HAL
open science

Exploration de la composante Immunitaire des cancers colorectaux par des approches d'imagerie et transcriptomiques. Implications cliniques potentielles

Florence Marliot

To cite this version:

Florence Marliot. Exploration de la composante Immunitaire des cancers colorectaux par des approches d'imagerie et transcriptomiques. Implications cliniques potentielles. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01660326

HAL Id: hal-01660326

https://ephe.hal.science/hal-01660326v1

Submitted on 12 Dec 2017

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.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

Florence Marliot

Pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

TITRE : Exploration de la composante Immunitaire des cancers colorectaux par des approches d'imagerie et transcriptomiques. Implications cliniques potentielles

Soutenu le 24 novembre 2017 devant le jury suivant :

M. Le Professeur	Plenchette-Colas Stéphanie	- Président
M. Le Professeur	Pagès Franck	- Tuteur scientifique
M. Le Professeur	Canque Bruno	- Tuteur pédagogique
M. Le Professeur	Degano-Valmary Séverine	- Rapporteur
M. Le Professeur	Zeitoun Guy	- Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Professeur Franck Pagès
Laboratoire d'immunologie biologique, plateforme Immunomonitoring, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Le blanc, 75015, Paris. Directeur : Pr Tartour Éric.

Laboratoire d'Immunologie et Cancérologie Intégratives, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe INSERM 15, UMRS 1138, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris. Directeur : Dr Galon Jérôme.

et de :
Professeur Bruno Canque
Laboratoire de Développement du Système Immunitaire, UMR INSERM/UPVII/EPHE 1126 Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hôpital St Louis, 1 Avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris. Directeur : Dr Bories Jean-Christophe.
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre).

REMERCIEMENTS

Rester indifférent aux défis qui nous font face est indéfendable. Si l'objectif est noble, qu'il soit atteint ou non au cours de notre existence n'a que peu d'importance. Par conséquent, il nous faut lutter, persévérer et ne jamais renoncer (Le 14eme Dalaï-Lama).

Le travail que je présente dans ce mémoire a pu être effectué grâce à l'aide, les conseils et le soutien de nombreuses personnes, que je tiens à remercier.

Merci au Pr Plenchette-Colas Stéphanie de présider et juger mon travail.

Au Pr Franck Pagès, qui a su me faire confiance depuis plusieurs années, qui m'a conseillée et soutenue tout au long de mon parcours. Je suis très heureuse de pouvoir lui apporter ici le témoignage de mon profond respect.

Merci à mon tuteur pédagogique, le Pr Bruno Canque pour m'avoir acceptée parmi ces étudiants, merci pour vos précieux conseils.

Merci au Pr Degano-Valamary Séverine d'avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur. Ses remarques précises et pertinentes apportent un éclairage nouveau à ce travail.

Merci au Dr Guy Zeitoun d'avoir accepté d'être examinateur parmi mon jury et de juger mon travail.

Merci au Pr Éric Tartour et au Pr Hervé Wolf- Fridman de m'avoir accueillie au sein du service Immunologie Biologique.

Merci également à l'ensemble du service de m'avoir accueilli parmi eux :

Le Dr Véronique Frémeau-Bacchi, merci de m'avoir fait confiance.
Le Dr Marie- Agnès Dragon-Durey, pour ta bonne humeur et tes très bons conseils dans les méthodologies à appliquer lors de la validation du test Immunoscore et l'évaluation de sa performance.

Merci à Alain, pour ta gentillesse et tes conseils en immunohistochimie.

Merci à Pauline et Paula pour votre aide dans les techniques d'extraction ARN.

Merci à mon équipe « Immunomonitoring » :

Nacilla, le pilier de la plateforme et mon binôme depuis le début de cette aventure, merci pour ton soutien et ton travail.

Valérie, merci pour tes moments « cultures, musiques et loisirs ». C'est toujours agréable pour nos moments de pauses.

Merci à Amos pour ta gentillesse, toujours prêt à nous aider et à nous conseiller, merci pour ton travail statistique dans l'étude du cancer du rectum.

Merci à Carine, toujours souriante même dans les moments difficiles de l'imagerie, merci pour ton excellent travail parmi nous.

Merci également au service d'anatomopathologie de l'HEGP, dirigé par le Pr Bruneval, pour nous avoir permis de constituer ces cohortes de cancer du colon

Merci au Dr Christine Lagorce-Pagès pour sa gentillesse et sa disponibilité, son enseignement pathologique m'a été d'une grande aide.

Merci à mon équipe au Centre de Recherche des Cordeliers :

Au Dr Jérôme Galon pour m'avoir permis de participer à cette grande aventure de l'Immunoscore… merci également pour les « ski seminar », un précieux moment de travail et de détente.

Merci à Tess, une éternelle bouffée de bonne humeur, continue à être comme tu es ! Merci pour ton aide avec la technologie Nanostring.

Pauline, merci pour les bons moments passés avec toi.

Bénédicte, tu es aussi efficace qu'adorable.

Lucie, tu comprends les moments de déprime devant Developer XD…

Merci à Angela d'apporter sa bonne humeur ainsi que plein de nouveaux projets dans l'équipe.

Merci à Mikaela toujours souriante.

Merci les filles pour l'effort final des analyses de SITC !

Merci à Berni et Gabi pour m'avoir toujours accueilli avec gentillesse, merci pour votre soutien et l'énorme travail fourni dans les analyses statistiques !

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

A tous les centres qui se sont impliqués pendant 5 ans à cette grande étude internationale, une très belle preuve d'un effort collectif international. Merci à l'équipe de la Mayo Clinique de l'énorme travail fourni dans les analyses statistiques. Un grand hommage au Pr Dan Sargent, décédé en 2016 avant les résultats finaux de l'étude et qui a cru en notre travail.

Le Dr Marc Van Den Eynde (Belgique), un grand oncologue, merci pour ta disponibilité et ta gentillesse, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, merci pour ta collaboration essentielle dans l'avancé de nos études.

Merci au Pr Habr-Gama et au Dr Rodrigo Perez (Brésil) pour leur partenariat et l'accès à leurs données cliniques et histologiques.

A l'équipe du Pr Scripcariu (Roumanie) et notamment les Drs Gabriela Bindea et Ana Maria Todosi, pour leur collaboration dans ce travail passionnant. Merci pour l'incroyable travail fourni pour notre équipe.

Au Dr Soledad Iseas et toutes les équipes en Argentine pour leur précieuse collaboration dans l'étude du cancer du rectum et le précieux matériel fourni. Merci pour votre investissement.

Merci à Maximilien qui en quelques mois à fait un travail remarquable sur les analyses des biopsies.

Merci à HalioDX pour avoir contribué au travail de la robustesse de l'Immunoscore.

A mes amis et ma famille, mes parents qui m'ont toujours soutenue…

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIERES **4**

TABLE DES FIGURES **9**

TABLE DES TABLEAUX **11**

ABREVIATIONS **12**

INTRODUCTION **15**

1. Le cancer colorectal **15**

1.1. Epidémiologie et facteurs de risque 15

1.1.1. Incidence 15

1.1.2. Facteurs de risque 15

1.2. Anatomie et localisation du cancer colorectal 16

1.3. Progression tumorale et histologie du cancer colorectal 17

1.4. Instabilités génétiques 18

2. Diagnostic clinique du cancer colorectal **20**

2.1. Signes et examens cliniques 20

2.2. Classification anatomopathologique 20

2.3. Biomarqueurs génétiques et moléculaires 22

3. Traitements utilisés en clinique et leurs effets indésirables **25**

3.1. La chirurgie 25

3.2. La radiothérapie 25

3.3. La chimiothérapie néoadjuvante et adjuvante 25

3.4. Thérapies ciblées 26

3.5. Effets indésirables 27

4. Evaluation pronostique actuelle dans le cancer colorectal **28**

5. Nouvel acteur impliqué dans l'évolution du cancer : le microenvironnement tumoral **29**

5.1. Du paradigme centro-cellulaire à l'intégration du microenvironnement tumoral 29

5.2. Principes de l'Immunosurveillance antitumorale, intérêt et limites 30

5.2.1. La théorie de l'immunosurveillance 30

5.2.2. L'Immunoediting : la théorie des trois E 32

5.2.2.1. La phase d'élimination 33

5.2.2.2. La phase d'équilibre 34

5.2.2.3. La phase d'échappement 35

6. Rôle de l'infiltrat immunitaire dans le cancer colorectal 36

6.1. Infiltrat immunitaire présent dans le microenvironnement tumoral du cancer colorectal 36

6.2. Valeur pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur dans le cancer colorectal 37

6.3. Nouvelles immunothérapies anti-PD-1/PDL-1 et anti-CTLA-4 : l'infiltrat immunitaire, un biomarqueur prédictif de la réponse au traitement ?..... 39

6.4. Activation de l'infiltrat immunitaire par la radiochimiothérapie : mort cellulaire immunogène 40

7. Elaboration d'un test immunologique comme marqueur pronostique du cancer colorectal 40

OBJECTIFS DES ETUDES 42

1. Validation clinique de l'Immunoscore dans le cancer colique.....42

1.1. Evaluation de la performance du test Immunoscore en pratique clinique..... 42

1.2. Validation internationale du test Immunoscore dans le cancer du côlon 42

2. Evaluation de l'Immunoscore dérivé dans le cancer du rectum 43

2.1. Contexte clinique 43

2.2. Objectif de l'étude 43

MATERIEL ET METHODES 45

1. Population et cohortes 45

1.1. Evaluation méthodologique du test Immunoscore : tissu et cohortes 45

1.2. Validation clinique du test Immunoscore : cohorte internationale SITC 45

1.3. Cancer du rectum : analyse dérivée de l'Immunoscore sur biopsies 47

2. Immunohistochimie 48

3. Numérisation des lames 49

4. Quantification de l'infiltrat immunitaire à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image 49

4.1. Quantification immunitaire dans une tumeur primaire colique 49

4.2. Quantification immunitaire dans une biopsie diagnostique 50

5. Coordination de l'étude internationale SITC 51

6. Analyse de l'instabilité des microsatellites 52

7. Etude de l'expression de gènes, technique Nanostring 53

7.1. Extraction ARN 53

7.2. Analyse par la technologie Nanostring 53

8. Analyses Statistiques 55

8.1. Analyses Statistiques des performances du test Immunoscore 55

8.2. Analyses statistiques de l'étude internationale 56

8.3. Analyses statistiques de l'Immunoscore dérivé sur le cancer du rectum 56

8.4. Analyses de survie globale et de survie sans récidive 57

RESULTATS 58

1. Analyse de l'Immunoscore dans le cancer colique 58

2. Performance du test Immunoscore 59

2.1. Variabilité de l'intensité de marquage 59

2.1.1. Détection des cellules CD3+, CD8+ par le logiciel d'analyse d'image et validation de l'intensité de marquage 59

2.1.2. Variabilité de l'intensité de marquage en fonction de l'âge du bloc FFPE 61

2.2. Quantification de l'infiltrat immunitaire 62

2.2.1. Comparaison de deux méthodes de comptage 62

2.2.2. Répétabilité de comptage du logiciel d'analyse d'image 64

2.3. Variabilité du test Immunoscore induite par l'opérateur 64

2.3.1. Répétabilité de la quantification par un opérateur 64

2.3.2. Reproductibilité de la quantification par différents opérateurs selon deux méthodes d'analyse du score immunitaire 65

2.4. Variabilité du test Immunoscore induite par l'échantillon 67

2.4.1. Variabilité du test Immunoscore en fonction du niveau de coupe de l'échantillon 67

2.4.2. Variabilité du test Immunoscore en fonction du choix du bloc tumoral 69

2.5. Comparaison intercentre de l'Immunoscore 70

2. Validation clinique du test Immunoscore chez des patients atteints de cancer du côlon : étude rétrospective multicentrique internationale 72

2.1. Normalisation intercentre de la méthode d'analyse 72

2.2. Hétérogénéité de la densité lymphocytaire dans la région tumorale chez des patients atteints de cancer du côlon 74

2.3. Evaluation pronostique de l'Immunoscore du cancer du côlon 75

2.3.1. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore 75

2.3.1.1. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore de la cohorte Test 75

2.3.1.2. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore des cohortes de validation 76

2.3.1.3. Analyses multivariées associées à l'Immunoscore 77

2.3.2. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore et au statut MSI 78

3. Exploration de l'infiltrat immunitaire dans les cancers du rectum 80

3.1. Représentativité des populations immunitaires évaluée sur des biopsies de cancer du rectum 80

3.2. Infiltrat immunitaire et prédiction à la réponse RCT 81

3.3. Modifications immunitaires induites par la RCT 83

3.3.1. Analyses d'expression de gènes « immunitaires » chez des patients traités et non traités, bons répondeurs et mauvais répondeurs 83

3.3.2. Profil d'expression des gènes associés à une bonne réponse à la RCT 84

3.4. Infiltrat immunitaire et prédiction de survie chez les patients traités par la RCT ..85

3.4.1. Analyse de la survie associée à l'infiltrat immunitaire chez les patients traités par RCT 85

3.4.2. Analyse de la survie des patients associées aux données immunitaires issues des biopsies, et à l'évaluation histologique de la réponse à la RCT sur la pièce opératoire (Score de Dworak) 86

3.4.3. Association des données immunitaires et de l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (ycTNM) 87

3.5. Conséquences thérapeutiques potentielles : stratégie de Watch and Wait..... 89

DISCUSSION.....92

1. Valeur pronostique et thérapeutique de l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs : nécessité d'introduire de nouveaux biomarqueurs immunitaires en pratique clinique 92
2. Performance intrinsèque de l'Immunoscore 93
3. Robustesse et puissance du test Immunoscore dans le cancer du côlon et implication clinique 96
4. Vers une évaluation pronostique et thérapeutique du cancer du rectum sur biopsie diagnostique 99

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....102

ANNEXES 105

BIBLIOGRAPHIE.....109

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du côlon et du rectum. Localisation du cancer. 16

Figure 2. Classification TNM des cancers colorectaux et progression tumorale..... 21

Figure 3. Exemple de régression tumorale selon la classification de Dworak..... 22

Figure 4. Courbe de survie sans récidive (DFS) catégorisée par stade de la classification TNM. 29

Figure 5. Schéma des trois E de l'Immunoediting..... 33

Figure 6. Analyse de survie sans récidive de patients atteints de cancer colorectal. 38

Figure 7. Dichotomisation de la cohorte internationale de 14 centres de 13 pays. 46

Figure 8. Exemple d'une tumeur analysée par le module Immunoscore..... 50

Figure 9. Exemple d'analyse d'une biopsie par le logiciel d'image Definiens. 51

Figure 10. Représentation schématique de la coordination de l'étude internationale de validation clinique de l'Immunoscore. 52

Figure 11. Technologie Nanostring. 55

Figure 12. Exemple d'analyse de l'Immunoscore pour un patient X. 59

Figure 13. Variabilité de l'intensité de marquage et détection des cellules immunomarquées en CD3+ par le logiciel d'analyse d'image. 60

Figure 14. Robustesse du marquage CD3+ et CD8+ au cours du temps. 61

Figure 15. Corrélation de Pearson entre une quantification optique et une quantification par le logiciel d'analyse d'image (IA) des lymphocytes CD3+, CD8+. 62

Figure 16. Graphique de Bland et Altman. Mesure de l'ampleur du désaccord entre le comptage de l'opérateur (OP) et le comptage du logiciel d'analyse d'image Developer XD (IA) 63

Figure 17. Répétabilité par un opérateur de la quantification immunitaire dans les régions tumorales 65

Figure 18. Matrice de corrélation des densités immunitaires selon différents opérateurs.... 66

Figure 19. Variabilité de la densité lymphocytaire CD3+ et CD8+ sur 4 coupes tissulaires adjacentes de 4 blocs. 67

Figure 20. Variabilité de l'Immunoscore (IS) en fonction du niveau de coupe sur un même bloc. 68

Figure 21. Variabilité de la quantification immunitaire en fonction du choix du bloc. 70

Figure 22. Comparaison intercentre du test Immunoscore. 71
Figure 23. Méthode de normalisation des protocoles d'immunomarquage CD3, CD8. 72
Figure 24. Comparaison de la valeur de la moyenne d'intensité de marquage CD3, CD8 entre le centre X et le centre référent sur deux lames adjacentes d'un bloc FFPE. 73
Figure 25. Hétérogénéité de la densité lymphocytaire T parmi les patients. 74
Figure 26. Courbes de survie de patients atteints de cancer du côlon stade I à III : cohorte test 75
Figure 27. Courbes de de survie sans récidive de patients atteints de cancer du côlon stade I à III : cohorte de validation interne (IVS) et de validation externe (EVS) 77
Figure 28. Courbes de survie sans récidive associées à l'Immunoscore..... 79
Figure 29. Comparaison des surfaces tissulaires des biopsies et des coupes tumorales..... 81
Figure 30. Comparaison des densités moyennes en lymphocytes CD3+ et CD8+ sur l'ensemble de la zone tumorale des biopsies de patients non répondeurs à la RCT néoadjuvante et bons répondeurs 82
Figure 31. Expression de 48 gènes « immunitaires » analysée dans le microenvironnement tumoral . Un clustering hiérarchisé..... 84
Figure 32. Comparaison du niveau d'expression de gènes immunitaires entre les patients non répondeurs et répondeurs 85
Figure 33. Courbes de survie sans récidive associées à l'infiltrat immunitaire évalué à partir de biopsies..... 86
Figure 34. Courbes de survie sans récidive associées à la combinaison à l'infiltrat immunitaire et à l'évaluation histologique de la réponse à la RCT post-chirurgie..... 87
Figure 35. Courbes de survie sans récidive associées à l'évaluation de l'infiltrat immunitaire à partir de biopsies, et à l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (classification ycTNM)... 88
Figure 36. Diagramme descriptif des cohortes suivi en Watch and Wait. 89
Figure 37. Moyenne des densités en CD3 sur les biopsies diagnostiques de patients suivis en « Watch and Wait »..... 90
Figure 38. Courbes de survie sans récidive associées à l'évaluation de l'infiltrat immunitaire.. 91

