%)	4 (40%)	
	4	22 (17%)	19 (16%)	3 (30%)	
Taille tumorale		3.5 [0.7, 11]	3.5 [0.7, 11]	5 [2, 7]	0,066
Stade N (TNM)	0	64 (48%)	62 (51%)	2 (20%)	<0,001
	1	49 (37%)	47 (38%)	2 (20%)	
	2	15 (11%)	11 (9%)	4 (40%)	
	3	5 (4%)	3 (2%)	2 (20%)	
Biologie au diagnostic					
Anémie	Oui	47 (35%)	40 (32.5%)	7 (70%)	0,041
	Non	86 (65%)	83 (67.5%)	3 (30%)	
Thrombocytose	Oui	12 (9%)	113 (92%)	4 (40%)	0,002
	Non	119 (89%)	8 (6%)	6 (60%)	
	NA	2 (2%)	2 (2%)	0 (0%)	
Hyperleucocytose	Oui	10 (8%)	0 (0%)	10 (100%)	<0,001
	Non	123 (93%)	123 (100%)	0 (0%)	
Neutrophilie	Oui	9 (7%)	2 (2%)	7 (70%)	<0,001
	Non	124 (93%)	121 (98%)	3 (30%)	
Lymphopénie	Oui	99 (74%)	93 (76%)	6 (60%)	0,531
	Non	7 (5%)	6 (5%)	1 (10%)	
	NA	27 (20%)	24 (20%)	3 (30%)	
Monocytose	Oui	3 (2%)	2 (2%)	1 (10%)	0,263
	Non	99 (74%)	94 (76%)	5 (50%)	
	NA	31 (23%)	27 (22%)	4 (40%)	
NLR ≥ 4	Oui	16 (12.%)	14 (11%)	2 (20%)	0,456
	Non	90 (68%)	85 (69%)	5 (50%)	
	NA	27 (20%)	24 (20%)	3 (30%)	

Anémie : < 12 g/dL ; Hyperleucocytose : > 10 G/L ; Lymphopénie : < 1 G/L ; Monocytose : > 1 G/L ; Neutrophilie : > 7 G/L ; NLR : Ratio des lymphocytes neutrophiles ; PS : Indice de performance de l'OMS; NA?.

2. Traitement : cohorte de validation

Tous les patients ont reçu une irradiation pelvienne, délivrée avec une technique conformationnelle en 3D chez 30 patients (23%) et RCMI chez 103 patients (77%), dont 69 (52%) avec technique SIB. Il n'y avait pas d'impact significatif de la technique sur la survie globale ($p = 0,720$ et $p = 0,613$, respectivement) ou la survie sans rechute ($p = 0,071$ et $p = 0,285$, respectivement).

La dose médiane administrée à la tumeur était de 60 Gy (44 à 70 Gy), administrée par curiethérapie interstitielle chez 17 patients (13%), atteints de tumeurs T1 ($n=1$), T2 ($n=5$) ou T3 ($n=11$). L'étalement médian était de 45 jours (29 à 114 jours). Il n'était pas corrélé à l'hyperleucocytose ($p = 0,914$).

Concernant la chimiothérapie, 122 patients (92%) ont reçu une chimiothérapie concomitante à base de 5FU, associée à de la mitomycine C chez 86 patients (65%) ou du cisplatine chez 35 patients (26%). Un patient (1%) a reçu du 5FU seul, tandis que 11 patients (8%) n'avaient pas de chimiothérapie concomitante (3, 5, et 3 patients atteints d'une tumeur T1, T2 ou T3 au moment du diagnostic, respectivement). Les taux de leucocytes et neutrophiles initiaux étaient comparables selon la chimiothérapie reçue et le stade T ($p = 0,159$ et $p = 0,121$ respectivement).

3. Suivi : cohorte de validation

Avec un suivi médian de 37,4 mois (2,2 à 155,8 mois), des rechutes ont été rapportées chez 34 patients (26%) et une colostomie a été réalisée chez 11 patients (11%). Des rechutes locorégionales sont survenues chez 26 patients (20%), et métastatiques à distance pour 26 patients (20%).

Aux dernières nouvelles, 18 patients (14%) étaient décédés, dont 16 (12%) de progression tumorale. Le taux de survie à 3 ans était estimé à 88 % (IC95% : 83 - 95%), le taux de survie sans progression à 3 ans était de 77% (IC95% : 69 - 84%) et le taux de survie sans colostomie à 3 ans était de 86% (IC95% : 80 - 92%).

4. Valeur pronostique de l'hyperleucocytose et de la neutrophilie : cohorte de validation

En analyse univariée, les facteurs significatifs associés une survie globale inférieure étaient l'hyperleucocytose ($p = 0,001$), la neutrophilie ($p = 0,001$), le performance status > 0 ($p = 0,001$), le statut N positif ($p = 0,039$) et le sexe masculin ($p = 0,010$).

Le stade tumoral primitif ($p = 0,763$), l'anémie ($p = 0,452$), la thrombocytose ($p = 0,348$), la monocytose ($p=0,188$), la lymphopénie ($p = 0,423$), le NLR ($p = 0,303$) et la durée du traitement supérieure à 50 jours ($p = 0,718$) n'influaient pas significativement pas la survie globale.

La survie globale à 3 ans était estimée à 90% (IC 95% : 82 – 97%) chez les patients ne présentant pas d'hyperleucocytose initiale contre 70% (IC 95%: 56 – 84%) chez les patients atteints d'hyperleucocytose initiale et à 90% (IC 95% : 82 – 97%) pour ceux qui ne présentaient pas de neutrophilie contre 50% (IC 95% : 36 – 64%) chez les patients présentant une neutrophilie (**FIGURE 4A**).

En stratifiant par lieu de prise en charge (Tenon vs. Institut Paoli Calmettes), l'hyperleucocytose ($p = 0,002$) et la neutrophilie ($p = 0,001$) restaient associées à une diminution de la survie globale.

En analyse univariée, l'hyperleucocytose et la neutrophilie au diagnostic étaient également des facteurs pronostiques significatifs de survie sans progression ($p = 0,002$ et $p = 0,009$, respectivement). La survie sans progression estimée à 3 ans était de 79% (IC95% : 72 - 87%) chez les patients ne présentant pas de neutrophilie initiale contre 48% (IC95% : 25 - 94%) chez les patients présentant une neutrophilie (**FIGURE 4B**).