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Description de la cohorte analysée de patients atteints de cancer rectal traités par radiochimiothérapie. 47

Tableau 2. La moyenne des coefficients de variations de la densité immunitaire de chaque coupe sériée des 4 blocs 67

Tableau 3. Evaluation de l'Immunoscore en 3 groupes pour chaque échantillon 69

Tableau 4. Comparaison de l'Immunoscore en 3 groupes entre le bloc sélectionné et le bloc tiré au hasard de chaque patient d'une cohorte de n=166 patients. 70

Tableau 5. Evaluation de l'Immunoscore en 3 groupes entre le centre HEGP et le centre HalioDx. 71

Tableau 6. Analyses multivariées en DFS pour l'Immunoscore 78

Tableau 7. Tableau de contingence évaluant la densité en CD8 sur la biopsie diagnostique comme test prédictif 82

ABREVIATIONS

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
ADN	Acide desoxyribonucleide
AI	Analyse d'image
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARNm	Acide ribonuceide messager
ATP	Acide triphosphate
CCL	Cytokines
CCR	Colorectal cancer
CD	Cluster de différenciation
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CLT	Lymphocytes cytotoxiques
CQE	Contrôle de Qualité Externe
CT	Tumeur
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4
cTNM	Classification TNM clinique
CTNNB1	Catenin Beta 1 gene
CV	Coefficient de variation
CXCL	Chimiokines
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DFS	Survie sans récidive
dMMR	Système MMR déficient
EGFR	Epidermal Growth Factor
EVS	Cohorte externe validation set
5-FU	5-fuorouracil
FA	Acide folinique
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FOLFIRI	5-fuorouracil/acide folinique/irinotécan
FOLFOX	5-fuorouracil/acide folinique/oxaliplatine
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GNLY	Granulysine
GZM	Granzyme
HDX	HalioDX
HEGP	Hôpital européen Georges Pompidou
HES	Hématoxyline Eosine Safran

Het	Hétérogène
Hh	Hedgehog
HMGB1	High mobility group box 1
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxydase
I	Immunoscore
IC	Intervalle de confiance
ICC	Coefficient intra classe
IDO	Indolamine-2,3-dioxygénase
IFN	interferon
IHH	indian hedgehog
IL	Interleukine
IM	Marge d'invasion
Int	Intermédiaire
IRF1	IFN-facteur de régulation 1
IRM	L'imagerie par résonance magnétique
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
IS	Immunoscore
IVS	Cohorte interne validation set
KM	Kaplan Meier
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
Lo	Low
LOH	Loss of Héterozygocy
LT	Lymphocyte T
LT B	Lymphocyte Bone
LTh	Lymphocyte Thymus Helper
LV	Leucovorine
MCI	Molécules de co-stimulation inhibitrices
MDSC	Cellules myéloïdes immunosuppressives
MEC	Matrice extracellulaire
MICI	Maladies inflammatoires chroniques intestinales
MIP-3a	Macrophage Inflammatory Protein-3α
MLH1	L'homologue MutL 1
MLH3	L'homologue MutL 3
MMR	Système de réparation des mésappariements
MSH2	L'homologue MutS 2
MSH3	L'homologue MutS 3
MSH6	L'homologue MutS 6
MSI	Instabilité microsatellitaire
MSI-H	Instabilité microsatellitaire hight

MSS	Stabilité microsatellitaire
NK	Natural killer
NKG2D	Natural-killer group 2, member D
OP	Opérateur
OS	Survie globale
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death 1-ligand
PET-scan	Tomographie par Émission de Positrons-scanner
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
pMMR	Système MMR proficient
PMS2	Ségrégation postméïotique
pRCT	Radiochimiothérapie préopératoire
pTNM	Classification TNM pathologique
R	Random
RCT	Radiochimiothérapie
S	Sélectionné
SD	Standard deviation (écart-type)
SEM	Standard error of the mean
SITC	Société pour l'immunothérapie du cancer
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription 1
T regs	Lymphocytes T régulateurs
TBX21	T-box transcription factor gene
Tfh	Lymphocytes T folliculaire-helper
TGF-b	Transforming growth factor beta
TMA	Puce tissulaire
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TRG	Classification de la régression tumorale
TS	Cohorte Test (Test set)
UICC	International Association of Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	Versus
Wnt	Gène Wingless
ycTNM	Classification TNM clinique après traitement

INTRODUCTION

1. Le cancer colorectal

1.1. Epidémiologie et facteurs de risque

1.1.1. Incidence

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. Il est à l'origine de 8,8 millions de décès en 2015, soit près de 13% de la mortalité mondiale. Un des cancers les plus fréquents dans le monde est le cancer colorectal avec une incidence de 695000 de nouveaux cas par an (Ferlay et al., 2015) (Bray et al., 2013). La France fait partie des pays pour lesquels le risque de cancer colorectal est élevé au même titre que les autres pays d'Europe occidentale, les États-Unis, l'Australie et, plus récemment, le Japon. En effet, le cancer colorectal se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents après le cancer du poumon, le cancer de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme. L'étude longitudinale de l'incidence du cancer colorectal entre 1980 et 2012 montre pour les deux sexes, qu'après avoir augmenté jusqu'en 2000, celle-ci se stabilise à partir de 2005 puis diminue (Francim, HCL, InVS, INCa, 2016).

1.1.2. Facteurs de risque

Le risque de développer un cancer colorectal devient important à partir de 45 ans ; il double ensuite à chaque décennie. Plus d'hommes que de femmes sont atteints par ce type de cancer. Le nombre de cas de cancer colorectal est plus élevé dans les pays industrialisés (Amérique du Nord, Europe occidentale, Australie) que dans les pays les moins industrialisés (Afrique et Amérique du Sud).

Certains caractères transmis de manière héréditaire, aboutissant à une polypose adénomateuse familiale ou à un syndrome de Lynch, sont responsables d'un risque accru de cancer colorectal. Ils représentent moins de 5% des patients atteints de cancer colorectal. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) telle que la maladie de Crohn ou la recto-colite hémorragique sont également associées à un risque accru de transformation

cancéreuse. Les MICI touchent 200000 personnes en France. Malgré leur fréquence, elles sont largement méconnues.

D'autres facteurs de risque de cancer colorectal sont associés à notre mode de vie occidental avec une alimentation pauvre en fibre et riche en graisse. On peut également ajouter à ces facteurs de risque, l'inactivité physique, l'alcool et l'obésité (INS, Institut National du Cancer).

1.2.Anatomie et localisation du cancer colorectal

Le côlon est la partie de l'intestin qui fait suite à l'intestin grêle. Il commence par le caecum, lieu d'implantation de l'appendice, se prolonge par le côlon ascendant ou droit, l'angle droit, le côlon transverse, l'angle gauche, le côlon descendant, le sigmoïde puis continue par le rectum et termine par l'anus. Le rectum est la partie pelvienne du gros intestin, d'une longueur de 12 cm, il va de la charnière recto-sigmoïdienne jusqu'au canal anal (bord supérieur de l'appareil sphinctérien). On distingue le bas rectum (3 à 5 cm de la marge), le moyen rectum (5 à 10 cm de la marge) et le haut rectum (10 à 15 cm de la marge).

Deux tiers des cancers colorectaux sont localisés au niveau du côlon, un peu moins d'un tiers au niveau rectal.

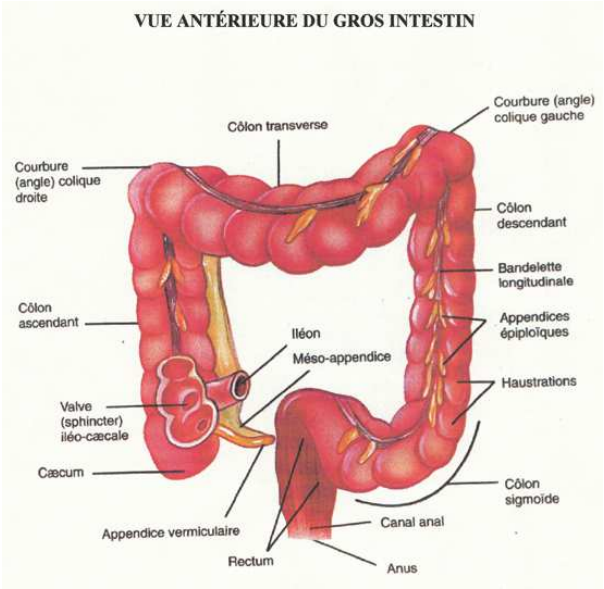


Figure 1. Anatomie du côlon et du rectum. Localisation du cancer.

1.3. Progression tumorale et histologie du cancer colorectal

La muqueuse colique est un épithélium de revêtement constitué majoritairement de cellules caliciformes qui s'enfoncent dans la muqueuse en « cryptes de Lieberkühn ». Dans 60 à 80% des cas, les adénocarcinomes colorectaux se développent à partir de polypes précancéreux, appelés adénomes. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de la taille, de l'importance de la composante villeuse au sein de l'adénome et du degré de dysplasie (données HAS, 2012). Différents types histologiques se distinguent : 95% des adénocarcinomes sont de types lieberkühniens. Plus rarement, il s'agit d'adénocarcinomes colloïdes (mucineux) caractérisés par la présence de larges flaques de mucus, de carcinomes médullaires ou de carcinomes caractérisés par des cellules en bagues à chaton.

La progression tumorale débute par la prolifération de cellules transformées de façon anarchique. Elles vont former un carcinome *in situ* confiné au sein de la couche épithéliale séparée du stroma sous-jacent par une membrane basale intacte. Pour s'étendre dans les tissus, la tumeur doit rompre cette membrane. Si l'expansion tumorale se produit, certaines cellules tumorales acquièrent des capacités migratoires et envahissent la matrice extracellulaire (MEC) du mésenchyme sous-jacent, formant ainsi un adénocarcinome invasif. Les cellules tumorales envahissent la muqueuse et la sous-muqueuse (tissu conjonctif), la musculeuse disposée en 2 couches de tissu musculaire lisse, puis la séreuse (tissu adipeux). La tumeur peut également atteindre les ganglions drainants. Elle peut dépasser la paroi intestinale, le péritoine, pour envahir les organes avoisinants. En effet, l'évolution tumorale comporte une sélection positive de sous-clones à capacité « métastasiante » formant des foyers cancéreux secondaires développés à distance de la tumeur primitive. Les cellules tumorales pénètrent la paroi des vaisseaux sanguins ou des vaisseaux lymphatiques préexistants ou néoformés au sein de la tumeur et en périphérie par un processus d'intravasation. Elles migrent alors vers les sites secondaires par les voies sanguine ou lymphatique puis pénètrent dans les sites secondaires par un processus d'extravasation. Dans le cas du cancer colorectal, elles envahissent notamment le foie et les poumons (CoPath, cours, 2012).

1.4. Instabilités génétiques

Des facteurs génétiques interviennent dans les formes sporadiques (80-90% des cas) ou familiales (10-20% des cas) du cancer colorectal.
Trois mécanismes moléculaires de modifications du génome ont été identifiés au cours de la cancérogenèse colorectale (Ogino et Goel, 2008) :

(1) Le premier mécanisme est l'instabilité chromosomique (CIN : Chromosomal Instability ou LOH : Loss Of Heterozygoty). Elle est caractérisée par des pertes alléliques sur le bras court des chromosomes 17 et 8, ainsi que sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22. Ces pertes alléliques sont associées à des mutations fréquentes de gènes suppresseurs de tumeurs (TP53, APC…) et participent ainsi à une inactivation bi-allélique.
Ainsi, les mutations du gène *CTNNB1* codant la protéine β-caténine et du gène suppresseur de tumeurs Adenomatous Polyposis Coli (APC) conduisent à l'activation dérégulée de la voie Wnt/β–caténine, essentielle au cours du développement embryonnaire et au contrôle de la prolifération cellulaire. L'activation permanente de la voie induit la multiplication et l'accumulation des cellules anormales, et entraine l'apparition de polypes (Huang et Du, 2008).

(2) Le deuxième mécanisme est l'instabilité microsatellitaire (MSI) avec l'altération des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (système MMR). La réplication de l'ADN est un processus propice aux erreurs qui génèrent des appariements de bases incorrects ou des boucles d'ADN (boucles d'insertion-suppression). Le système MMR est l'un des mécanismes de réparation de l'ADN qui peut réparer ces erreurs et maintenir la stabilité génomique. Il est composé d'une série de protéines : l'homologue de MutL 1 (MLH1), MutL 3 (MLH3), MutS 2 (MSH2), MutS 3 (MSH3) et MutS 6 (MSH6) ainsi que la ségrégation postméïotique *1* (PMS1) et 2 (PMS2) (Silva et al., 2009). Un défaut de ce système de réparation entraine des mutations dans les séquences nucléotidiques courtes et répétées en tandem, appelées microsatellites. Ces séquences sont dispersées dans tout le génome et sont très sensibles aux erreurs de réplications induites par les ADN polymérases (Zhang, 2008). Lorsque le système MMR est déficient (dMMR) en raison d'événements

génétiques ou épigénétiques, les tumeurs présentent un phénotype MSI (instabilité microsatellitaire).

(3) Plus récemment, un troisième mécanisme a été identifié : l'instabilité épigénétique, associé à une hyperméthylation de l'ADN au niveau de certaines régions promotrices de plusieurs gènes (CIMP : CpG Island Methylation Phenotype) induisant une inactivation transcriptionnelle de suppresseurs de tumeur. Les ilots CpG sont des régions riches en dinucléotides CpG, peu méthylées et présentes dans la région 5' d'environ 60% de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes sont impliqués dans l'apoptose, le contrôle du cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire, la réparation de l'ADN, la transduction du signal et la structure de la chromatine. Leur hyperméthylation entraine une extinction transcriptionnelle en empêchant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN compacté, provoquant aussi une inactivation des gènes suppresseur de tumeur (Merlin Jean-Louis, 2014). Les cancers colorectaux sporadiques sont causés majoritairement par la suppression de l'expression MLH1 en raison de l'hyperméthylation de son promoteur (Ogino et Goel, 2008). L'inactivation de MSH2 et MSH6 est plus rare (5% et 1%).

Malgré cette hétérogénéité moléculaire, les conséquences en termes d'altération des voies de signalisation sont communes. Les principales voies de signalisation impliquées dans la prolifération tumorale des cellules du cancer colique sont les voies RAS/RAF/MAPKinase et PI3K/AKT.

Des mutations de l'oncogène KRAS (Benson, 2007) ou des gènes tels que *BRAF* et *PIK3CA* (Velho et al., 2008) impliqués dans la voie de signalisation EGFR ont également été identifiées. Une mutation activatrice d'un de ces gènes peut entrainer une activation constitutive de la voie de signalisation correspondante avec pour conséquence l'apparition d'une prolifération cellulaire incontrôlée, d'une inhibition de l'apoptose et/ou d'une activité pro-angiogénique.

2. Diagnostic clinique du cancer colorectal

2.1. Signes et examens cliniques

Les signes cliniques peuvent associer des douleurs abdominales, des troubles du transit, des rectorragies pour le cancer du rectum, des complications telles qu'une occlusion ou une perforation tumorale aboutissant à un tableau de péritonite.

La coloscopie ou la rectoscopie sont les examens de référence pour établir le diagnostic de la lésion, évaluer la dangerosité et rechercher d'éventuelles lésions associées. L'ablation totale ou un prélèvement biopsique de la lésion sont alors pratiqués pour une analyse histologique. Une fois le diagnostic établi, il est nécessaire d'évaluer l'extension tumorale. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est un examen pratiqué pour explorer l'étendue locale et à distance d'un cancer colorectal. Une écho-endoscopie ou un toucher rectal sont également pratiqués dans les tumeurs rectales afin d'évaluer leur distance par rapport au sphincter, l'extension en profondeur de la tumeur, et la présence d'adénopathies. Un PET-scan peut s'avérer nécessaire en cas de cancer métastatique (HAS, 2012).

Un autre examen clinique peut être prescrit dans le cadre du bilan d'extension, le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). L'ACE est un biomarqueur qui, chez l'adulte, est synthétisé principalement dans certaines portions du tube digestif tels que la langue, l'œsophage distal, l'estomac, l'intestin grêle. Il n'est présent qu'au pôle apical des cellules épithéliales du côlon et du rectum. Le gène ACE est surexprimé dans le cancer colorectal. Le gradient de sécrétion vers le pôle apical est perturbé et l'antigène carcino-embryonnaire est exprimé sur toute la surface de la cellule ainsi que dans l'espace intercellulaire (Jothy, Yuan, et Shirota, 1993). Ainsi, un taux anormalement élevé d'ACE dans le sang peut être corrélé à la présence d'une tumeur.

2.2. Classification anatomopathologique

Trois systèmes différents ont été utilisés pour classer le cancer colorectal. Les plus anciens sont les systèmes de Dukes et d'Astle-Coller. Le plus récent, le système de classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) est un système international qui a été proposé pour la première fois par le chirurgien français Pierre Denoix de l'Institut Gustave-Roussy entre 1943 et 1952.

Aujourd'hui la 8ème édition de cette classification, publiée en janvier 2017 (Meyer et al., 2017), est la plus détaillée et recommandée par « l'American Joint Committee on Cancer » (AJCC) et « l'International Association of Cancer » (UICC) pour orienter les décisions des traitements.
Cette classification (Annexe 1) permet de déterminer à l'aide d'un examen microscopique de la tumeur réséquée, la propagation du cancer au niveau du côlon ou du rectum. Le stade d'un cancer est évalué selon trois critères appelés T, N et M. Le T (Tumeur) fait référence à la profondeur à laquelle la tumeur a pénétré la paroi de l'intestin. La taille réelle de la tumeur est beaucoup moins importante que la profondeur de pénétration de la tumeur à travers la paroi intestinale. Le N (Node) pour ganglions, détermine le nombre de ganglions envahis. Le M (Métastase) détermine l'extension du cancer à d'autres organes, essentiellement le foie et les poumons pour le cancer colorectal.
Cette classification est regroupée en quatre stades histopronostiques. Le stade I correspond à un cancer précoce qui a pénétré une partie seulement de la paroi intestinale et ne s'est pas propagé vers les ganglions lymphatiques (T1-2, N0). Au stade II, le cancer a pénétré la plupart ou la totalité de la paroi sans propagation du cancer vers les ganglions lymphatiques (T3-4, N0). Le stade III est de n'importe quelle profondeur d'extension de la tumeur avec une propagation aux ganglions lymphatiques (T1-4, N1-2). L'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandé par l'UICC et l'AJCC pour établir le statut N. Le stade IV correspond à la propagation de cellules tumorales à des organes éloignés (Tx, Nx, M1) (Figure 2).

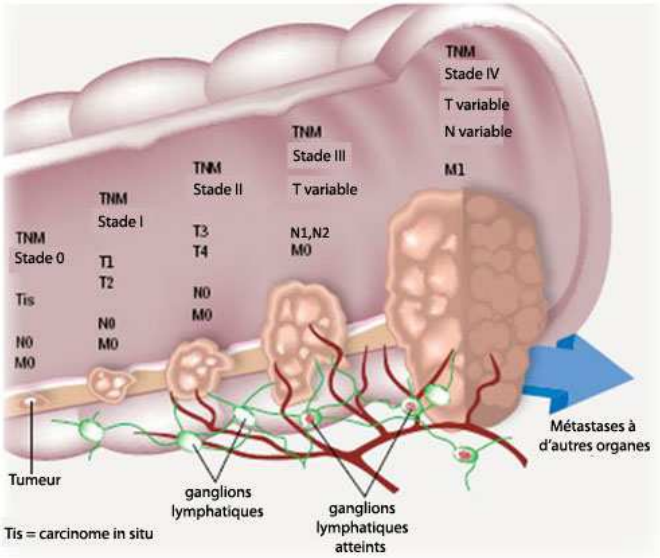


Figure 2. Classification TNM des cancers colorectaux et progression tumorale (Association canadienne du cancer colorectal)

Dans le cancer du rectum, des paramètres descriptifs additionnels peuvent venir compléter la classification TNM. La classification TNM clinique (cTNM) est déterminée par imagerie avant le traitement. Une autre classification, nommée ycTNM, peut également être établie par imagerie après un premier traitement néoadjuvant réalisé avant la chirurgie. Elle indique alors la réponse au traitement néoadjuvant. La classification TNM pathologique (pTNM) décrite précédemment, se base sur l'examen microscopique de la tumeur réséquée par chirurgie. Une classification de la régression tumorale (TRG) peut être également déterminée pour évaluer la réponse thérapeutique. Divers systèmes de classification ont été proposés, les plus utilisés étant ceux de Ryan, Dworak, et Mandard. Les systèmes TRG de Mandard et de Dworak sont basés sur l'importance de la tumeur résiduelle et la fibrose allant de Dvorak1 (ou TRG1) indiquant la présence de la masse tumorale et de fibrose à Dvorak4 (ou TRG4) se traduisant par l'absence de cellules tumorales après traitement (Kim et al., 2016) (Figure 3).

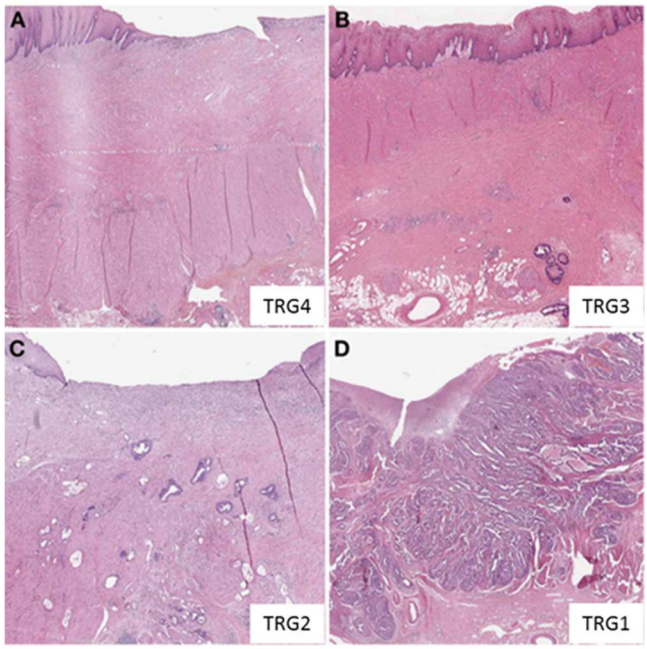


Figure 3. Exemple de régression tumorale selon la classification de Dworak. (A) TRG4 régression complète. (B) TRG3 < 10 % de tumeur résiduelle. (C) TRG2 : 10-50 % de tumeur résiduelle. (D) TRG 0-1 : > 50 % de tumeur résiduelle (Thies et Langer 2013).

2.3. Biomarqueurs génétiques et moléculaires

Dans le cancer colorectal, les biomarqueurs les plus étudiés sont KRAS, BRAF, PIK3CA, APC, CTNNB1 (β-caténine), impliqués dans les voies de signalisation de prolifération cellulaire, ainsi

que des molécules impliquées dans le cycle cellulaire telle que p53 ou l'ACE (Locker et al., 2006). On peut également ajouter l'évaluation de l'expression des protéines du système MMR par immunohistochimie (analyse des quatre protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) permet de détecter une atteinte au système MMR. Elle a l'avantage de cibler la protéine défectueuse et d'orienter la recherche des mutations constitutionnelles. L'approche génomique s'est révélée pertinente en pratique clinique pour prédire la réponse ou la résistance à des thérapies conventionnelles ou ciblées. De plus, l'analyse de biomarqueurs génétiques tumoraux spécifiques permet de guider la stratégie thérapeutique dans les cancers colorectaux (Rosine Guimbaud, 2014). Le ciblage des anti-EGFR dans le CCR métastatique a connu une nouvelle avancée significative avec la validation de la valeur prédictive d'autres mutations situées sur les gènes KRAS et NRAS. En effet, des travaux récents ont permis de montrer que la présence de mutations KRAS était également prédictive de l'inefficacité du traitement anti-EGFR (Heinemann J., 2013). Des mutations somatiques ont été identifiées sur les gènes codant certains partenaires de ces voies de signalisation, avec une fréquence relativement importante dans les cancers colorectaux. C'est le cas pour le gène codant la sous−unité catalytique de la PI3K (PIK3CA), muté dans 32 % des cas, et les gènes codant la protéine BRAF et la protéine K−RAS, mutés respectivement dans 15 % et 40 % des cancers colorectaux. Ces mutations sont des mutations activatrices, responsables d'une activation des voies de signalisation en aval de l'EGFR. Cette activation acquise des voies de signalisation intracellulaire les rend totalement indépendante de la fixation du ligand au récepteur (Lièvre et al., 2006).

Dans les cancers colorectaux (CRC) sporadiques, le système MMR déficient (MSI+) est plus souvent impliqué dans les cancers localisés (stade II : 20%, stade III : 12%) que dans les cas métastatiques (4%). Il se retrouve également dans la forme familiale héréditaire : le syndrome de Lynch, appelé aussi cancer colorectal sans polypose héréditaire (HNPCC). Le développement de ce syndrome implique une perte de l'expression de la protéine MLH1 et/ou MSH2 du système MMR. Les patients sont diagnostiqués à un âge précoce et présentent un risque élevé de cancers variés tels que le cancer de l'estomac, le cancer des ovaires, le cancer des voies urinaires, le cancer de l'intestin grêle ou de la prostate.

Des recommandations ont été mises en place pour identifier les personnes à risque en testant le statut MSI des tumeurs et en recherchant une déficience du système MMR. Ainsi, le

consensus de Bethesda en 1997 a proposé un groupe de 5 microsatellites pour étudier l'instabilité microsatellitaire : 2 marqueurs mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et 3 marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250) (Boland et al., 1998). La mise en évidence d'un phénotype MSI (dMMR) renforce la présomption clinique du syndrome de Lynch et constitue une indication de consultation de génétique oncologique en vue de la recherche d'une mutation constitutionnelle des gènes du système MMR. L'absence d'instabilité des microsatellites permet au contraire d'exclure le diagnostic.

Le besoin de biomarqueur est devenu nécessaire pour mieux cibler le choix du traitement, pronostiquer la réponse au traitement et à la survie du patient et ne cesse d'être recherché et améliorer. Récemment, un consortium international de 7 équipes de recherche a publié une classification des cancers colorectaux (CCR) basée sur les données d'expression des gènes (Kawakami H et al., 2016). A partir de l'analyse des données de plus de 4000 échantillons tumoraux, le travail mené a permis de former un consensus sur l'existence de 4 sous-types moléculaires de cancers colorectaux, caractérisés sur le plan clinique et moléculaire :

(1) Le type « MSI immune » (14% des cas) se définit par des tumeurs « hypermutées », dont la majorité présente de l'instabilité microsatellitaire (MSI) et une forte réaction immunitaire.

(2) Le type « Canonique » (37% des cas) se définit par des tumeurs présentant de l'instabilité chromosomique et des mutations des gènes *APC* et *TP53.*

(3) Le type « Métabolique » (13% des cas) se caractérise par des tumeurs dont la grande majorité présente une mutation pour l'oncogène *KRAS* et une surexpression des voies métaboliques.

(4) Le type « Mésenchymateux » (23% des cas) se catégorise comme un groupe de mauvais pronostic. Les tumeurs montrent une forte angiogenèse, une forte infiltration par le stroma et une activation du facteur de croissance TGF-β.

Malgré les progrès dans le profilage moléculaire des CRC, les progrès dans l'identification des marqueurs prédictifs au traitement au-delà du statut de RAS et du statut MSI, restent limités, avec un excellent exemple de manque de biomarqueurs prédictifs pour les médicaments anti-angiogenèse. Les CRC sont des tumeurs moléculairement hétérogènes et restent difficiles à catégoriser. De même que l'étude des biomarqueurs moléculaires nécessite une normalisation, une reproductibilité et une interprétation utilisable dans le cadre clinique.

Une étude plus approfondie pour établir la cohérence de ces signatures et effectuer une validation externe a donc été suggérée (Kawakami H et al., 2016).

3. Traitements utilisés en clinique et leurs effets indésirables

3.1. La chirurgie

La chirurgie représente le principal traitement du cancer colorectal. Pour le cancer du côlon, l'intervention consiste en l'ablation du segment de côlon concerné. La chirurgie seule est le traitement de référence pour les stades 0, I et II lorsqu'il s'agit d'un cancer du côlon en l'absence de facteurs de mauvais pronostics.

S'il s'agit d'un cancer rectal, le chirurgien réalise l'ablation du rectum en préservant si possible le sphincter. L'ablation du méso-rectum, zone graisseuse située autour du rectum qui contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et les nerfs du rectum diminue le risque de rechute. Dans certains cas, une stomie peut être nécessaire. Il s'agit d'une ouverture réalisée à la peau par le chirurgien au niveau du ventre pour permettre l'évacuation des selles vers une poche située à l'extérieur du corps.

3.2. La radiothérapie

La radiothérapie préopératoire éventuellement associée à la chimiothérapie est proposée chez les patients atteints d'un cancer des 2/3 inférieurs (sous-péritonéaux) du rectum de stade II et III. Elle diminue le risque de récidive locale. La dose nécessaire (45 à 50,4 Grays, à raison de 1,8 à 2 Grays par séance en 5 à 6 fois) est administrée sur les zones à traiter en épargnant les tissus sains environnants. L'intervention chirurgicale a lieu 4 à 6 semaines après la dernière séance de radiothérapie.

3.3. La chimiothérapie néoadjuvante et adjuvante

La chimiothérapie complète la chirurgie pour les cancers colorectaux. Ce traitement peut avoir lieu avant (chimiothérapie néoadjuvante) pour les cancers du rectum, le plus souvent associée à la radiothérapie, ou après chirurgie (chimiothérapie adjuvante) pour les cancers de stade II

associés aux marqueurs de mauvais pronostic (tumeur T4, occlusion ou perforation, tumeur peu différenciée, emboles vasculaires ou moins de 10 ganglions examinés) et les cancers de stades III et IV. Il existe différents protocoles de chimiothérapie selon la gravité du cancer. La principale chimiothérapie utilisée est le 5-fluorouracil (5-FU). Cette molécule est un analogue de l'uracile. Elle agit en s'incorporant à l'ADN et l'ARN, et inhibe l'enzyme thymidylate synthase qui en retour inhibe la synthèse de la thymidine à partir de l'uracile. En présence de métastases, la chimiothérapie actuelle associe le 5-FU à d'autres molécules telles que l'acide folinique (FA ou Leucovorine, LV) et l'oxaliplatine (FOLFOX). D'autres protocoles peuvent être proposés telle que l'association du 5FU/LV et l'irinotécan (FOLFIRI).

Le phénotype MSI des tumeurs coliques est un marqueur moléculaire pronostique qui semble prédire l'absence d'efficacité de la chimiothérapie adjuvante par 5-FU seul. Les premières données cliniques suggèrent que l'adjonction d'oxaliplatine à un traitement par 5-FU pourrait rétablir le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante pour les patients avec un cancer du côlon MSI mais ceci reste à confirmer. Parmi les patients avec un cancer du côlon de stade II présentant des facteurs de haut risque de récidive avec une tumeur exprimant un statut MSS pourraient être traités par 5-FU seul ou FOLFOX. En revanche, il n'existe pas de consensus pour la prise en charge des patients opérés d'une tumeur MSI de stade II avec des facteurs de haut risque de récidive (Taïeb J. et al., 2011).

3.4. Thérapies ciblées

Il peut également être proposé aux patients atteints de cancer colorectal métastasique de participer à un essai thérapeutique avec une association de chimiothérapies et/ou de thérapies ciblées (Catenacci et al., 2011).

Une sur-activation de la voie de l'EGFR est impliquée dans un grand nombre de CCR et le blocage de cette voie est devenu une arme thérapeutique ciblée efficace.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette sur-activation : essentiellement une augmentation de l'expression des récepteurs à la surface de la cellule (30 à 80 % des cas) et/ou une augmentation de la quantité de ligand, et certainement beaucoup moins fréquemment au cours des CCR que d'autres types de cancer, une activation constitutive du récepteur ou des voies *RAS / RAF / MEK / MAPK* ou *PI3K / AKT*. L'efficacité thérapeutique du blocage de la voie EGF a mené, depuis 2004, à l'autorisation de mise sur le marché de deux anticorps

monoclonaux ciblant l'EGF-R dans la prise en charge des CCR : le cetuximab (IgG1 chimérique) et le panitumumab (IgG2 humain). Tous deux agissent comme des antagonistes. Ils sont dirigés contre le domaine extracellulaire de liaison de l'EGF-R et entrent en compétition avec le ligand.
Le développement de ces thérapies ciblées a permis d'améliorer la survie des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Cependant, ces approches ne permettent pas d'obtenir une réponse tumorale chez tous les patients. De plus, elles sont associées à une toxicité propre et à une augmentation importante des coûts de traitement.

Les thérapies ciblées anti-BRAF (vemurafenib, dabrafenib…), utilisées en monothérapie au cours d'études de phase précoce, ont donné jusqu'à présent des résultats assez décevants dans le traitement des CCR avec mutation BRAF. Cependant, la connaissance de ce statut mutationnel peut influencer la prise en charge en incitant à un traitement de chimiothérapie intensifiée dès la première ligne, ceci compte tenu de l'agressivité de la maladie, et parfois à privilégier une trithérapie de type FOLFOXIRI (Loupakis et al., 2014).

3.5. Effets indésirables

Ces différents traitements, agressifs pour l'organisme sont susceptibles d'affecter la qualité de vie des patients. Lors de la chirurgie rectale, une colostomie définitive peut être nécessaire, en particulier s'il faut enlever le sphincter anal. Les selles sont donc définitivement recueillies au niveau de l'abdomen, à travers la stomie. Les stomies n'entraînent généralement pas de complications mais peuvent impliquer un désagrément dans le quotidien du patient. La résection partielle ou totale de l'ampoule rectale a pour conséquence une altération de la fonction ano-rectale avec un risque d'incontinence.
La toxicité aiguë liée à la radiothérapie peut avoir des conséquences qui se font ressentir durant les quelques semaines après le traitement. Des diarrhées ou douleurs abdominales peuvent survenir ainsi que des pollakiuries, des brûlures mictionnelles ou des épidermites. Une toxicité tardive peut également regrouper des effets secondaires qui apparaîtront 6 mois après la fin de l'irradiation. Ils sont rares, mais souvent irréversibles. Une inflammation de l'intestin grêle peut se produire de façon récurrente et engendrer une occlusion intestinale.