En stratifiant par hôpital de prise en charge, l'hyperleucocytose ($p = 0,01$) et la neutrophilie ($p = 0,01$) restaient associées à une diminution de la survie sans progression.

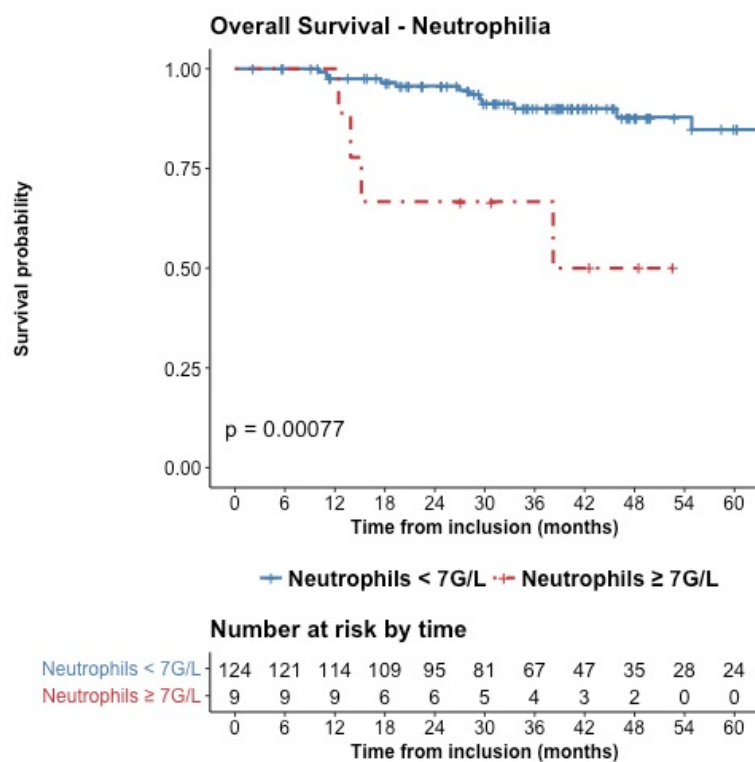


FIGURE 4A. Estimation de la survie globale chez les patients avec ou sans neutrophilie (cohorte de validation).

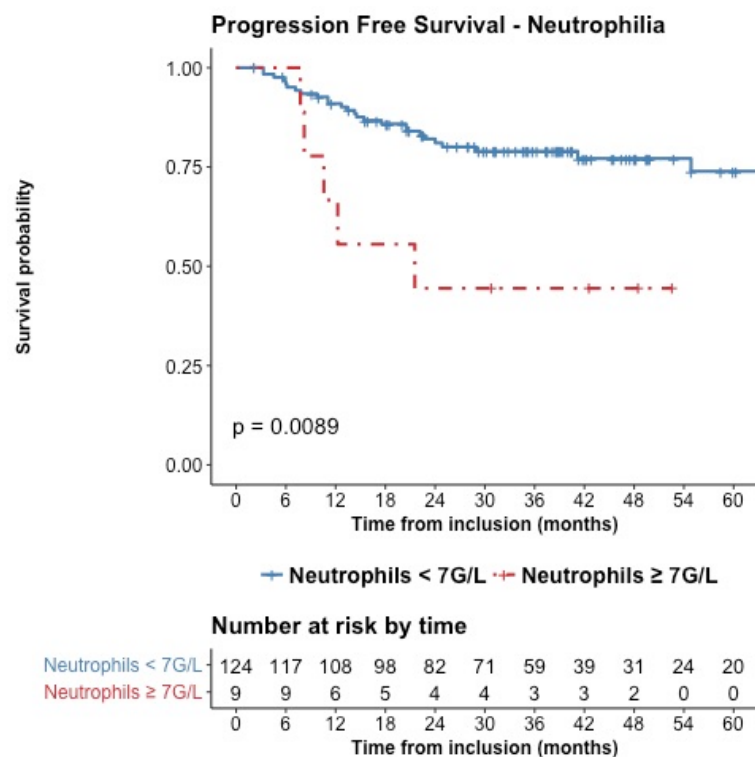


FIGURE 4B. Estimation de la survie sans progression chez les patients avec ou sans neutrophilie (cohorte de validation).

L'hyperleucocytose et la neutrophilie ont également été associées à une augmentation du risque de rechute locorégionale ($p = 0,046$ et $p = 0,025$, respectivement) et métastatique ($p = 0,004$ et $p = 0,021$, respectivement).

En analyse multivariée, l'hyperleucocytose et la neutrophilie étaient des facteurs indépendants associés à une survie globale diminuée (HR = 4,6 et 4,4 respectivement). L'hyperleucocytose et la neutrophilie étaient également indépendamment associées à une survie sans progression inférieure (HR = 7,1 et 5,0 respectivement).

Ces deux facteurs étaient également indépendamment associés à une diminution du contrôle locorégional et à distance ($p = 0,017$ et $p = 0,004$ respectivement). L'anémie était corrélée indépendamment à une diminution de la survie sans progression et du contrôle locorégional (HR 5,3 et 4,1, respectivement) (**TABLEAU 4**).

La survie sans colostomie à 3 ans était estimée à 86% (IC95% : 80 - 92%) dans l'ensemble de la population. Elle était de 89% (IC95% : 83 - 95%) contre 50% (CI95% : 27% - 93%) chez les patients sans ou avec une hyperleucocytose initiale, respectivement, et de 89% (IC95% : 83 - 96%) contre 44% (CI 95% : 21 - 92%) chez les patients sans ou avec neutrophilie au diagnostic, respectivement.

TABEAU 4. Résultats d'analyses univariées et multivariées (Cox) pour la cohorte de validation (facteurs significatifs en gras).