Quant à la chimiothérapie, elle peut avoir des effets indésirables hématologiques (neutropénie, thrombopénie, anémie) causant des nausées, des vomissements, des diarrhées, des stomatites. Des traitements préventifs peuvent être prescrits dès la première cure en fonction des molécules de chimiothérapie données. Une hospitalisation en urgence est envisagée en cas de diarrhée persistante ou associée à d'autres symptômes tels que la fièvre, la neutropénie ou des vomissements.

4. Evaluation pronostique actuelle dans le cancer colorectal

A l'heure actuelle, le facteur pronostique principal qui permet d'identifier les patients à risque de rechute dans le cancer colorectal après une intervention chirurgicale de la maladie localisée s'appuie sur la classification AJCC-UICC TNM.

Le stade I du cancer colorectal est généralement guéri par chirurgie seule et suffit à établir un bon pronostic de survie (80% de survie). Dans le stade III, environ 35% des patients vont rechuter, malgré la chimiothérapie adjuvante, alors que 40 à 50% des patients pourraient être guéris par la chirurgie seule. Ainsi, dans le cadre du stade III, les patients sont traités par chimiothérapie, bien que la majorité, soit ne nécessiterait pas de traitement adjuvant, soit n'en bénéficierait pas. Le rôle de la chimiothérapie adjuvante est encore plus difficile à définir dans le stade II du cancer colorectal où 60 à 70% des patients de stade II sont guéris uniquement par chirurgie. Parmi les patients traités par chimiothérapie adjuvante, 30% rechutent malgré ce traitement (Catenacci et al., 2011) (Figure 4).

D'autres marqueurs génétiques et moléculaires associés à la tumeur ont été analysés (CEA, p53, K-Ras, B-Raf, MSI) (Locker et al., 2006) (Rosine Guimbaud, 2014) (Ribic et al., 2003). Le statut MSI a été évalué comme un facteur de bon pronostic amélioré chez les patients atteints de cancer colorectal de stade II ou III avec un phénotype tumoral MSI-H. Il a été également évalué comme un marqueur pronostique indépendant pour les patients de stade II (Ribic et al., 2003).

Toutefois, aucun de ces marqueurs ne présente à lui seul, une valeur pronostique suffisante (et indépendante du TNM) pour justifier une modification de la prise en charge des patients (Locker et al., 2006).

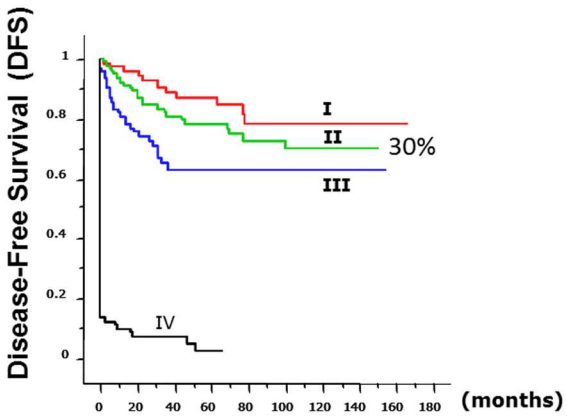


Figure 4. Courbe de survie sans récidive (DFS) catégorisée par stade de la classification TNM. Cohorte d'étude de l'HEGP avec n=406 patients. 20% des patients de stade I récidivent (ligne rouge) ; 30% des patients de stades II récidivent (ligne verte) ; 35-40% des patients de stades III récidivent (ligne bleue), et 95% des patents de stade IV récidivent (ligne noire) selon la classification TNM.

5. Nouvel acteur impliqué dans l'évolution du cancer : le microenvironnement tumoral

5.1. Du paradigme centro-cellulaire à l'intégration du microenvironnement tumoral

Au XXème siècle, la compréhension de mécanismes d'apparition du cancer s'est tout d'abord centrée sur les anomalies portées par les cellules tumorales. Le cancer se définit par le développement de clones cellulaires sélectionnés au terme de processus multi-étapes où des clones porteurs de mutations, de plus en plus agressifs, font émerger un phénotype tumoral. La cellule devenue cancéreuse devient autonome et évolue indépendamment de son microenvironnement. Les altérations génétiques dictent alors l'évolution clinique du cancer, accompagnant la progression tumorale (Vogelstein et al., 1988). Les progrès réalisés dans la connaissance de la biologie moléculaire du cancer ont progressivement mis en évidence les limites de l'approche génomique du paradigme « centro-cellulaire ». L'extrême complexité du génome, la diversité et le nombre d'altérations génomiques observés dans les cellules cancéreuses et l'instabilité génomique associée ont empêché toute vision structurante du cancer (Folkman, Hahnfeldt, et Hlatky., 2000). Dans une étude de carcinome colorectal, près de 11000 altérations génomiques par cellule ont été trouvées (Stoler et al., 1999). Les

altérations génomiques du cancer apparaissaient trop nombreuses pour servir de cibles thérapeutiques « autonomes ».

L'accent est alors davantage mis sur d'autres aspects du développement de la tumeur tels que l'angiogenèse et les contraintes métaboliques. L'épigénétique, les influences cellulaires et extracellulaires sont également identifiés comme des éléments clés de la progression tumorale (Baylin et Herman, 2000 ; Moinfar et al., 2000). Ces observations ont amené Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2000) à redéfinir le paradigme « centro-cellulaire » en 2000. Six caractéristiques phénotypiques pouvant s'exprimer indépendamment les unes des autres sont ajoutées aux modifications génomiques de la cellule cancéreuse : (1) l'échappement à l'apoptose ; (2) l'autosuffisance pour les signaux de croissance ; (3) l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs ; (4) la stimulation de l'angiogenèse ; (5) le potentiel illimité de réplication ; (6) la capacité d'évasion tissulaire et de métastases.

En 2011, deux nouvelles caractéristiques sont ajoutées aux précédentes : la reprogrammation du métabolisme énergétique (effet Warburg) et l'évasion à la surveillance immunitaire (Hanahan et Weinberg, 2011).

En outre, il est apparu que l'acquisition de ces caractéristiques résultait également d'un dialogue bidirectionnel entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement. Les cellules vasculaires, neuro-endocrines, stromales, épithéliales et immunitaires qui composent le microenvironnement forment un ensemble hétérogène, dynamique et communicant (Hanahan et Weinberg, 2011). La vision centro-cellulaire du cancer défini au XXème siècle intègre désormais l'environnement comme véritable acteur dans la survenue, de l'évolution et de la définition d'un cancer (Sonnenschein et Soto, 2011).

5.2. Principes de l'Immunosurveillance antitumorale, intérêt et limites

5.2.1. La théorie de l'immunosurveillance

Dans la vision centro-cellulaire de Hanahan et Weinberg, le cancer implique des interactions entre la tumeur et les mécanismes de défenses de l'hôte, le système immunitaire.

Le rôle du système immunitaire dans l'évolution du cancer a été envisagé bien avant ce changement de paradigme. Ce concept apparait à la fin du XIXe siècle, en même temps que la découverte des facteurs génétiques du génome (Prendergast, 2012), notamment à partir des observations réalisées de William B. Cooley. En effet, ce dernier a constaté, chez un patient,

la régression spontanée d'un sarcome de stade avancé lors d'une surinfection post-opératoire par un streptocoque responsable d'érésipèle. Il émit alors l'hypothèse selon laquelle la réaction inflammatoire secondaire à une surinfection pouvait favoriser le contrôle de la tumeur. De ce fait, il mit au point une stratégie visant à injecter chez les patients un mélange inactivé de bactéries Gram positives (Streptococcus pyogenes) et Gram négatives (Serratia marcescens), et obtint des régressions tumorales après des inoculations répétées.

C'est en 1909 que Paul Ehrlich évoqua la capacité du système immunitaire à reconnaître et éradiquer les cellules tumorales (Ehrlich P.,1909). Il fallut ensuite attendre les années 1970 et une meilleure compréhension de l'immunologie, de la transplantation, de l'immunobiologie des tumeurs et de l'immunogénétique pour que soit formulée la théorie de l'immunosurveillance du cancer par Sir Frank Macfarlane Burnet et Lewis Thomas (Burnet, 1970) (Thomas L.,1982) . Ce concept reposait initialement sur des données expérimentales montrant la possibilité d'immuniser des souris appartenant à des lignées congéniques contre des tumeurs provenant de souris appartenant à ces mêmes lignés (Old et Boyse, 1964). L'hypothèse émise était la détection et la destruction par le système immunitaire des cellules tumorales dès leur apparition avant même toute manifestation pathologique. Ce dernier assurait ainsi le rejet de nombreuses tumeurs naissantes. Seules les cellules échappant à ce processus produisaient des cancers cliniquement détectables.

De nombreuses expérimentations ont tenté de valider cette hypothèse. Mais, à la fin des années 70, les travaux d'Osias Stutman mirent en échec le concept de l'immunosurveillance en montrant que l'incidence des tumeurs spontanées ou chimiquement induites n'est pas significativement augmentée chez les souris immunodéficientes de type Nude (Stutman, 1974). Ces souris dépourvues de thymus, site nécessaire à la différenciation des lymphocytes T, était le meilleur modèle immunodéficient disponible à cette époque (Stutman, 1979). Ces observations, confirmées par d'autres équipes, ont conduit à récuser pendant plusieurs décennies le concept même d'immunosurveillance (Dunn et al., 2002). Il a fallu attendre l'avènement de souris génétiquement invalidées pour des gènes associés à la réponse immunitaire innée ou adaptative, dans les années 1990, pour démontrer le rôle du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale et valider le concept d'immunosurveillance énoncé 30 ans auparavant.

Il existe également chez l'homme de nombreuses preuves attestant d'une réponse immunitaire naturelle contre le cancer et de son rôle dans le contrôle du processus tumoral. Ces données ont été obtenues grâce à l'amélioration de nos connaissances sur la diversité phénotypique et fonctionnelle des sous-populations lymphocytaires, et à l'émergence de nouvelles technologies facilitant l'étude de ces populations au niveau du site tumoral.

Ainsi, dans les années 1990, le groupe de Thierry Boon (Boon et van der Bruggen 1996) a identifié des antigènes de tumeurs reconnus par les lymphocytes T CD8 intra-tumoraux dans un contexte de mélanome (Gaugler et al., 1994). Depuis lors, un grand nombre d'antigènes tumoraux a été mis en évidence (Rosenberg, 1999).

Par ailleurs, de nombreuses situations d'immunodéficience humaine sont associées à une prédisposition pour le développement de cancers. Chez les patients transplantés et traités par immunosuppresseurs, une augmentation de l'incidence des cancers induits ou non par des virus est observée (Hollenbeak et al., 2005). Les patients porteurs d'un syndrome de Chediak-Higashi, caractérisé par un dysfonctionnement des NK, ont un risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains (Kobayashi et al., 1985). Des preuves directes d'une immunosurveillance existent également chez les patients porteurs de gammapathie monoclonale bénigne, état pouvant précéder l'apparition d'un authentique myélome multiple. Chez ces patients, il est en effet possible de mettre en évidence une réponse T vis-à-vis des clones des lymphocytes B, qui n'est plus retrouvée chez ceux ayant évolué vers un myélome (Dhodapkar et al., 2003).

Dans de nombreux types de cancers, la présence d'un infiltrat tumoral lymphocytaire T détecté dans la tumeur et sa périphérie est fréquemment associée à un meilleur pronostic des patients (Fridman et al., 2012). Ces cellules sont habituellement considérées comme le témoin d'une tentative d'élimination des cellules anormales.

5.2.2. L'Immunoediting : la théorie des trois E

Au début des années 2000, Dunn et Schreiber propose de réviser la théorie de l'immunosurveillance et de l'intégrer dans une théorie plus large dénommée « immunoediting ». Cette théorie prend en compte les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire, chacune influençant et modifiant le comportement de l'autre (Dunn et al., 2002). Trois étapes chronologiquement distinctes sont individualisées : la phase

d'élimination, la phase d'équilibre et la phase d'échappement (Dunn et al., 2002) (Dunn, Old, et Schreiber, 2004) (Figure 5).

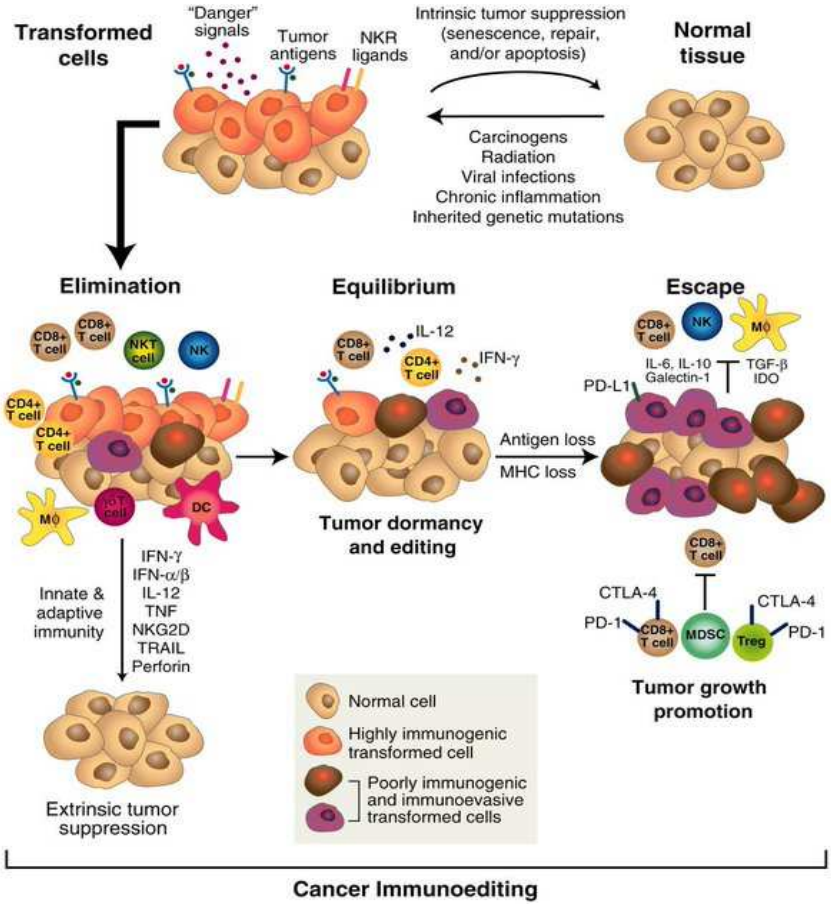


Figure 5. Schéma des trois E de l'Immunoediting. Elimination, équilibre et échappement. Description schématique des principales cellules immunitaires intervenant pour chaque étape (Schreiber, Old, et Smyth, 2011).

5.2.2.1. La phase d'élimination

La phase d'élimination reprend le concept original de la théorie de l'immunosurveillance. Durant cette première étape, lorsque qu'une tumeur atteint une certaine taille, elle commence à envahir le milieu environnant, requiert une vascularisation et produit des molécules stromagéniques et angiogéniques. Le remodelage du stroma qui en résulte induit la production de signaux inflammatoires, médiés par le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et le MIP-3α (Macrophage Inflammatory Protein-3α) et par le recrutement de cellules immunitaires innées. Les chimiokines ou cytokines produites par les cellules de la réponse innée (CXCL8, CXCL10, CCL2,…) recrutent un nombre croissant de

cellules de l'immunité (Luster et Leder, 1993) (Qin et Blankenstein, 2000). Les débris des cellules tumorales mortes à la suite de cette première attaque sont phagocytés par des cellules dendritiques immatures. En réponse à la capture de ces antigènes (Ag), celles-ci migrent vers les ganglions lymphatiques pour finir leur maturation et induire l'activation de lymphocytes T CD4+ de type Th1 spécifiques de tumeur. Les cellules Th1 facilitent le développement des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (CLT CD8+) spécifiques de la tumeur, sensibilisés par la présentation croisée de peptides tumoraux antigéniques sur les molécules de CMH de classe I des cellules dendritiques. L'orientation Th2 des lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) favorise l'activation des lymphocytes B et la production d'anticorps. Les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux participent à la mise à mort des cellules tumorales. Les lymphocytes T CD4+ produisent de l'IL-2, et aident à maintenir la fonction et la viabilité des lymphocytes T CD8+. Dans un contexte d'orientation Th1, les lymphocytes T CD8 reconnaissent efficacement leurs cibles et induisent la mort des cellules tumorales par la production d'effecteurs cytotoxiques (perforine, granzyme, …), l'expression du ligand de Fas (CD95L/CD178) et/ou par la production de cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNFα).

A la fin de cette étape, soit l'élimination des cellules tumorales est complète, soit certaines cellules tumorales n'ont pas pu être détruites. On entre alors dans la phase d'équilibre.

5.2.2.2. La phase d'équilibre

La phase d'équilibre est probablement la plus longue des trois phases. Chez l'homme, il a été estimé qu'un intervalle d'une vingtaine d'années pouvait exister entre l'exposition initiale à un carcinogène et la détection clinique d'une tumeur (Loeb et Anderson, 2003). Durant cette phase, le système immunitaire de l'hôte et les quelques variants tumoraux ayant survécu à la phase d'élimination entrent dans un équilibre dynamique au cours duquel la pression de sélection exercée sur la tumeur est associée à la destruction de nombreux variants et à l'apparition de nouveaux clones, plus résistants aux attaques du système immunitaire. L'hétérogénéité et l'instabilité génétique sont les principales forces qui permettent aux cellules tumorales de survivre (L. A. Loeb, 1991) (Loeb et Anderson, 2003). Les lymphocytes T et l'IFNγ contribueraient de façon majeure à la pression de sélection exercée sur ces cellules.