Variable	Survie globale				Survie sans progression				Contrôle locorégional				Contrôle métastatique			
	Univarié (log-rank)	Multivarié (Cox)			Univarié (log-rank)	Multivarié (Cox)			Univarié (log-rank)	Multivarié (Cox)			Univarié (log-rank)	Multivarié (Cox)		
	p	HR	95%CI	p	p	HR	95%CI	p	p	HR	95%CI	p	p	HR	95%CI	p
Hyperleucocytose * (absence)	0,001	4,6	1,4 - 14,9	0,012	0,002	7,1	2,5 - 20,2	0,001	0,046	4,5	1,3 - 15,6	0,017	< 0,001	4,0	1,6 - 10,3	0,004
Neutrophilie * (absence)	0,001	4,4	1,3 - 14,8	0,017	0,009	5,0	1,7 - 14,5	0,003	0,025	3,6	1,2 - 11,6	0,027	0,002	3,3	1,2 - 9,1	0,021
Anémie (absence)	0,452	--	--	--	0,052	5,3	1,9 - 14,7	0,001	0,149	4,1	1,3 - 12,4	0,013	0,315	--	--	--
Hommes (Femmes)	0,010	4,8	1,6 - 14,5	0,005	0,067	3,6	1,5 - 8,6	0,004	0,119	3,4	1,3 - 9,4	0,15	0,299	--	--	--
PS 1-2 (PS 0)	0,001	--	--	0,073	0,07	4,9	2,1 - 11,5	0,001	0,003	5,5	2,2 - 14,0	0,001	0,025	--	--	0,054
T3-4 (T1-2)	0,763	--	--	--	0,557	--	--	--	0,243	--	--	--	0,276	--	--	--
N positif (N0)	0,039	--	--	0,367	0,210	--	--	--	0,292	--	--	--	0,285	--	--	--
Lymphopénie (vs. absence)	0,423	--	--	--	0,527	--	--	--	0,386	--	--	--	0,423	--	--	--
Monocytose (vs. absence)	0,188	--	--	--	0,608	--	--	--	0,493	--	--	--	0,547	--	--	--
Thrombocytose (vs. absence)	0,348	--	--	--	0,270	--	--	--	0,304	--	--	--	0,705	--	--	--

* L'hyperleucocytose et la neutrophilie ont été analysées dans différents modèles multivariés.

VII - Discussion

Cette étude suggère qu'il existe une relation pronostique entre l'hyperleucocytose et la neutrophilie au diagnostic et une diminution de la survie globale et sans rechute chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde du canal anal traités par chimioradiothérapie. Elle valide rétrospectivement cette relation dans une cohorte bicentrique indépendante.

L'inflammation a été associée à des lésions précancéreuses dans plusieurs organes comme la sphère ORL, les poumons, le canal anal et le col de l'utérus. L'hyperleucocytose et la neutrophilie sont également associées à un mauvais pronostic dans divers types de cancer, comme récemment démontré dans une population importante de plus de 2 000 patients atteintes de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, ainsi que dans d'autres cohortes de patients atteints de carcinomes épidermoïdes du canal anal ou du col de l'utérus (67,89–91). L'impact de ces anomalies biologiques sur le pronostic des patients varie selon les études (20,68,89,92). De nombreux biais existent dans ces études, inhérents à leur nature rétrospective, aux divers seuils utilisés pour définir l'inflammation en fonction de ces biomarqueurs, ainsi qu'aux différences dans la prise en charge des patients d'un établissement à l'autre. Cependant, bon nombre d'études présentent cette conclusion : une inflammation biologique accrue au diagnostic d'un cancer réduit la survie globale des patients (68,89,92). Nos résultats sont ainsi cohérents avec ceux d'études antérieures.

A ce jour, une seule publication a analysé la valeur pronostique de l'hyperleucocytose chez les patients traités par chimioradiothérapie exclusive pour carcinome épidermoïde du canal anal (89). Le taux rapporté d'hyperleucocytose était de 16% au diagnostic, significativement associé avec une survie globale diminuée (89). Le statut sérologique pour le VIH n'était pas évalué dans cette étude. Nous avons trouvé des taux comparables de hyperleucocytose initiale de 12% (89). Parmi les 12 patients de la cohorte d'entraînement atteints d'hyperleucocytose, toutes présentaient une neutrophilie. En cela, l'hyperleucocytose était

possiblement associée à une différenciation neutrophilique des cellules progénitrices hématopoïétiques, comme décrit dans des séries précédentes de patientes traitées pour un cancer du col de l'utérus (67,91).

L'anémie au diagnostic a déjà été décrite comme un facteur pronostique négatif chez les patients traités pour un carcinomes épidermoïde du canal anal (92,93). Deux mécanismes peuvent expliquer l'anémie chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes du canal anal : le saignement anal externe et l'inflammation systémique (92,93). Dans cette dernière hypothèse, la validation de l'anémie comme prédicteur d'un mauvais pronostic sous-tend également la validation d'un impact négatif sur le pronostic de l'inflammation systémique associée à une tumeur, par analogie avec d'autres histologies, le cancer du rein par exemple. Dans nos cohortes d'entraînement et de validation, l'anémie était indépendamment associée à une plus faible survie sans progression. L'anémie était cependant relativement fréquente dans nos deux cohortes (35 et 59%), ce qui réduit son impact en tant que biomarqueur pronostique indépendant, mis à part en cas d'association avec l'hyperleucocytose (**FIGURES 3**).

Le rapport neutrophile/ lymphocyte (NLR) avant traitement a été rapporté comme facteur pronostique, mais le statut sérologique pour le VIH était inconnu (94,95). Le rapport plaquettes/ lymphocyte également a été proposé comme biomarqueur pronostic (96). Décrit dans de nombreux modèles histologiques de cancer, le NLR illustre cependant 3 désordres immunitaires différents: (i) augmentation isolée du nombre de neutrophiles, (ii) diminution du nombre de lymphocytes, (iii) association des deux (63). Le NLR a été décrit comme facteur pronostique indépendant dans de nombreux types de cancer (97). Son application reste cependant controversée. L'hyperleucocytose et la neutrophilie pourraient être le reflet de conditions inflammatoires systémiques défavorables dans les carcinomes épidermoïdes du canal anal, avec plus de puissance que le NLR (92,95). Dans la cohorte d'entraînement, le nombre moyen de lymphocytes était comparable chez les patients qui ont rechuté ou qui sont décédés à la suite d'une évolution tumorale ($p = 0,216$). De façon constante dans notre