Des trois phases de la théorie de l'immunoediting, la phase d'équilibre est la moins connue. Une preuve de son existence a été apportée par l'équipe de RD Schreiber en 2007 (Koebel et al., 2007). Administré à une faible dose à des souris, le 3'methylcholanthrène (MCA) a été responsable de l'apparition de sarcomes dans une partie seulement des souris. Après injection d'anticorps éliminant les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ou neutralisant l'IFNγ et l'IL12 aux souris n'ayant pas développé de tumeur deux cents jours après l'injection du carcinogène, Schreiber et ses collaborateurs ont observé l'apparition de sarcomes dans près de la moitié des souris. En revanche, les souris traitées avec un anticorps anti-NK1.1, éliminant les cellules NK, ne développent pas de tumeur. Les cellules tumorales maintenues en état d'équilibre par le système immunitaire présentent une forte immunogénicité alors que les cellules naturellement issues de la phase d'équilibre sont très peu immunogènes. L'absence d'implication de la réponse immunitaire innée dans la phase d'équilibre permettrait de la distinguer de la phase d'élimination impliquant à la fois l'immunité innée et adaptative (Koebel et al., 2007).

Si la phase d'équilibre devait se rompre, les cellules tumorales échapperaient au système immunitaire et s'engageraient dans la phase finale du processus d'immunoediting, la phase d'échappement.

5.2.2.3. La phase d'échappement

La phase d'échappement à l'immunosurveillance d'une tumeur résulte de modifications des cellules cancéreuses ou du système immunitaire qui les contrôle. La survie ou la suppression des cellules cancéreuses dépend de l'expression des antigènes tumoraux et des molécules du CMH qui permettent la présentation de ces antigènes aux lymphocytes T. mais aussi des signaux de stress et de danger, ainsi que de l'expression de molécules favorisant ou bloquant leur apoptose. Certains de ces antigènes sont aussi exprimés par les cellules normales, et sont donc facilement tolérés par le système immunitaire. La stimulation prolongée des lymphocytes T provoquée par leur exposition permanente aux antigènes tumoraux peut induire par ailleurs un état de tolérance consécutif à la disparition ou à l'inactivation des lymphocytes T capables de reconnaître ces antigènes, ou à leur conversion en lymphocytes T régulateurs immunosuppresseurs (T regs) (Willimsky et Blankenstein, 2005). À la différence des cellules normales, les cellules tumorales expriment souvent le ligand PD-L1 dont

l'association avec le récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T effecteurs inhibe les fonctions de ces cellules, et notamment la production de cytokines (Blank, Gajewski, et Mackensen, 2005). Les cellules tumorales peuvent sécréter des cytokines et des facteurs comme le TGF-β et l'interleukine-10 (IL-10) qui suppriment les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T et des cellules NK. L'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance est favorisé par les cellules immunosuppressives tels que les lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Terabe et Berzofsky, 2004) et les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) (Gabrilovich et Nagaraj, 2009) induits par le TGF-β produit par les cellules tumorales elles-mêmes. Les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques sont inhibées mais aussi celles d'autres cellules intervenant dans la réponse immunitaire anti-tumorale comme les NK, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les Tregs expriment constitutivement CTLA-4, un récepteur des molécules B7 apparenté au co-récepteur CD28 mais qui inhibe la réponse lymphocytaire T au lieu de l'activer. Chez les sujets porteurs d'un cancer, l'expression de CTLA-4 peut aussi être induite sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ effecteurs et ainsi contribuer à leur anergie. Les cellules tumorales peuvent également diminuer l'expression du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK (Waldhauer et Steinle, 2008). Elles peuvent enfin exprimer l'indolamine-2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme immunosuppressive qui catabolise activement le tryptophane, un acide aminé nécessaire à la survie des lymphocytes T, et génère la kinurénine qui altère les fonctions antitumorales de ces lymphocytes (Katz, Muller, et Prendergast, 2008). Durant cette phase, la tumeur devient cliniquement détectable.

6. Rôle de l'infiltrat immunitaire dans le cancer colorectal

6.1. Infiltrat immunitaire présent dans le microenvironnement tumoral du cancer colorectal

Le cancer colorectal comme l'ensemble des tumeurs solides humaines présente un infiltrat immunitaire polymorphe, variable d'un patient à l'autre. L'ensemble des populations immunitaires peut être observé dans l'infiltrat tumoral : granulocytes, cellules NK, macrophages, mastocytes, cellules suppressives myéloïdes (MDSC), cellules dendritiques, lymphocytes B et lymphocytes T, ainsi que les populations T CD4 auxiliaires » ou « helper » (T

CD4 de type Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg), et les populations T CD8 effecteurs cytotoxiques. Plus particulièrement, il a été montré grâce à des analyses intégratives de l'ensemble des populations immunitaires infiltrant les tumeurs colorectales, la valeur pronostique des lymphocytes T cytotoxiques, Th1 (Galon et al., 2006) (Pagès et al., 2009) et des lymphocytes T folliculaire-helper (Tfh) associés aux lymphocytes B pour la survie à long-terme des patients (Bindea et al., 2013).

6.2. Valeur pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur dans le cancer colorectal

Un grand nombre de publications attestent depuis les années 1980 de la valeur pronostique favorable de la présence au site tumoral d'une forte densité en lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Dès 1986, Jass et al. démontrait qu'une forte densité lymphocytaire évaluée sur coupe histologique dans le front d'invasion de tumeurs rectales était un facteur pronostique indépendant de la classification TNM (Jass et al., 1986). En d'autres termes, la connaissance du niveau d'infiltration immunitaire permettait de préciser le pronostic des patients par-delà les critères d'extension tumorale.

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche a affirmé cette théorie en montrant dans le cancer colorectal, qu'un fort infiltrat tumoral CD8+ et CD45RO+ était corrélé à une orientation immunitaire des lymphocytes T CD4+ de type Th1 (Pagès et al., 2009), et était associé avec une incidence de la propagation de la tumeur. Dans ce contexte, les facteurs de transcription T-bet, STAT-1 et IRF1 (IFN-facteur de régulation 1) étaient mis en jeu aboutissant à la production locale d'interleukine (IL)-12, d'interféron gamma (IFN-γ) et à la présence de marqueurs d'activation et de cytotoxicité des lymphocytes T CD8 (granzymes, perforine et granulysine). Les populations immunitaires infiltrant les tumeurs, leurs densités et leurs localisations dans la tumeur et son front d'invasion influençaient fortement le devenir clinique des patients (Pagès et al., 2005) (Galon et al., 2006). De ce fait, notre équipe de recherche a analysé trois cohortes indépendantes rétrospectives de cancers colorectaux (n=609 patients) par technique d'immunohistochimie sur puce tissulaire (TMA). Une quantification des cellules immunomarquées a été réalisée par un programme d'analyse d'image dédié (SpotBrowser, Alphelys). Les travaux de notre laboratoire ont ainsi montré que la densité en lymphocytes T

CD3+, CD8+ et CD45RO+ dans la tumeur (CT) et son front d'invasion (IM) était corrélée au devenir clinique des patients, en termes de survie sans récidive (DFS) et de survie globale (OS). La prise en compte simultanée de la densité de ces cellules dans les deux régions tumorales (CT et IM) augmentait encore les différences observées entre les groupes de patients présentant une forte densité (Hi) ou une faible densité (Lo) de ces cellules dans les deux régions tumorales. Ainsi, la densité intratumorale en lymphocytes T (CD3+), en lymphocytes T mémoires (CD45RO+) et cytotoxiques (CD8+) dans les régions tumorales (CT et IM) était fortement associée au pronostic des patients présentant un cancer colorectal (Galon et al., 2006) (Pagès et al., 2009) (Figure 6). La valeur pronostique de ces paramètres immunologiques a été démontrée pour l'ensemble des patients présentant un cancer colorectal, à tous les stades de la classification histopathologique (AJCC-UICC TNM). De ce fait, elle apparait supérieure à la celle fournie par la classification AJCC-UICC TNM (Mlecnik et al., 2011). Ainsi, l'intégration d'une évaluation immunitaire dans la classification des cancers pourrait se traduire par une meilleure appréciation pronostique, mais aussi potentiellement par une meilleure prédiction de la réponse aux traitements (Galon, Pagès, Marincola, Thurin, et al., 2012).

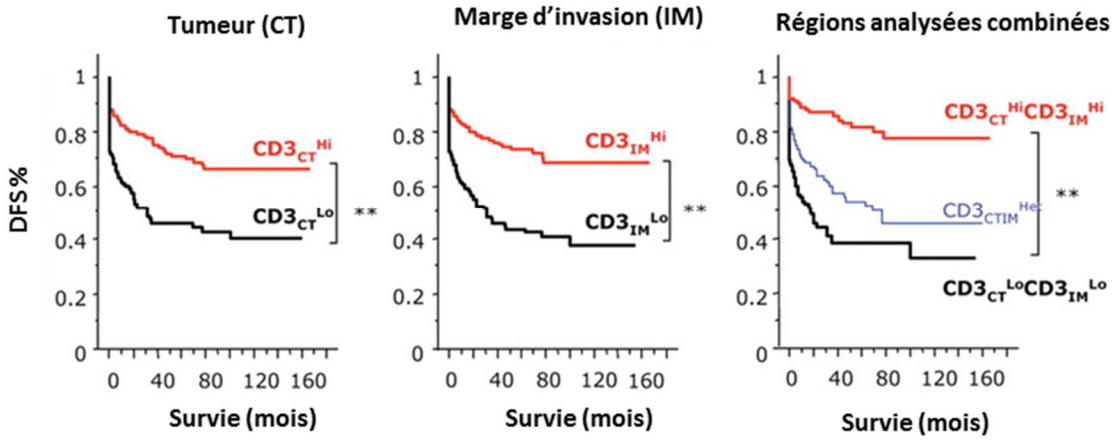


Figure 6. Analyse de survie sans récidive de patients atteints de cancer colorectal (n=415). Les courbes de Kaplan-Meier montrent le temps de survie sans récidive (DFS) selon la densité lymphocytaire CD3 dans la tumeur (CT) (graphe de gauche), sa marge d'invasion (IM) (graphe du centre), et des deux régions CT et IM associées (graphe de droite). Pour chaque région, deux groupes de patients se distinguent : les patients avec une forte densité CD3+ (Hi), et les patients avec une faible densité CD3+ (Lo). Les lignes rouges indiquent $CD3_{CT}^{Hi}$ et les lignes noires indiquent $CD3_{CT}^{Lo}$. Avec l'association des régions CT et IM (graphe de droite), la ligne rouge représente $CD3_{CT}^{HI}CD3_{IM}^{HI}$, la ligne noire représente $CD3_{CT}^{Lo}CD3_{IM}^{Lo}$. La ligne bleue représente les densités CD3+ intermédiaires dans les deux régions CT et IM avec $CD3_{CT}^{Lo}$ associé à $CD3_{IM}^{Hi}$ ou $CD3_{CT}^{Hi}$ associé à $CD3_{IM}^{Lo}$ ($CD3_{CTIM}^{Het}$). Galon. J et al, 2006.

6.3. Nouvelles immunothérapies anti-PD-1/PDL-1 et anti-CTLA-4 : l'infiltrat immunitaire, un biomarqueur prédictif de la réponse au traitement ?

L'évolution récente de la bio-ingénierie et la découverte de molécules de costimulation activatrice ou inhibitrice (MCI) ont abouti au développement d'une nouvelle classe thérapeutique qui a montré son efficacité dans le traitement du mélanome métastasé (Hodi et al., 2010) et du cancer du poumon non à petites cellules (Brahmer et al., 2015). Ceci a permis d'aboutir à une approbation réglementaire de nouveaux médicaments, principalement, le nivolumab et le pembrolizumab (anti-PD1) ainsi que l'ipilimumab (anti-CTLA-4). L'activité de ces agents indique que le système immunitaire peut représenter une avancée thérapeutique majeure en cancérologie. Cependant un certain nombre de patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements et les effets adverses en particulier auto-immuns ne sont pas négligeables. Les données concernant les biomarqueurs prédictifs associés à la réponse aux immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 et anti-CTLA-4 sont encore peu connues et commencent à peine à être recherchées. Toutefois, il est apparu que les tumeurs présentant de forts taux de mutations, correspondaient aux tumeurs dont le taux de réponse aux anti-PD-1/PD-L1 était le plus élevé (Dong et al. 2017). Ainsi, l'expression de PD-L1 par les populations immunitaires intratumorales pourrait être un facteur prédictif de la réponse au traitement. Toutefois, la détermination du statut PD-L1 de la tumeur et de l'infiltrat se heurte à une absence de consensus international concernant la technique d'analyse (Hofman et al., 2016). Cette absence de consensus ne permet pas, à ce jour, d'atteindre une nécessaire reproductibilité et robustesse de ce test, et d'envisager une application en routine clinique.

Un autre marqueur a également été mis en avant. Il a été montré dans les mélanomes avancés, que la présence des lymphocytes T CD8 préexistant avant tous traitements immunothérapiques, et situés distinctement à la marge tumorale invasive pourraient prédire la réponse au traitement immunothérapique (Tumeh et al., 2014). Paradoxalement, les stades avancés du cancer colorectal ne semble pas répondre à l'attente de ces nouveaux traitements d'immunothérapie (Toh et al., 2016). De façon intéressante, il a été observé que seul un sous-groupe de patients présentant un défaut de réparation de l'ADN avec une instabilité microsatellite MSI+ était associé à un fort taux de mutations, et répondait au traitement par anti-PD-1 et anti-CTLA-4. Ces tumeurs étaient également associées à une forte infiltration par des lymphocytes T-CD8 (Le et al., 2015).

6.4. Activation de l'infiltrat immunitaire par la radiochimiothérapie : mort cellulaire immunogène

Il a été démontré, par ailleurs, que des agents chimiothérapeutiques tels que les anthracyclines (doxorubicine, idarubicine, mitoxantrone) et l'oxaliplatine peuvent stimuler une mort « immunogène » des cellules cancéreuses qui induisent une réponse anti-tumorale. Les effecteurs immunitaires peuvent ainsi contrôler les cellules tumorales résiduelles. La mort cellulaire immunogène, c'est-à-dire la capacité de l'hôte à déclencher une réponse immunitaire contre sa propre tumeur, a été caractérisée par l'exposition de la calréticuline à la surface de la cellule mourante, la libération de la protéine nucléaire high mobility group box 1 (HMGB1) et la sécrétion d'ATP. Cette mort immunogène permet de stimuler le système immunitaire via des récepteurs spécifiques. Les cellules dendritiques de l'hôte vont pouvoir activer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui deviennent cytotoxiques et producteurs d'IFNγ, ces deux propriétés étant corrélées à la fonte tumorale. Dans ce cas, l'effet thérapeutique observé est non seulement attribuable à l'effet cytotoxique direct de la chimiothérapie, mais aussi à l'intervention du système immunitaire de l'hôte (Kroemer et al., 2013) (Zitvogel et al., 2008).

7. Elaboration d'un test immunologique comme marqueur pronostique du cancer colorectal

Au vu de l'importance de la contexture immunitaire dans le cancer colorectal, un nouveau test appelé « Immunoscore » a été développé dans le cancer du côlon par notre équipe. Selon les travaux de notre laboratoire, l'Immunoscore a été élaboré sur la détermination de la densité intratumorale de deux couples de populations lymphocytaires : les LTCD3+, les LTCD8+ cytotoxiques et les LT mémoires (CD3/CD8, CD3/CD45RO ou CD8/CD45RO) détectés dans la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM). Un premier système de cotation a été déterminé allant de Immunoscore 0 (I0), caractérisé par une faible densité des deux types de cellules dans les deux régions ; à un Immunoscore 4 (I4), pour des tumeurs présentant une forte densité des deux populations cellulaires dans les deux régions tumorales. Afin de faciliter la translation de cette investigation immunitaire dans la pratique clinique, une plateforme

d'immunomonitoring a été mise en place à l'hôpital européen Georges-Pompidou (Paris). Il a tout d'abord fallu déterminer la combinaison d'anticorps optimale à utiliser pour le test Immunoscore. Bien que les performances analytiques en termes pronostiques, des combinaisons de marqueurs [CD3 + CD8] ou [CD8 + CD45RO] étaient équivalentes, la pratique des immunomarquages révélait plusieurs difficultés associées au marquage CD45RO : (1) un marquage non spécifique sur le tissu du côlon difficile à maîtriser, quel que soit le clone anti-CD45RO utilisé, rendait une quantification du marquage en programme d'analyse d'image aléatoire ; (2) une perte de réactivité antigénique rapide de CD45RO après réalisation de la coupe du bloc tumoral. Il a donc été décidé de privilégier la combinaison de marqueurs robustes CD3 et CD8 pour la quantification des populations immunitaires. L'abandon des TMA au profit d'immunomarquage sur coupe tissulaire était indispensable pour aboutir à une application clinique. Nous avons donc conçu et développé un module spécifique d'analyse d'image Immunoscore à partir du logiciel Developer XD (Definiens) pour la quantification des populations immunitaires CD3 et CD8 sur l'ensemble de la tumeur et de son front d'invasion.

OBJECTIFS DES ETUDES

1. Validation clinique de l'Immunoscore dans le cancer colique

1.1. Evaluation de la performance du test Immunoscore en pratique clinique

Mon premier objectif a été de faciliter l'introduction du test Immunoscore (IS) en pratique clinique en démontrant les performances intrinsèques de ce test d'analyse en termes de robustesse, de répétabilité et de reproductibilité. Basée sur une technique d'immunohistochimie à partir de coupes de bloc de tissu tumoral fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE), l'évaluation de la quantification immunitaire dans la tumeur et sa marge d'invasion tumorale est réalisée par une détection des cellules T CD3+ et TCD8+ grâce à un système d'analyse d'images.

Les différentes étapes de cette analyse sont soumises à plusieurs variables telles que l'échantillon utilisé, la qualité d'immunomarquage et les écarts réalisés par les opérateurs. Dans le cadre d'une validation et d'un rendu de résultats en pratique clinique, il est alors devenu nécessaire d'évaluer la performance de ce test.

1.2. Validation internationale du test Immunoscore dans le cancer du côlon

Mon deuxième objectif a été de valider à large échelle la méthode d'analyse du test Immunoscore sur une cohorte rétrospective de cancers du côlon de stade I/II/III selon la classification AJCC-UICC TNM, dans le cadre d'une étude internationale regroupant 14 centres dans 13 pays. Cette étude permet de valider la méthode d'analyse du test Immunoscore, et à terme, d'introduire le test Immunoscore en pratique clinique dans les laboratoires histopathologiques.

Notre unité de recherche étant le centre référent de cette étude, j'ai été impliquée dans la coordination de l'étude entre tous les centres, dans la normalisation des protocoles d'analyse entre les centres, et dans la validation des contrôles qualités de chacun des centres.

2. Evaluation de l'Immunoscore dérivé dans le cancer du rectum

2.1. Contexte clinique

Chez les patients atteints du cancer du rectum, la morbi-mortalité liée à l'acte chirurgical est importante, avec une altération de la qualité de vie. C'est pourquoi certains auteurs remettent aujourd'hui en cause la place de la chirurgie radicale chez les patients bons répondeurs à la radiochimiothérapie (RCT) (Habr-Gama et al. 2004) au regard du faible contrôle de la maladie systémique et de l'altération de la qualité de vie. L'évaluation de la réponse à la RCT est réalisée avant chirurgie par des examens d'imagerie (scanner, IRM). Suivant les résultats de l'imagerie, environ 30% des patients sont considérés en réponse clinique complète. Cette réponse clinique complète n'est cependant confirmée par l'histologie de la pièce opératoire que dans 50% des cas. Il apparait donc important d'avoir d'autres marqueurs biologiques associés à l'imagerie permettant de mieux prédire la réponse à la RCT et le pronostic de ces patients afin de proposer une stratégie de chirurgie à minima ou une surveillance simple chez les patients de bon pronostic. Pour les patients atteints de cancer du rectum et traités par radiochimiothérapie préopératoire (pRCT), l'analyse par Immunoscore est inappropriée. En effet, pour les patients répondant au traitement préopératoire, il apparait de profond changement sur la structure histologique du tissu avec une régression de la tumeur, une apparition de fibrose et de sécrétion de mucus. La délimitation de la tumeur primaire et de sa marge d'invasion est donc exclue. Une étude antérieure (Anitei et al. 2014) nous a permis de montrer que l'infiltration immunitaire mesurée dans les biopsies tumorales diagnostiques pouvait être associée à la qualité de la réponse à la radiochimiothérapie.

2.2. Objectif de l'étude

Le premier objectif de cette étude a été tout d'abord de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude antérieure décrite ci-dessus (Anitei et al. 2014), d'évaluer la qualité de l'infiltration immunitaire CD3+, CD8+ observée dans les biopsies de tumeurs à des fins diagnostiques et d'analyser la valeur pronostique associée à ce paramètre. Cette exploration immunitaire pourrait fournir un marqueur pronostique et thérapeutique de prédiction de la réponse aux traitements néoadjuvants radiochimiothérapiques. Par ailleurs, cette investigation sur biopsie

pourrait fournir un élément de gravité précoce avant toute chirurgie ouvrant la voie à de possibles traitements en situation néoadjuvante.

Le second objectif de cette troisième partie a été d'analyser la composante immunitaire afin de déterminer quel impact clinique pourrait avoir la réaction immunitaire chez des patients présentant un cancer du rectum traité par RCT. En effet, l'activation immunitaire post-radiochimiothérapique (post-RCT) est le témoin de l'apport d'une composante immunitaire dans la réponse à la RCT. Mon objectif a donc été de déterminer si la réponse immunitaire induite par la radiochimiothérapie (mort immunogène), notamment les molécules de co-stimulation inhibitrices (MCI) et leurs ligands, pourrait favoriser une association positive entre une radiochimiothérapie et un traitement d'immunothérapie.

Enfin, le troisième objectif de cette étude a consisté à évaluer l'intérêt que pourrait apporter une analyse de la réaction immunitaire naturelle afin de mieux prédire les patients qui ne vont pas récidiver, de les inclure dans une stratégie de « Watch and Wait ».

MATERIEL ET METHODES

1. Population et cohortes

1.1. Evaluation méthodologique *du test Immunoscore* : tissu et cohortes

L'évaluation méthodologique du test Immunoscore a été effectuée à partir de tissus tumoraux issus de la résection de la tumeur primaire de cancers colorectaux. Ces tissus ont été fixés au formol 10 % et inclus en paraffine (FFPE). La performance du test Immunoscore a été évaluée à partir de 3 cohortes rétrospectives. Les tests de robustesse (répétabilité, reproductibilité, comparaison de méthodes, d'échantillons ou d'opérateurs) ont été réalisés à partir d'une cohorte rétrospective (1990-2004) de 166 patients atteints de cancer du côlon de stade I/II. Afin de comparer la fiabilité du résultat « Immunoscore », une comparaison intercentre a été réalisée avec 2 centres (HEGP, Paris et HalioDX, Marseille) sur 2 principales cohortes : une cohorte prospective (2012-2013) de 101 patients atteints de cancer du côlon de stade I/II/III et une cohorte rétrospective belge de 119 patients atteints de cancer de côlon de stade I/II/III (2007-2008). Vingt-quatre blocs FFPE commerciaux issus de patients atteints de cancer du côlon ont été également inclus à l'analyse de comparaison intercentre.
L'analyse des données cliniques n'a pas été nécessaire pour l'évaluation des tests de performance de l'Immunoscore.

1.2. Validation clinique du test Immunoscore : c*ohorte internationale* SITC

Un consortium de 14 centres experts en pathologie provenant de 13 pays a participé à l'étude internationale SITC pour valider le test Immunoscore en pratique clinique. Le centre référent de cette étude a été notre laboratoire, Paris (France).
Une cohorte internationale de 3855 patients atteints du cancer du côlon a été constituée. Les patients inclus ont eu une résection de la tumeur colique primaire sans chimiothérapie néoadjuvante. La chimiothérapie adjuvante était acceptée dans les critères de sélection. Des critères d'exclusion ont été établis : des critères d'exclusion clinique ont été déterminés : les patients ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante, les cancers de côlon autres que les stades I, II ou III, l'absence des données cliniques (âge, date de décès, date de rechute). Des

critères d'exclusion technique ont également été mis en place : absence d'analyse d'un des deux marqueurs CD3 ou CD8, l'absence d'une des deux régions tumorales (CT ou IM) au niveau du tissu analysé, les intensités des marquages faibles (<152 UA) déterminées à l'aide du logiciel d'analyse d'image. La moyenne de suivi clinique a été de 96 mois.

Trois sous-cohortes ont été constituées : les patients issus des centres de Bern, Erlangen, Paris, Portland, Prague et Toronto dont les analyses ont été réalisées avant le 15 décembre 2015 ont été inclus dans la cohorte Test (TS) ou de validation interne (IVS) par un tirage au sort. Les patients dont les analyses ont été réalisées après le 15 décembre 2015 ont été inclus dans la cohorte de validation externe (EVS). Après une vérification des données cliniques et techniques, l'ensemble de la cohorte a été composé de 2305 patients atteints de cancer du côlon incluant 17% de stade I, 54% de stade II et 29% de stade III. Sur l'ensemble des cohortes, il a été recensé 474 rechutes (soit 17.9% des patients) et 930 décès (soit 35.1% des patients). La médiane de temps de survie était de 158 mois (95%IC, 143-171 mois).

La cohorte Test (TS) a été composée de 700 patients, la cohorte de validation interne (IVS) de 636 patients et la cohorte de validation externe (EVS) de 969 (Figure 7). L'étude a été conduite en accord avec les comités d'éthique de chaque pays.

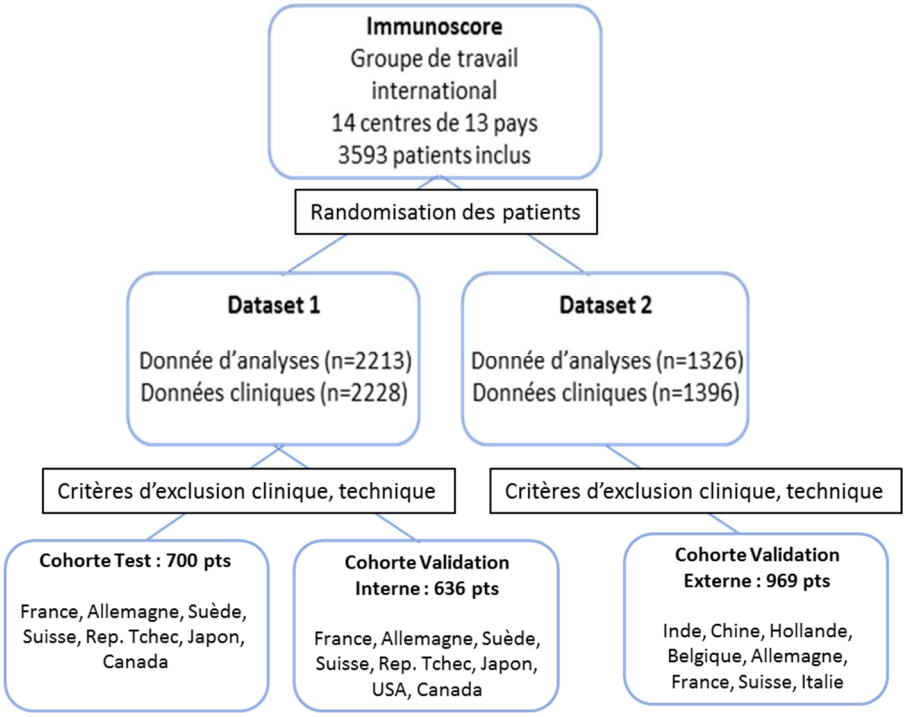


Figure 7. Dichotomisation de la cohorte internationale de 14 centres de 13 pays. Après avoir sélectionné les patients selon des critères d'exclusion cliniques et techniques, la première cohorte a été distribuée en deux sous-cohortes : une cohorte « Test » (n=700) et une cohorte « Validation Interne » (n=636). La deuxième cohorte est une cohorte de « validation Externe » (n=969).

*1.3.C*ancer du rectum : analyse dérivée de l'Immunoscore sur biopsies

Cinq cohortes rétrospectives de cancer du rectum incluant des patients traités ou non par radiochimiothérapie (RCT) ont été analysées (Tableau 1). Une variation intercentre et intracentre existait au sein des protocoles de RCT. Parmi les traitements de radiothérapie, deux traitements se distinguent : la radiothérapie externe et la radiothérapie de contact. Parmi les traitements de chimiothérapie, un traitement au 5-fluorouracil (5-FU) ou un traitement au Xeloda ont pu être administrés aux patients. Toutefois, le traitement pour la majorité des patients consistait en une association de chimiothérapie au 5-FU et de radiothérapie avec une dose de 45 Gy.

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

Tableau 1. Description de la cohorte analysée de patients atteints de cancer rectal traités par radiochimiothérapie. Six sous-cohortes constituent cette étude provenant de Belgique (n=204), de Roumanie (n=45 dont 13 patients n'ont pas reçu de radiochimiothérapie), du Brésil (n=36), d'Argentine (n=18), de France (n=20, Nice ; n=2, Poitiers). Nombre de patients par stadification de la classification TNM dans chacune des cohortes. Description du matériel utilisé et des analyses réalisées.

2. Immunohistochimie

Chaque bloc tumoral a été sélectionné à partir de lames colorées en Hématoxyline Eosine Safran (HES).

Pour l'étude des performances du test Immunoscore et l'étude internationale de validation clinique, les critères de sélection pour le choix du bloc ont été déterminés par la présence de tissu tumoral, de son front d'invasion, et par la présence d'une densité de population immunitaire la plus importante dans les régions tumorales.

Pour l'étude de l'évaluation d'un Immunoscore dérivé sur biopsie de cancer du rectum, les critères de sélection pour le choix du bloc ont été déterminés par la présence de tumeur et par la présence d'une densité de population immunitaire la plus importante.

A partir du bloc FFPE sélectionné, deux coupes adjacentes de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées et ont été déposées respectivement sur 2 lames positivement chargées (DakoFlex, Dako). Les lames sont incubées à l'étuve sèche à 56°C pendant 12h.

Un protocole standardisé a été mise en place sur la plateforme d'immunomonitoring à l'HEGP. Pour chaque lot de coupes, les lames ont été immunomarquées respectivement en CD3 et CD8 par un protocole optimisé sur l'automate Benchmark XT (Ventana) et validé en CQE (Contrôle de Qualité Externe) par la société NordicQC ; l'objectif étant d'obtenir un marquage optimisé pour quantifier les cellules positives au marquage dans les régions tumorales à l'aide d'un programme d'analyse d'image. Sur l'automate, les différentes étapes d'immunomarquage sont réalisées. Après une étape de déparaffinage, de réhydratation puis de démasquage des antigènes en Cell Conditioning 1, pH8.5 (Ventana), les peroxydases endogènes sont bloquées par la peroxyde d'hydrogène 3%. L'anticorps primaire CD3, clone 2GV6 d'une concentration finale de 0.4 µg/mL (Ready-to-use, Ventana) ou l'anticorps primaire CD8, clone C8/144B dilué à une concentration finale de 3 µg/mL (Dako) sont incubés, respectivement, 32 minutes et 20 minutes à 37°C. Les marquages sont ensuite révélés par un multimère composé d'anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin conjugués à des enzymes Horseradish Peroxydase (HRP) (UltraView DAB, Ventana). Le substrat de peroxyde d'hydrogène et le chromogène 3,3'-diaminobenzidine-tétrahydrochloride (DAB) ajoutés à ce complexe néoformé sont précipités en une couleur « marron ». Une contre-coloration à l'hématoxyline II (Ventana) a été ajoutée donnant une couleur bleue aux noyaux des cellules du tissu.

3. Numérisation des lames

Les lames immunomarquées ont été ensuite numérisées avec un scanner haute résolution (NanoZoomer HT2.0, Hamamatsu) au grossissement 20X, à une résolution de 0.45µm/pixel.
Les images des lames numérisées ont été importées dans le logiciel d'analyse d'image, Developer XD (Definiens).

4. Quantification de l'infiltrat immunitaire à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image

4.1. Quantification immunitaire dans une tumeur primaire colique

L'infiltrat immunitaire (CD3 et CD8) a été quantifié dans la tumeur [CT] et dans la marge d'invasion [IM] à l'aide du module « Immunoscore » développé par la société Definiens, à notre demande. Ce module est semi-automatique avec une détection automatique du tissu et une segmentation automatique de la structure histologique (Figure 8.A et 8.B) ; une délimitation manuelle de la tumeur effectuée par l'opérateur et une détection automatique de la marge d'invasion (Figure 8.C). L'analyse des régions tumorales CT et IM est réalisée sur l'ensemble du tissu sélectionné suivant un comptage par champs, appelé également « tuiles ». Un calcul est réalisé afin de déterminer (1) le nombre de cellules immunomarquées, (2) la surface tissulaire, (3) la densité de cellules immunomarquées, (4) la moyenne et la médiane d'intensité de marquage des cellules détectées, représentées suivant un histogramme (Figure 8.D).

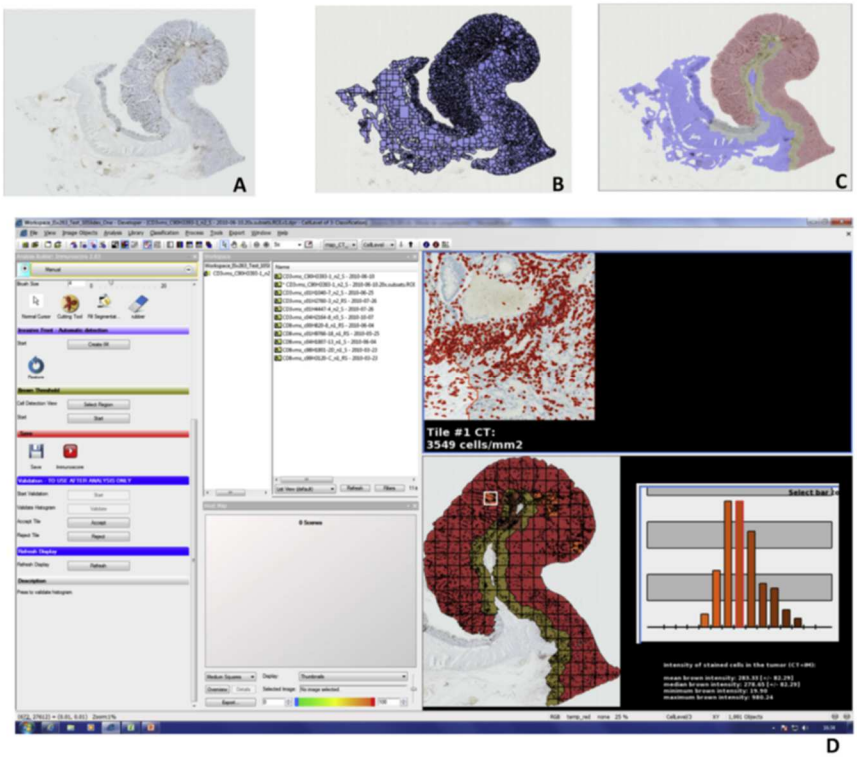


Figure 8. Exemple d'une tumeur analysée par le module Immunoscore. Chargement de l'image numérisée (A). Détection tissulaire et segmentation du tissu (B). Délimitation de la tumeur CT (rouge), du tissu sain (bleu) et de son épithélium (gris). Création automatique du front d'invasion IM (marron) (C). Analyse des régions tumorales CT et IM : détection automatique des cellules immunomarquées, cartographie de la zone tumorale et de la marge d'invasion, histogramme de distribution d'intensité de marquage avec calcul de la moyenne et de la médiane d'intensité de marquage (D).