cohorte d'entraînement et dans notre cohorte de validation, le NLR n'était pas un facteur pronostique. De plus en plus d'études démontrent que des taux élevés de lymphocytes infiltrant les tumeurs, notamment les lymphocytes cytotoxiques CD8 (+), peuvent avoir un impact positif sur la réponse à la chimioradiothérapie dans le cancer du canal anal (48,98). Trop peu d'études ont analysé à la fois les phénotypes des globules blancs circulants et ceux tumoraux infiltrants simultanément. Les neutrophiles du microenvironnement associés à la tumeur (TANs) semblent être différents des neutrophiles circulants, de même que les lymphocytes infiltrés par les tumeurs (TILs) diffèrent des lymphocytes circulants, ce qui peut expliquer ces controverses (50,99). Dans une étude chez des patients atteints de tumeurs pancréatiques, les TILs et les lymphocytes en circulants ne présentaient pas de chevauchements dans leur répertoire immunitaire (100). Illustrant les rôles controversés des TANs, distincts de ceux des neutrophiles circulants, une étude préclinique a mis en évidence une régression tumorale plus élevée après l'association du G-CSF et de la radiothérapie, suggérant que les TANs peuvent augmenter la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène après la radiothérapie, conduisant à une efficacité thérapeutique accrue grâce à une meilleure présentation des antigènes tumoraux et à une augmentation des lymphocytes cytotoxiques CD8 (+) infiltrant (58).

Les lignées cellulaires HPV-positives sont plus efficaces que les lignées cellulaires HPV-négatives dans le recrutement de leucocytes dans le microenvironnement tumoral (101). Dans les lignées HPV-positives, une prolifération accrue des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et la rate était associée à un effet immunosuppresseur de la réponse des lymphocytes T antitumoraux, et à un effet proangiogénique, conduisant à une résistance aux traitements (101). Ces résultats pourraient indiquer que les lignées cellulaires tumorales liées au HPV présentent une interaction importante avec les cellules de l'inflammation, au sein du microenvironnement tumoral (101).

Nous avons également observé dans la cohorte d'entraînement un phénotype hématologique majoritaire au diagnostic chez les patients qui présentaient ensuite une récurrence tumorale : une monocytose (> 1 G/L), une thrombocytose (> 400 G/L) et une anémie

(< 12 G/L). Les taux élevés d'hyperleucocytose et de neutrophilie (57%) dans notre population métastatique plaident également en faveur du caractère pronostique de l'hyperleucocytose et de la neutrophilie. Les patients présentant un syndrome inflammatoire biologique au diagnostic ont-ils besoin d'une intensification du traitement ? L'immunomonitoring prospectif des neutrophiles dans le sang et les tissus tumoraux dans des essais cliniques prospectifs chez des patients atteints de carcinomes épidermoïdes du anal semble essentiel (102).

L'immunothérapie étant en plein développement dans le traitement du cancer, il est nécessaire de mieux comprendre le rôle fonctionnel des neutrophiles au sein du microenvironnement tumoral (27). Ces résultats pourraient être pertinents pour développer de nouveaux biomarqueurs. Nos données suggèrent qu'en plus de la stadification TNM, l'hyperleucocytose et la neutrophilie pourraient aider à individualiser le risque de rechute chez les patients traités pour un carcinome épidermoïde du canal anal. Dans cette approche, l'exploration de divers biomarqueurs inflammatoires pourrait aider à déterminer le pronostic des patients et à décider quels patients peuvent bénéficier de traitements intensifs (103). D'autres recherches translationnelles sont nécessaires pour mieux définir le potentiel thérapeutique de cytokines et chemokines ainsi que de nouveaux agents ciblant le stroma immunitaire de la tumeur, en association avec la radiothérapie.

L'exclusion des patients séropositifs, métastatiques ou ayant déjà reçu une chimiothérapie était nécessaire dans notre analyse statistique principale, en raison d'un biais potentiel dans le nombre de leucocytes circulants. Cependant, les effets de la chimioradiothérapie sont similaire en termes de toxicité et de taux de contrôle dans la population séropositive pour le VIH (88). L'étude de l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) n'incluait que les patients atteints d'une maladie localement avancée et excluait les patients atteints d'une maladie à T1-T2 et N0 (12). Nous n'avons pas exclu les patients atteints de tumeurs T1N0. Aucun des 12 patients dans la cohorte d'entraînement ne présentait d'hyperleucocytose ou une neutrophilie au diagnostic, et aucun d'entre eux n'a présenté de récurrence tumorale. L'utilisation de la radiothérapie seule est établie dans cette

population, alors que la chimiothérapie utilisant la mitomycine et le 5FU a démontré un bénéfice que pour les patients atteints d'un carcinome épidermoïde du canal anal localement avancés (87,104).

La force de cette étude réside en l'association solide entre l'hyperleucocytose et un mauvais pronostic dans une cohorte de validation externe bi-centrique, en cohérence avec les études publiées antérieurement et les résultats de la cohorte d'entraînement. Cette étude retrouve une forte association statistique entre l'hyperleucocytose, la neutrophilie, ainsi que l'anémie, et le pronostic plus défavorable dans différentes cohortes homogènes de patients atteints d'un carcinome épidermoïde du canal anal. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'études publiées antérieurement sur le cancer du col de l'utérus, deux maladies associées au virus HPV (67).

Les principales limites de cette étude sont le rétrospectif et le faible nombre de patients. L'absence d'évaluation de la dose reçue par la moelle osseuse pelvienne et l'hétérogénéité de planification des traitements (53% RCMI et 47% 3D dans la cohorte d'entraînement) est également une limite. Le taux élevé de patients traités sans chimiothérapie concomitante (22% dans la cohorte d'entraînement) et l'hétérogénéité relative des schémas de chimiothérapie utilisés (76% par rapport à la mitomycine C avec antimétabolite dans la cohorte d'entraînement) sont d'autres limites. De plus, les taux de réponse initiaux n'ont pas pu être analysés, ce qui nous empêche d'étudier l'association entre inflammation et réponse précoce à la radiothérapie.

VIII - Conclusion

Dans un premier temps, une revue générale de la littérature a permis de faire un point sur les connaissances actuelles concernant l'interaction entre les neutrophiles et la radiothérapie. Le rôle des facteurs dérivés des tumeurs sur la chimiotaxie et la polarisation des neutrophiles, ainsi que les voies qui régulent leur action pro- ou antitumorale sont partiellement définis. Peu d'études se sont concentrées sur les interactions entre les neutrophiles et la radiothérapie.

Dans un second temps, ce travail a permis de valider l'hyperleucocytose et la neutrophilie comme biomarqueurs pronostiques, cliniquement pertinents et peu coûteux, chez les patients séronégatifs pour le VIH, avec une maladie non métastatique, traités par chimioradiothérapie à visée curative pour un carcinome épidermoïde du canal anal.