4.2. Quantification immunitaire dans une biopsie diagnostique

Les biopsies immunomarquées en CD3 et CD8 ont été analysées par le module « ImmuneReaction » dérivé du module « Immunoscore ». Seule la zone tumorale de la biopsie, préalablement délimitée par un anatomopathologiste a été prise en compte. Cette zone tumorale est ensuite divisée en champs (tuiles) par le logiciel pour quantifier les cellules positives. Une étape de validation de chaque tuile a été réalisée en apportant si besoin une correction manuelle sur la détection erronée d'un marquage « faux-positif » (nécrose, bruit de fond, artéfacts) (Figure 9).

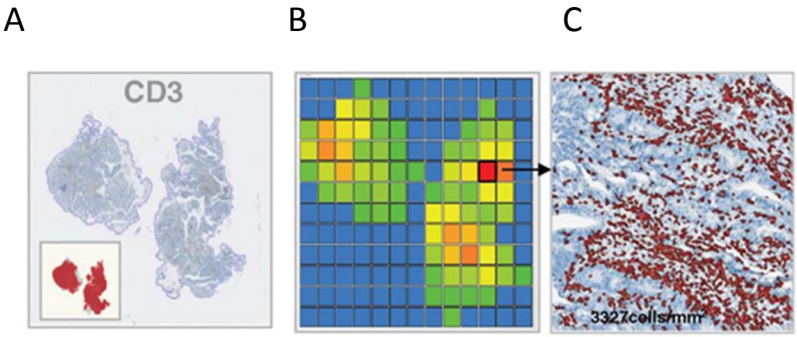


Figure 9. Exemple d'analyse d'une biopsie par le logiciel d'image Definiens. Délimitation de la zone tumorale (A). Cartographie de la densité (Échelle de 0 cellules/mm² (bleu) à 3 327 cellules/mm² (rouge) (B). Détection des cellules immunomarquées CD3+ (rouge) sur une tuile par le logiciel d'analyse d'image (C).

5. Coordination de l'étude internationale SITC

Dans le but de promouvoir l'Immunoscore en pratique clinique, la société pour l'immunothérapie du cancer (SITC), l'académie européenne de l'immunologie tumorale, du cancer et de l'inflammation, le programme du « National Cancer Institute », le « National Institute of Health » (USA) et la "Fondazione Melanoma" (Italie) ont mis en place conjointement en 2011 un groupe de travail sur l'évaluation de l'Immunoscore dans les tumeur colique pour s'initier à une nouvelle approche possible dans la classification du cancer. Cet effort mondial a été soutenu par le « World Immunotherapy Council ». Un consensus international de laboratoires histopathologiques indépendants a pris en charge les analyses de quantification de l'infiltrat immunitaire afin d'évaluer l'Immunoscore en laboratoire.

L'étude internationale a été coordonnée par notre centre (HEGP, Paris). Un diagramme schématique est illustré dans la figure 10. Les protocoles de coupes des blocs de tissu tumoral en paraffine ainsi que les protocoles d'immunomarquage du CD3 et du CD8 appliqué dans notre centre ont été recommandés aux 13 autres centres participant à l'étude. Pour normaliser la qualité des immunomarquages en CD3 et en CD8 réalisés sur différents automates, utilisés par les centres (BenchmarkXT et Ultra, Ventana ; LeicaBond III, Dako), deux lames contrôles issues de 3 blocs FFPE différents (soit 6 lames) ont été coupées par le centre Suisse, Bern puis envoyées et immunomarquées par chacun des centres. Les lames adjacentes à ces coupes ont été en parallèle immunomarquées en CD3 et CD8 par notre centre. La qualité des immunomarquages en CD3 et CD8 réalisés sur chacune des lames par les centres, a été comparée à la lame adjacente immunomarquée par notre centre. Chaque centre dont le

protocole d'immunomarquage a été validé, a pris en charge l'analyse de sa cohorte. Pour numériser les lames, trois scanners haute résolution ont été utilisés par les centres : Panoramic (3D-Histech) ; Aperio (Leica) et NanoZoomer (Hamamatsu). Les paramètres de numérisation, décrits dans le paragraphe « Numérisation des lames », ont été recommandés à chacun des centres. Les centres ont ensuite été formés par notre centre à la procédure d'analyse de quantification de l'infiltrat immunitaire dans le tissu tumoral avec le logiciel d'analyse d'image Developer XD, et le module Immunoscore décrit précédemment.

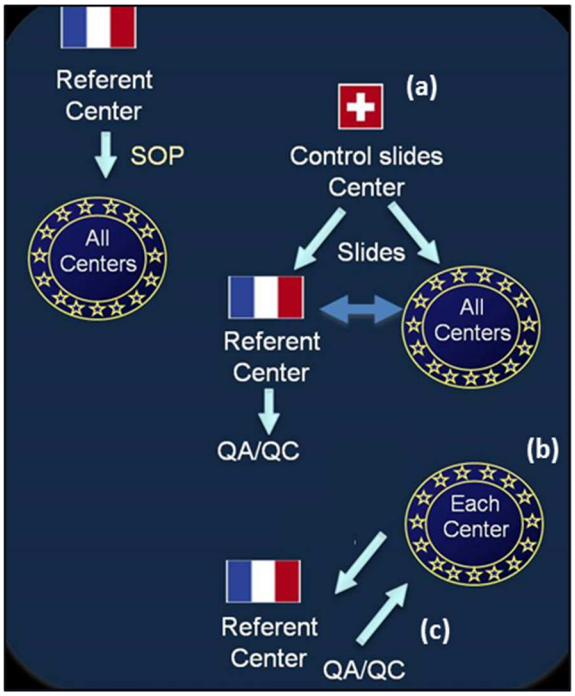


Figure 10. Représentation schématique de la coordination de l'étude internationale de validation clinique de l'Immunoscore. La coordination de l'étude a été prise en charge par notre laboratoire (centre référent). Des lames contrôles ont été envoyées dans chaque centre pour normaliser les protocoles d'immunomarquage (a). Chaque centre a réalisé les analyses de leur cohorte (b). Une validation qualitative des analyses a été effectuée par le centre référent (c).

6. Analyse de l'instabilité des microsatellites

Le statut microsatellitaire de 1290 patients de la cohorte Test, IVS et EVS a été recueilli à partir des données cliniques de chaque centre. Une partie des analyses a été réalisée au centre référent du Centre de Recherche des Cordeliers, par notre équipe. L'ADN génomique a été extrait à partir de 2 coupes de 10 µm de tissu tumoral issu d'un bloc FFPE pour chaque patient. Le statut MSI a été appliqué selon la nouvelle classification moléculaire de Bethesda

(marqueurs BAT25, BAT26, NR21, NR24, et NR27). Les tumeurs présentant une instabilité sur au moins 2 de ces 5 marqueurs ont été considérées MSI+ (dMMR), les tumeurs présentant une stabilité des marqueurs ont été considérées MSS (pMMR) (Boland et al., 1998).

7. Etude de l'expression de gènes, technique Nanostring

7.1. Extraction ARN

Afin de procéder à l'analyse d'expression de gènes par l'extraction d'ARNm à partir de tissus inclus en paraffine (FFPE), des coupes de 20 µm issues de blocs tumoraux FFPE de pièces opératoires ont été réalisées dans des conditions « RNase-free ». Après une délimitation de la zone tumorale sur la lame de coloration hématoxyline éosine safran (HES) issue du bloc tumoral FFPE avec l'aide d'un anatomopathologiste, les zones tumorales de ces coupes ont été prélevées dans des conditions RNAse-free au scalpel. La quantité et la qualité de l'ARN extrait sur les tumeurs traitées par RCT étant très inférieures à celles obtenues sur des tumeurs non traitées, deux coupes tumorales de 20 µm ont été utilisées pour les patients traités par RCT et une seule coupe de 20µm a été suffisante pour les tumeurs non traitées par RCT.

Après une étape de déparaffinage de 5 min dans une solution de Clearen (ThermoFisher), la coupe a été déshydratée dans 2 bains successifs d'alcool absolu (5 minutes x2). L'extraction d'ARN a été effectuée avec le kit d'extraction « RecoverAllTMTotal Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE » (Ambion) en suivant les recommandations du fabricant. La quantité et la qualité des ARNm extraits ont été évaluées grâce à plusieurs méthodes d'analyse : au spectrophotomètre NanoDrop2000 pour quantifier la totalité des acides nucléiques extraits, au fluoromètre Qubit 3.0 avec le kit « RNA BR Assay » (InvitrogenTM) pour quantifier l'ARN, avec le kit « dsDNA HS Assay » (InvitrogenTM) pour quantifier la contamination en ADN, et à l'aide de puces « Agilent RNA 6000 Nano » analysées sur le bioanalyseur Agilent 2100.

7.2. Analyse par la technologie Nanostring

L'ARN extrait a été analysé par la technologie « nCounter Analysis System » (Nanostring). Cette technologie nécessite une faible quantité d'ARN extraits (100ng d'ARN total purifié)

pouvant être obtenue à partir d'une coupe de tissu tumoral inclus en paraffine. Cette technologie repose sur deux sondes conçues spécifiquement pour chaque cible (gène) d'intérêt.

La sonde de capture, non spécifique, est couplée à la biotine, et est utilisée pour immobiliser les molécules d'intérêt sur un support, une membrane dédiée au comptage. La deuxième sonde « rapporteur », spécifique du gène d'intérêt contient une succession de 6 fluorochromes de 4 couleurs différentes, réalisant ainsi un code-barre propre à chaque molécule d'intérêt (Figure 11). Cette technologie ne nécessite ni transcription-inverse, ni enzyme, ni étape d'amplification. Elle permet l'analyse de faible quantité de matériel biologique et assure une très grande sensibilité. La première étape de l'analyse consiste en l'hybridation des sondes, préalablement conçues par la société Nanostring, sur l'ARN extrait, pendant 16 heures à 65°C. Les complexes sondes-cibles sont ensuite alignés et immobilisés afin de procéder à la lecture du code-couleur à l'aide de l'automate « nCounter ».

Pour cette analyse, un ensemble de 48 gènes a été utilisé (Annexe 3). Ces gènes ont été sélectionnés à partir de travaux réalisés au sein de notre équipe sur la valeur pronostique de gènes immunitaires exprimés dans le cancer colorectal. Il regroupe principalement des gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GNLY, GZMA, CD8*A), l'activation (*ICOS*), la costimulation positive ou négative (*CD274, PDCD1, LAG3, CTLA-4*), l'orientation Th1 (*TBX21, STAT4*), Th17 (*IL17*), le chimiotactisme des monocytes/macrophages (*CCR2, CCL2, CCL5*). Quatre gènes contrôles (*ACTB, GUSB, SP2, VPS33B*) ont été ajoutés à l'analyse. Les résultats ainsi obtenus ont ensuite été analysés grâce au logiciel nSolver™ Analysis Software 3.0.

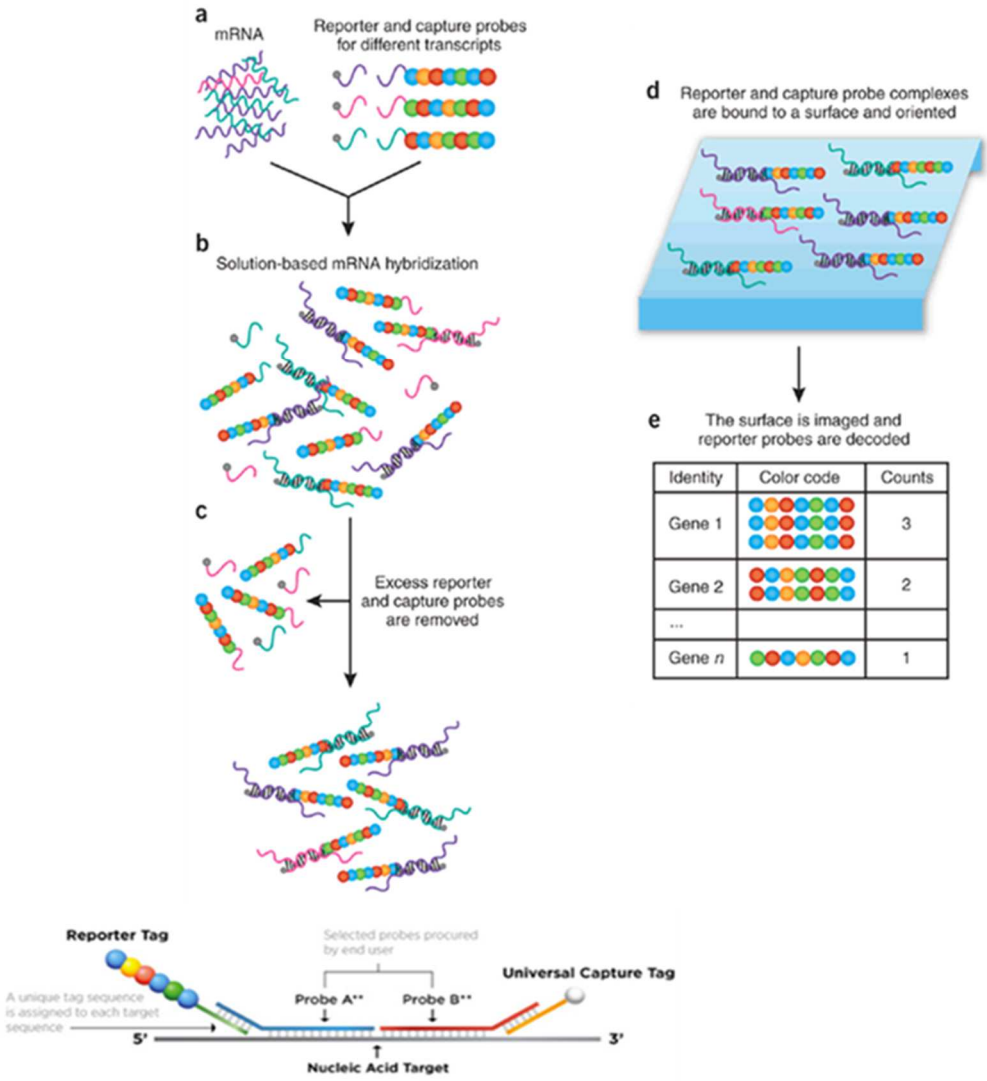


Figure 11. Technologie Nanostring. Les sondes de capture et les sondes « rapporteur » sont ajoutées à l'ARN en suspension dans une solution et s'hybrident un à un, à la région d'intérêt de l'ARN (a)-(c). La sonde de capture couplée à une molécule de biotine est utilisée pour immobiliser le complexe sur une membrane (d). La sonde « reporter » libre spécifique à la région cible de l'ARN est lue par l'automate n-Counter (e).

8. Analyses Statistiques

8.1.Analyses Statistiques des performances du test Immunoscore

Afin de valider le test Immunoscore, des analyses de corrélation de Pearson ont été réalisées. Le coefficient intra-classe (ICC) a été calculé en utilisant le package « psych » dans le logiciel R pour évaluer la concordance de deux méthodes de quantification des cellules immunitaires (opérateurs / logiciel d'analyse d'image). Le graphique de Bland et Altman a complété l'analyse de la concordance entre les deux méthodes de quantification en montrant l'ampleur de désaccord entre la quantification de l'utilisateur et du logiciel (Elie et Colombet 2011) (Røge

et al. 2016). Le coefficient de variation (CV) est une mesure relative de la dispersion des données autour de la moyenne qui a permis d'évaluer la variabilité introduite par l'opérateur ou l'échantillon. Une variation de 10% a été acceptée.

Une matrice de corrélation (corrélation de Pearson) a également été générée pour évaluer la reproductibilité de l'analyse entre différents opérateurs. Des comparaisons d'Immunoscore entre différents échantillons d'un même patient ou entre différents centres ont été réalisées afin d'évaluer la fiabilité du test malgré les différents paramètres introduits dans la méthode d'analyse.

8.2. Analyses statistiques de l'étude internationale

La fédération hospitalo-universitaire et de recherche américaine, Mayo Clinique, aux USA, à Rochester, a recueilli et centralisé les données cliniques et les Immunoscores des analyses de tous les centres participant à l'étude. Elle a dichotomisé par tirage au sort les cohortes des centres en deux sous-cohortes : une cohorte test (TS) et une cohorte de validation interne (IVS). Une cohorte de validation externe (EVS) a également été réalisée. Des critères d'exclusion ont été appliqués (Figure 9). La moyenne, les écart-types et la médiane ont été reportés en variables continues. La fréquence et le pourcentage ont été reportés en variables catégorielles. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les variables continues et le test de Chi-deux a été utilisé pour les variables catégorielles. La fédération hospitalo-universitaire et de recherche, Mayo Clinique, a également réalisé les analyses de survie globale et sans récidive de cette étude (voir paragraphe 8.4).