Chez les patients en cours de traitement par radiothérapie, il existe de nombreuses associations pronostiques avec la neutrophilie, et ce dans de multiples histologies. Pour inscrire la neutrophilie comme un biomarqueur personnalisé, une évaluation prospective et des mesures longitudinales en cours de traitement seront nécessaires. En outre, la neutrophilie n'a pas été clairement rapportée à ce jour comme un marqueur prédictif de l'effet du traitement avec un impact sur la survie globale. Une autre question est de savoir si l'évaluation parallèle des taux sériques des médiateurs solubles activant et polarisant les neutrophiles (IL-1 α , IL-17, G-CSF, GM-CSF et/ou TGF β) augmente l'impact pronostique ou prédictif du taux de neutrophiles.

Enfin, les thérapies ciblées sur les neutrophiles représentent une voie thérapeutique prometteuse, avec de multiples pistes à explorer. La caractérisation de l'infiltration et de la polarisation des TANs dans divers organes, histologies, stades tumoraux et stades de l'inflammation sont nécessaires pour appréhender pleinement leur potentiel en tant que

cibles thérapeutiques. Cependant, cibler une défense innée contre l'infection avec des événements indésirables acceptables sera un défi de taille. Les développements en rapport avec la radiothérapie sont limités, mais les premiers résultats sont encourageants. Comme il en est pour le développement d'utilisations concomitantes des "checkpoint inhibiteurs" (anti-CTLA-4, anti-PD1), le schéma optimal de radiothérapie (fractionnement, dose et calendrier) devra être défini.

IX - Références

1. Bethesda, MD,. SEER Cancer Statistics Factsheets: Anal Cancer. National Cancer Institute [Internet]. 2014; Disponible sur: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/anus.html>
2. Palefsky JM, Giuliano AR, Goldstone S, Moreira ED, Aranda C, Jessen H, et al. HPV Vaccine against Anal HPV Infection and Anal Intraepithelial Neoplasia. *N Engl J Med*. 27 oct 2011;365(17):1576-85.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. févr 2016;66(1):7-30.
4. Antwi S, Everson TM. Prognostic impact of definitive local therapy of the primary tumor in men with metastatic prostate cancer at diagnosis: A population-based, propensity score analysis. *Cancer Epidemiol*. août 2014;38(4):435-41.
5. Glynne-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, Goh V, Peiffert D, Cervantes A, et al. Anal cancer: ESMO–ESSO–ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol*. juin 2014;111(3):330-9.
6. Peiffert D, Créhange G, Vendrely V, Baumann A-S, Faivre J-C, Huger S. Radiothérapie des cancers du canal anal. *Cancer/Radiothérapie*. sept 2016;20:S183-8.
7. Kochhar R, Plumb AA, Carrington BM, Saunders M. Imaging of Anal Carcinoma. *Am J Roentgenol*. sept 2012;199(3):W335-44.
8. De la Rochefordière A, Labib A, Dauphinot C, Chira C, Campitelli M, Servois V. Radiothérapie des cancers du canal anal. *Cancéro Dig [Internet]*. 2011 [cité 22 janv 2018];(4). Disponible sur: <http://hdl.handle.net/2042/45855>
9. Epidermoid anal cancer: results from the UKCCCR randomised trial of radiotherapy alone versus radiotherapy, 5-fluorouracil, and mitomycin. UKCCCR Anal Cancer Trial Working Party. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research. *Lancet Lond Engl*. 19 oct 1996;348(9034):1049-54.
10. Moureau-Zabotto L, Vendrely V, Abramowitz L, Borg C, Francois E, Goere D, et al. Anal cancer: French Intergroup Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, SNFCP). *Dig Liver Dis*. août 2017;49(8):831-40.

11. Deniaud-Alexandre E, Touboul E, Tiret E, Sezeur A, Houry S, Gallot D, et al. Results of definitive irradiation in a series of 305 epidermoid carcinomas of the anal canal. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 août 2003;56(5):1259-73.
12. Bartelink H, Roelofsen F, Eschwege F, Rougier P, Bosset JF, Gonzalez DG, et al. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mai 1997;15(5):2040-9.
13. Gunderson LL, Winter KA, Ajani JA, Pedersen JE, Moughan J, Benson AB, et al. Long-Term Update of US GI Intergroup RTOG 98-11 Phase III Trial for Anal Carcinoma: Survival, Relapse, and Colostomy Failure With Concurrent Chemoradiation Involving Fluorouracil/Mitomycin Versus Fluorouracil/Cisplatin. *J Clin Oncol*. 10 déc 2012;30(35):4344-51.
14. Myerson RJ, Garofalo MC, El Naqa I, Abrams RA, Apte A, Bosch WR, et al. Elective clinical target volumes for conformal therapy in anorectal cancer: a radiation therapy oncology group consensus panel contouring atlas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juill 2009;74(3):824-30.
15. Peiffert D. Recommandations pour la prise en charge des cancers du canal anal. *Cancer/Radiothérapie*. oct 2015;19(6-7):416-20.
16. Flam M, John M, Pajak TF, Petrelli N, Myerson R, Doggett S, et al. Role of mitomycin in combination with fluorouracil and radiotherapy, and of salvage chemoradiation in the definitive nonsurgical treatment of epidermoid carcinoma of the anal canal: results of a phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. sept 1996;14(9):2527-39.
17. Colón-López V, Shiels MS, Machin M, Ortiz AP, Strickler H, Castle PE, et al. Anal Cancer Risk Among People With HIV Infection in the United States. *J Clin Oncol*. janv 2018;36(1):68-75.
18. Martin D, Balermipas P, Fokas E, Rödel C, Yildirim M. Are there HIV-specific Differences for Anal Cancer Patients Treated with Standard Chemoradiotherapy in the Era of Combined Antiretroviral Therapy? *Clin Oncol*. avr 2017;29(4):248-55.
19. Ajani JA, Winter KA, Gunderson LL, Pedersen J, Benson AB, Thomas CR, et al.

Prognostic factors derived from a prospective database dictate clinical biology of anal cancer: the intergroup trial (RTOG 98-11). *Cancer*. 1 sept 2010;116(17):4007-13.

20. Roldán GB, Chan AKP, Buckner M, Magliocco AM, Doll CM. The prognostic value of hemoglobin in patients with anal cancer treated with chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*. août 2010;53(8):1127-34.

21. Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet Lond Engl*. 1 mars 2008;371(9614):771-83.

22. Nicolás-Ávila JÁ, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity*. janv 2017;46(1):15-28.

23. Todoric J, Antonucci L, Karin M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 1 déc 2016;9(12):895-905.

24. Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*. janv 2011;377(9759):31-41.

25. Schetter AJ, Heegaard NHH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 1 janv 2010;31(1):37-49.

26. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 6 oct 2008;27(45):5904-12.

27. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. janv 2016;37(1):41-52.

28. Ehrlich P. Ueber Die Specifischen Granulationen des Blutes. *Archiv fuer Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung*: 571-579 [Internet]. 1879; Disponible sur: <http://www.pei.de/EN/institute/paul-ehrlich/publications/publications-of-paul-ehrlich-node.html>

29. Zilio S, Serafini P. Neutrophils and Granulocytic MDSC: The Janus God of Cancer Immunotherapy. *Vaccines*. 9 sept 2016;4(3):31.

30. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*. 10 juin 2016;16(7):431-46.

31. Gao C, Kozłowska A, Nechaev S, Li H, Zhang Q, Hossain DMS, et al. TLR9 Signaling in the Tumor Microenvironment Initiates Cancer Recurrence after Radiotherapy.

Cancer Res. 15 déc 2013;73(24):7211-21.

32. Ahn G-O, Tseng D, Liao C-H, Dorie MJ, Czechowicz A, Brown JM. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci.* 4 mai 2010;107(18):8363-8.

33. Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, Dawson MR, Jain RK, Duda DG. Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. *Cancer Res.* 15 juill 2010;70(14):5679-85.

34. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* avr 2008;8(4):279-89.

35. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 15 nov 2012;12(12):860-75.

36. Kozin SV, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Neovascularization After Irradiation: What is the Source of Newly Formed Vessels in Recurring Tumors? *JNCI J Natl Cancer Inst.* 20 juin 2012;104(12):899-905.

37. Liang W, Ferrara N. The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Immunol Res.* févr 2016;4(2):83-91.

38. Jiang D, Lim SY. Influence of Immune Myeloid Cells on the Extracellular Matrix During Cancer Metastasis. *Cancer Microenviron.* avr 2016;9(1):45-61.

39. Spiegel A, Brooks MW, Houshyar S, Reinhardt F, Ardolino M, Fessler E, et al. Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer Discov.* 1 juin 2016;6(6):630-49.

40. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* févr 2017;168(4):670-91.

41. Vazquez Rodriguez G, Abrahamsson A, Jensen LDE, Dabrosin C. Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Migration via Recruitment and Activation of Neutrophils. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 3 févr 2017 [cité 19 févr 2017]; Disponible sur: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-16-0150>

42. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene* [Internet]. 12 déc 2016 [cité 10 févr 2017]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncr.2016.406>

43. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells

induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*. 19 oct 2016;8(361):361ra138-361ra138.

44. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. sept 2009;16(3):183-94.

45. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest*. 1 avr 2010;120(4):1151-64.

46. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 1 mai 2012;33(5):949-55.

47. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. mars 2009;9(3):162-74.

48. Hu W-H, Miyai K, Cajas-Monson LC, Luo L, Liu L, Ramamoorthy SL. Tumor-infiltrating CD8(+) T lymphocytes associated with clinical outcome in anal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. sept 2015;112(4):421-6.

49. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*. 13 mai 2014;110(10):2560-8.

50. Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res*. 2015;2015:1-21.

51. Wang J, Jia Y, Wang N, Zhang X, Tan B, Zhang G, et al. The clinical significance of tumor-infiltrating neutrophils and neutrophil-to-CD8+ lymphocyte ratio in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2014;12(1):7.

52. Roses RE, Xu M, Koski GK, Czerniecki BJ. Radiation therapy and Toll-like receptor signaling: implications for the treatment of cancer. *Oncogene*. 7 janv 2008;27(2):200-7.

53. Levy A, Chargari C, Marabelle A, Perfettini J-L, Magné N, Deutsch E. Can immunostimulatory agents enhance the abscopal effect of radiotherapy? *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 17 mai 2016;62:36-45.

54. Mole RH. Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine? *Br J Radiol*. mai 1953;26(305):234-41.

55. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice: Radiation-Immunotherapy Combinations. *CA*

Cancer J Clin. janv 2017;67(1):65-85.

56. Kortylewski M, Kujawski M, Herrmann A, Yang C, Wang L, Liu Y, et al. Toll-like Receptor 9 Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Constrains Its Agonist-Based Immunotherapy. *Cancer Res.* 15 mars 2009;69(6):2497-505.

57. Ahn G-O, Brown JM. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Tumor Vasculogenesis but Not for Angiogenesis: Role of Bone Marrow-Derived Myelomonocytic Cells. *Cancer Cell.* mars 2008;13(3):193-205.

58. Takeshima T, Pop LM, Laine A, Iyengar P, Vitetta ES, Hannan R. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *Proc Natl Acad Sci.* 4 oct 2016;113(40):11300-5.

59. Nam J-S, Terabe M, Mamura M, Kang M-J, Chae H, Stuelten C, et al. An Anti-Transforming Growth Factor Antibody Suppresses Metastasis via Cooperative Effects on Multiple Cell Compartments. *Cancer Res.* 15 mai 2008;68(10):3835-43.

60. McMillan DC. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: A decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev.* août 2013;39(5):534-40.

61. Gu X-B, Tian T, Tian X-J, Zhang X-J. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Sci Rep [Internet].* déc 2015 [cité 10 mai 2017];5(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep12493>

62. Cheng H, Long F, Jaiswar M, Yang L, Wang C, Zhou Z. Prognostic role of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Sci Rep.* 31 juill 2015;5:11026.

63. Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil–lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* oct 2013;88(1):218-30.

64. Kargl J, Busch SE, Yang GHY, Kim K-H, Hanke ML, Metz HE, et al. Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nat Commun.* 1 févr 2017;8:14381.

65. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Coleman WB, éditeur. PLoS ONE.* 6 juin 2014;9(6):e98259.

66. Gros A, Turcotte S, Wunderlich JR, Ahmadzadeh M, Dudley ME, Rosenberg SA. Myeloid Cells Obtained from the Blood but Not from the Tumor Can Suppress T-cell

- Proliferation in Patients with Melanoma. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2012;18(19):5212-23.
67. Escande A, Haie-Meder C, Maroun P, Gouy S, Mazon R, Leroy T, et al. Neutrophilia in locally advanced cervical cancer: A novel biomarker for image-guided adaptive brachytherapy? *Oncotarget.* 4 oct 2016;7 (46), 74886-74894. doi: 10.18632/oncotarget.12440.
 68. Schernberg A, Escande A, Rivin Del Campo E, Ducreux M, Nguyen F, Goere D, et al. Leukocytosis and neutrophilia predicts outcome in anal cancer. *Radiother Oncol.* déc 2016;122(1):137-145. doi: 10.1016/j.radonc.2016.12.009.
 69. Schernberg A, Moureau-Zabotto L, Rivin Del Campo E, Escande A, Ducreux M, Nguyen F, et al. Leukocytosis and neutrophilia predict outcome in locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiation. *Oncotarget.* 10 janv 2017;
 70. Bahig H, Taussky D, Delouya G, Nadiri A, Gagnon-Jacques A, Bodson-Clermont P, et al. Neutrophil count is associated with survival in localized prostate cancer. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2015 [cité 5 août 2016];15(1). Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/15/594>
 71. Escande A, Haie-Meder C, Mazon R, Maroun P, Cavalcanti A, de Crevoisier R, et al. Brachytherapy for conservative treatment of invasive penile carcinoma: Prognostic factors and long-term analysis of outcome. *Int J Radiat Oncol.* févr 2017;
 72. Schmidt H, Suci S, Punt CJA, Gore M, Kruit W, Patel P, et al. Pretreatment Levels of Peripheral Neutrophils and Leukocytes As Independent Predictors of Overall Survival in Patients With American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: Results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol.* 20 avr 2007;25(12):1562-9.
 73. El Rayes T, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C, et al. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci.* 29 déc 2015;112(52):16000-5.
 74. Schernberg A, Vernerey D, Goldstein D, Van Laethem JL, Glimelius B, Van Houtte P, et al. Neutrophil count and efficacy of chemoradiation in patient with locally advanced unresectable pancreatic carcinoma: an ancillary study of in the LAP 07 trial. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 4120).
 75. Rennard SI, Dale DC, Donohue JF, Kanniss F, Magnussen H, Sutherland ER, et al. CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 2015;191(9):1001-11.
 76. Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, et al. A

- CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis. *Cell*. juill 2012;150(1):165-78.
77. Phan VT, Wu X, Cheng JH, Sheng RX, Chung AS, Zhuang G, et al. Oncogenic RAS pathway activation promotes resistance to anti-VEGF therapy through G-CSF-induced neutrophil recruitment. *Proc Natl Acad Sci*. 9 avr 2013;110(15):6079-84.
 78. Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF- β Targeted Cancer Therapy. *Int J Biol Sci*. 2012;8(7):964-78.
 79. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. mars 2015;147:22-31.
 80. Sweet MJ, Shakespear MR, Kamal NA, Fairlie DP. HDAC inhibitors: modulating leukocyte differentiation, survival, proliferation and inflammation. *Immunol Cell Biol*. janv 2012;90(1):14-22.
 81. Caponigro F, Di Gennaro E, Ionna F, Longo F, Aversa C, Pavone E, et al. Phase II clinical study of valproic acid plus cisplatin and cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of Head and Neck-V-CHANCE trial. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2016 [cité 8 mai 2017];16(1). Disponible sur: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2957-y>
 82. Sharma RA, Plummer R, Stock JK, Greenhalgh TA, Ataman O, Kelly S, et al. Clinical development of new drug–radiotherapy combinations. *Nat Rev Clin Oncol*. 1 juin 2016;13(10):627-42.
 83. Golden EB, Chhabra A, Chachoua A, Adams S, Donach M, Fenton-Kerimian M, et al. Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *Lancet Oncol*. juill 2015;16(7):795-803.
 84. Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, et al. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci*. 12 août 2014;111(32):11774-9.
 85. Highfill SL, Cui Y, Giles AJ, Smith JP, Zhang H, Morse E, et al. Disruption of CXCR2-Mediated MDSC Tumor Trafficking Enhances Anti-PD1 Efficacy. *Sci Transl Med*. 21 mai 2014;6(237):237ra67-237ra67.
 86. Devisetty K, Mell LK, Salama JK, Schomas DA, Miller RC, Jani AB, et al. A multi-institutional acute gastrointestinal toxicity analysis of anal cancer patients treated with

concurrent intensity-modulated radiation therapy (IMRT) and chemotherapy. *Radiother Oncol.* nov 2009;93(2):298-301.

87. Zilli T, Schick U, Ozsahin M, Gervaz P, Roth AD, Allal AS. Node-negative T1–T2 anal cancer: Radiotherapy alone or concomitant chemoradiotherapy? *Radiother Oncol.* janv 2012;102(1):62-7.

88. Fraunholz I, Rabeneck D, Gerstein J, Jäck K, Haberl A, Weiss C, et al. Concurrent chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and mitomycin C for anal carcinoma: Are there differences between HIV-positive and HIV-negative patients in the era of highly active antiretroviral therapy? *Radiother Oncol.* janv 2011;98(1):99-104.

89. Banerjee R, Roxin G, Eliasziw M, Joseph K, MacLean A, Buie WD, et al. The Prognostic Significance of Pretreatment Leukocytosis in Patients With Anal Cancer Treated With Radical Chemoradiotherapy or Radiotherapy: *Dis Colon Rectum.* sept 2013;56(9):1036-42.

90. Cho Y, Kim KH, Yoon HI, Kim GE, Kim YB. Tumor-related leukocytosis is associated with poor radiation response and clinical outcome in uterine cervical cancer patients. *Ann Oncol.* 8 août 2016;27(11): 2067-2074. doi: 10.1093/annonc/mdw308.

91. Mabuchi S, Matsumoto Y, Isohashi F, Yoshioka Y, Ohashi H, Morii E, et al. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* juill 2011;122(1):25-32.

92. Kapacee ZA, Susnerwala S, Wise M, Biswas A, Danwata F, Scott N. Chemoradiotherapy for squamous cell anal carcinoma: a review of prognostic factors. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* 30 mars 2016;

93. Oblak I, Cesnjevar M, Anzic M, Hadzic JB, Ermenc AS, Anderluh F, et al. The impact of anaemia on treatment outcome in patients with squamous cell carcinoma of anal canal and anal margin. *Radiol Oncol [Internet].* 27 janv 2015 [cité 3 août 2016];0(0). Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/raon.ahead-of-print/raon-2015-0015/raon-2015-0015.xml>

94. Toh E, Wilson J, Sebag-Montefiore D, Botterill I. Neutrophil:lymphocyte ratio as a simple and novel biomarker for prediction of locoregional recurrence after chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the anus. *Colorectal Dis.* mars 2014;16(3):O90-7.

95. Saeed N, Freilich J, Ahmed K, Strom T, Shridhar R, Hoffe S. Pretreatment Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) Does Not Predict Worse Outcomes in Anal Cancer. *Int J Radiat Oncol.* sept 2014;90(1):S399.

96. Feng J-F, Huang Y, Chen Q-X. Preoperative platelet lymphocyte ratio (PLR) is superior to neutrophil lymphocyte ratio (NLR) as a predictive factor in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2014;12(1):58.
97. Templeton AJ, McNamara MG, eruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocana A, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 29 mai 2014;106(6):dju124-dju124.
98. Gilbert DC, Serup-Hansen E, Linnemann D, Høgdall E, Bailey C, Summers J, et al. Tumour-infiltrating lymphocyte scores effectively stratify outcomes over and above p16 post chemo-radiotherapy in anal cancer. *Br J Cancer*. 19 janv 2016;114(2):134-7.
99. Haanen JBAG, Baars A, Gomez R, Weder P, Smits M, de Gruijl TD, et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. avr 2006;55(4):451-8.
100. Bai X, Zhang Q, Wu S, Zhang X, Wang M, He F, et al. Characteristics of Tumor Infiltrating Lymphocyte and Circulating Lymphocyte Repertoires in Pancreatic Cancer by the Sequencing of T Cell Receptors. *Sci Rep*. 2 sept 2015;5:13664.
101. Stone SC, Rossetti RAM, Lima AM, Lepique AP. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models: Inflammation in HPV associated tumors. *Immun Inflamm Dis*. août 2014;2(2):63-75.
102. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol*. juin 2013;23(3):200-7.
103. Chargari C, Magne N, Guy J-B, Rancoule C, Levy A, Goodman KA, et al. Optimize and refine therapeutic index in radiation therapy: Overview of a century. *Cancer Treat Rev*. avr 2016;45:58-67.
104. White EC, Goldman K, Aleshin A, Lien WW, Rao AR. Chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the anal canal: Comparison of one versus two cycles mitomycin-C. *Radiother Oncol*. nov 2015;117(2):240-5.

X - Annexe

1. ANNEXE 1 : Classification TNM clinique de l'AJCC et de l'UICC, 7ème édition (2011) :

Tumeur primitive

T1 : tumeur inférieure ou égale à 2 cm dans sa plus grande dimension

T2 : tumeur supérieure à 2 cm mais inférieure ou égale à 5 cm dans sa plus grande dimension (de 21 mm à 50 mm)

T3 : tumeur supérieure à 5 cm dans sa plus grande dimension

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, qui envahit un ou plusieurs organes adjacents (vagin, urètre, vessie) à l'exception du rectum, de la peau périnéale, du tissu cellulaire sous-cutané et du sphincter.

Adénopathies régionales (N)

Nx : ganglions non évalués

N0 : pas de localisation secondaire ganglionnaire

N1 : ganglions péri-rectaux

N2 : ganglions iliaque interne et/ou inguinal unilatéraux

N3 : ganglions péri-rectaux et inguinaux et/ou iliaques internes bilatéraux et/ou inguinaux bilatéraux.

Métastases à distance (M)

MX : non évaluées

M0 : pas de localisation secondaire à distance de la tumeur primitive

M1 : métastases à distance

2. ANNEXE 2 : Publications associées.

Titre

L'hyperleucocytose et la neutrophilie, facteurs pronostiques avant chimioradiothérapie des carcinomes épidermoïdes du canal anal.

Résumé

Objectif :

Cette étude visait à étudier l'association pronostique de l'hyperleucocytose et la neutrophilie chez les patients traités par chimioradiothérapie concomitante pour un carcinome épidermoïde du canal anal.

Matériels et Méthodes :

Les données cliniques des patients traités entre 2006 et 2016 à l'Institut Gustave Roussy ont été analysées pour former la cohorte d'entraînement. Les patients traités à l'hôpital Tenon (Paris) et à l'Institut Paoli Calmettes (Marseille) constituaient la cohorte de validation. L'hyperleucocytose était définie comme un taux de leucocytes circulants au diagnostic ≥ 10 G/L, et la neutrophilie un taux de neutrophiles circulants au diagnostic ≥ 7 G/L. L'association pronostique entre l'hyperleucocytose et la neutrophilie a été étudiée rétrospectivement.

Résultats :

La cohorte d'entraînement incluait 103 patients. La majorité (78%) ont reçu une chimiothérapie concomitante. Une hyperleucocytose ou une neutrophilie étaient présentes au diagnostic chez 12% et 8% des patients, respectivement. Les survies globale et sans progression à 3 ans étaient respectivement de 88% et 67%.

En analyse univariée, l'hyperleucocytose et la neutrophilie étaient fortement associées à une survie globale, une survie sans progression, sans rechute locale ou à distance diminuées ($p < 0,01$). En analyse multivariée, l'hyperleucocytose et la neutrophilie restaient des facteurs pronostiques indépendamment associés à une survie globale et sans récurrence altérée. Ces résultats ont été validés dans la cohorte de validation, qui incluait 133 patients.

Conclusion :

L'hyperleucocytose et la neutrophilie sont des facteurs pronostiques indépendants associés à une survie globale et sans progression inférieure dans ces deux cohortes indépendantes de patients traités par chimioradiothérapie d'un carcinome épidermoïde du canal anal. Ces biomarqueurs simples et peu onéreux pourraient aider à sélectionner les patients les plus à risque de rechute, afin de leur proposer des protocoles d'essais cliniques spécifiques.

Mots clés : Carcinome épidermoïde ; canal anal ; facteur pronostique ; chimioradiothérapie ; hyperleucocytose ; neutrophilie

Title

Leukocytosis and neutrophilia as prognosis biomarkers in anal cancer patients.

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