8.3. Analyses statistiques de l'Immunoscore dérivé sur le cancer du rectum

Des tests paramétriques (Student t-test, n>30) et non paramétriques (test de Wilcoxon-Mann-Whitney, n<30) ont été calculés afin de déterminer les marqueurs significativement associés à une bonne réponse à la radiochimiothérapie. Nous avons ensuite défini la valeur « seuil » de la densité à la médiane au sein de la cohorte et déterminer le cut-off optimal de discrimination des patients fortement infiltrés (Hi) et faiblement infiltrés (Lo). Les valeurs « p » (p-value) pour les cut-off optimaux ont été pondérées par un facteur de correction de Altman (Altman et al., 1994). Des analyses de survie globale et sans récidive ont été réalisées (voir paragraphe 8.4).

8.4.Analyses de survie globale et de survie sans récidive

Les courbes de Kaplan Meier (KM) ont été réalisées afin d'illustrer l'influence des critères immunologiques sur la survie sans récidive (DFS) définie à partir de la maladie jusqu'à la rechute de la maladie, et la survie globale (OS) définie à partir de la maladie jusqu'au décès du patient quel que soit la cause du décès. Le test de Log-rank a été appliqué pour analyser les courbes de survie. Le modèle de Cox a été utilisé pour évaluer le Hazard Ratio (HR) associé au risque de rechute et de décès. Des analyses univariées et multivariées de l'Immunoscore ont également été réalisées en introduisant les paramètres de l'âge, le sexe, le stade-T, le stade-N et le statut MSI, afin d'évaluer la significativité du test Immunoscore, catégorisé en 2, 3 et 5 groupes. Une valeur $p<0.05$ a été considérée comme statistiquement significative. La performance pronostique de l'Immunoscore a également été analysée par le test « Harrell's c-statistics » (C-index). Ceci a permis d'évaluer la spécificité et la sensibilité du test (courbes de ROC). Un C-index >0.5 impliquait une bonne capacité du test à prédire la survie du patient. Afin d'évaluer la significativité du test Immunoscore associé au statut MSI des analyses univariées et multivariées ont été réalisées avec le modèle de Cox.

Pour l'ensemble de ces études, les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux logiciels R, XLStat et Graphpad.

RESULTATS

1. Analyse de l'Immunoscore dans le cancer colique

Le test Immunoscore a pour objectif de synthétiser l'information de la densité des cellules CD3+ et CD8+ dans la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM) pour un échantillon analysé. Plusieurs étapes pré-analytiques sont réalisées : un bloc de tissu tumoral est sélectionné, 2 coupes adjacentes de ce bloc sont réalisées et un immunomarquage CD3+, CD8+ au diaminobenzidine (DAB) est effectué. (Voir « matériel et méthodes »).

La densité moyenne de chaque marqueur est déterminée dans chaque région par le programme d'analyse d'image. Selon un calcul automatisé, le niveau de densité de chaque marqueur dans chaque région d'intérêt (CT et IM) est comparé aux densités obtenues lors de l'analyse de la cohorte de référence du cancer du côlon de l'étude internationale SITC (n = 2305 patients ; voir chapitre « Validation clinique de l'Immunoscore »). Son positionnement en termes de percentile est alors déterminé. La moyenne des 4 percentiles obtenue est calculée puis retranscrite sur une échelle Immunoscore allant de I0 à I4 (Figure 12). En pratique clinique, les Immunoscores I0 et I1 sont obtenus pour une tumeur présentant une faible densité immunitaire CD3 et CD8 dans la tumeur et son front d'invasion, et sont catégorisés dans un groupe faible « Lo ». L'Immunoscore I2 représente une densité moyenne, et se catégorise dans le groupe intermédiaire « Int ». Enfin, les Immunoscores I3 et I4 caractérisent des tumeurs fortement infiltrées de façon homogène dans la tumeur et son front d'invasion, ils se catégorisent dans le groupe fort « Hi ».

Des analyses supplémentaires à notre étude ont également été réalisées en catégorisant l'Immunoscore en 2 groupes : un groupe « Lo » réunissant les scores I0 et I1, et un groupe « Hi » réunissant les scores I2, I3 et I4 (*Figure 12*).

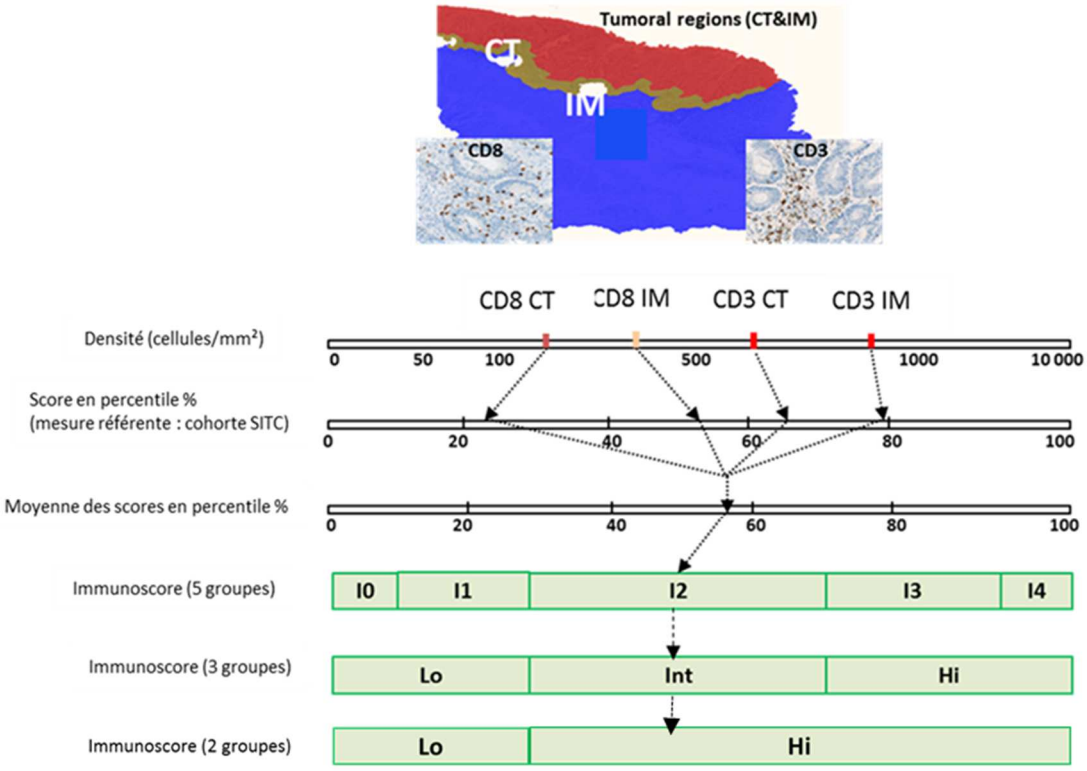


Figure 12. Exemple d'analyse de l'Immunoscore pour un patient X. Immunomarquage CD3, CD8 au diaminobenzidine (DAB) sur 2 coupes tissulaires issu d'un bloc tumoral sélectionné. La densité des lymphocytes TCD3+ et TCD8+ est déterminée pour chaque patient sur les régions d'intérêt : tumeur (CT) et front d'invasion (IM). Ces densités immunitaires sont alors comparées à celles de la cohorte de référence SITC (3593 patients) et traduite en percentiles. La moyenne de ces percentiles est ensuite calculée et convertie en un score immunitaire (Immunoscore I0 à I4, catégorisés en 3 groupes, faible : « Lo », intermédiaire : « Int » et fort : « Hi » ou en 2 groupes, faible « Lo » et fort « Hi » (Int-Hi)).

2. Performance du test Immunoscore

2.1. Variabilité de l'intensité de marquage

2.1.1. Détection des cellules CD3+, CD8+ par le logiciel d'analyse d'image et validation de l'intensité de marquage

La quantification de l'infiltrat immunitaire réalisée avec une technique d'immunohistochimie au diaminobenzidine (DAB), et assistée par un logiciel d'analyse d'image (AI), est une procédure qui demande une haute qualité de marquage. Ce marquage est visible à l'œil nu par une coloration membranaire marron des cellules positives. Il doit être sans bruit de fond et sans artefacts. L'intensité de marquage des cellules « positives » doit être également détectable par le logiciel d'analyse d'image.

Pour contrôler la qualité de ce marquage, la distribution d'intensité des cellules détectées dans les régions analysées est évaluée pour chaque analyse. La moyenne, la médiane, le

minimum, et le maximum de l'intensité sont également calculés. La valeur minimale d'intensité de marquage détectée par le logiciel est au seuil de 100 UA (Unité Arbitraire). Toutes les intensités des cellules « positives » inférieures à une valeur de 100 UA ne sont pas détectées par le logiciel. Il a été observé que la moyenne d'intensité de marquage était variable d'un tissu coupé à partir d'un bloc FFPE à un autre (Figure 13). Cette variabilité a également été observée pour le marquage CD8+ (données non montrées).

Ainsi, à une valeur de 140 UA, la détection des cellules positives était inférieure à 20% des cellules positives totales (Figure 13.A) alors qu'à une valeur de moyenne d'intensité de 190 UA, les cellules positives étaient détectées à 95-100% (Figure 13.B). De ce fait, nous avons fixé une valeur minimale de moyenne d'intensité de marquage à 152 UA pour valider l'analyse des deux marqueurs CD3+, CD8+.

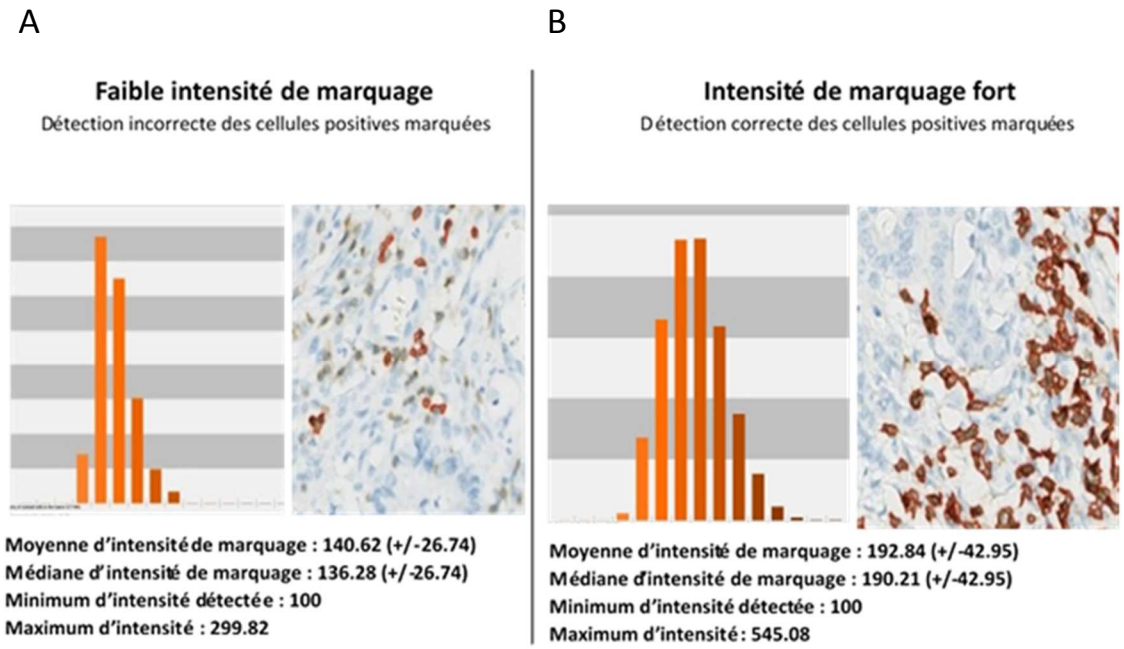


Figure 13. Variabilité de l'intensité de marquage et détection des cellules immunomarquées en CD3+ par le logiciel d'analyse d'image. Les cellules immunomarquées (marron) sont détectées par le logiciel d'analyse d'image (ligne rouge). La valeur de la moyenne, la médiane, le minimum et le maximum de l'intensité de marquage et une distribution d'intensité de marquage des cellules positives détectées sont évaluées par le logiciel d'analyse d'image. Les marquages des cellules positives de faible intensité sont peu détectés par le logiciel (A). De forte intensité, le marquage est correctement détecté par le logiciel (B).

2.1.2. Variabilité de l'intensité de marquage en fonction de l'âge du bloc FFPE

Le diagnostic établi par les pathologistes pour les cancers est réalisé à partir de coupes tissulaires de blocs FFPE. Les tissus fixés au formol et inclus en paraffine constituent une ressource inestimable pour les études rétrospectives. En observant la variabilité d'intensité de marquage précédemment décrite sur différents cas, il nous est paru nécessaire d'analyser l'effet potentiel de l'âge des blocs de tissus colorectaux sur le marquage des antigènes CD3 et CD8. La figure 14 montre la moyenne d'intensité de marquage CD3 et CD8, respectivement, sur une cohorte rétrospective de 166 patients de 1990 à 2004. On note une légère diminution de l'intensité de marquage en fonction de l'âge vieillissant du bloc : pour le CD3 la valeur moyenne minimale d'intensité de 234 UA pour les blocs les plus anciens en 1990 à une valeur moyenne d'intensité maximale de 259 UA pour les blocs les plus récents en 2004. Ce résultat est également observée pour le CD8 (moyenne min= 195 UA ; moyenne max= 232 UA).
Les moyennes d'intensité de marquage du CD3 et du CD8 augmentent faiblement au cours du temps. Elles sont toutefois, très supérieures au seuil minimal d'intensité de marquage acceptable (>152 UA) pour valider l'analyse à partir du logiciel d'analyse d'image.

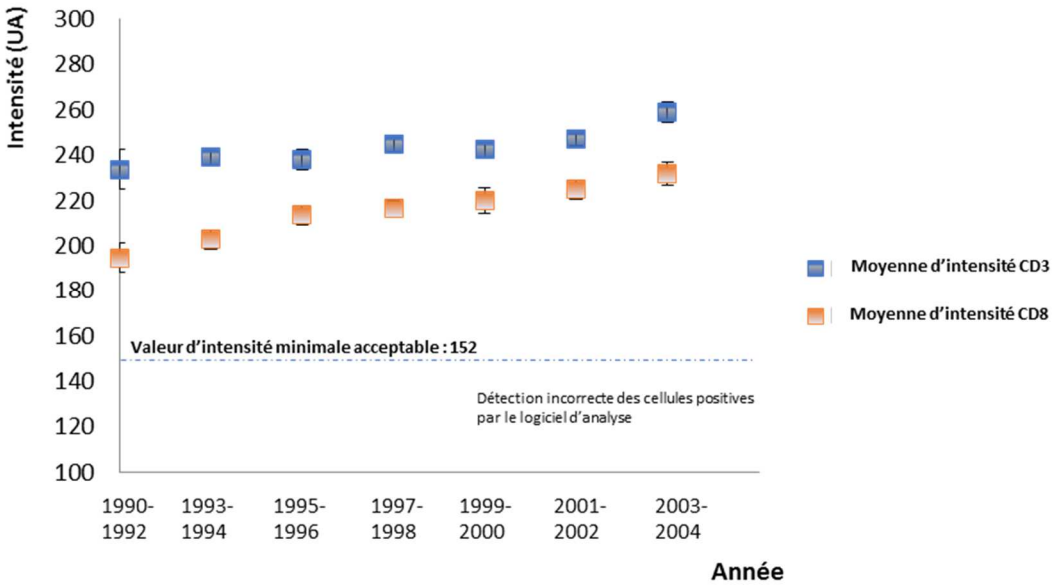


Figure 14. Robustesse du marquage CD3+ et CD8+ au cours du temps. La moyenne d'intensité de marquage augmente faiblement en fonction de l'âge des blocs (n=166) de 1990 à 2004 pour le CD3 (bleu) et pour le CD8 (rouge) (+/- SEM). Elle reste supérieure à la valeur minimale de la moyenne d'intensité de marquage acceptée (152 UA).

2.2. Quantification de l'infiltrat immunitaire

2.2.1. Comparaison de deux méthodes de comptage

Une comparaison de 2 méthodes de quantification a été réalisée pour estimer la concordance entre le comptage des cellules CD3+ et CD8+, déterminé par le logiciel d'analyse d'image Developer XD (IA) et le comptage optique réalisé par l'opérateur (OP).

Cinquante champs pris au hasard d'une analyse en CD3 et en CD8, respectivement, ont été quantifiés « à l'œil » par un opérateur et comparés au comptage automatique du logiciel. La figure 15, nous montre une très forte corrélation entre le comptage optique et le comptage automatique en CD3 (Figure 15.A), avec une valeur du coefficient de corrélation de Pearson R de 0.94 (R^2=0.89). Nous obtenons également une bonne concordance pour le comptage du CD3 entre les deux séries de mesures, avec un coefficient intra-classe (ICC) de 0.89 à un intervalle de confiance à 95%, IC : 0.81-0.94. Pour le marqueur CD8 (Figure 15.B), le coefficient de corrélation de Pearson R est de 0.91 (R^2=0.84) avec un ICC à 0.91 (95% IC 0.85-0.95).

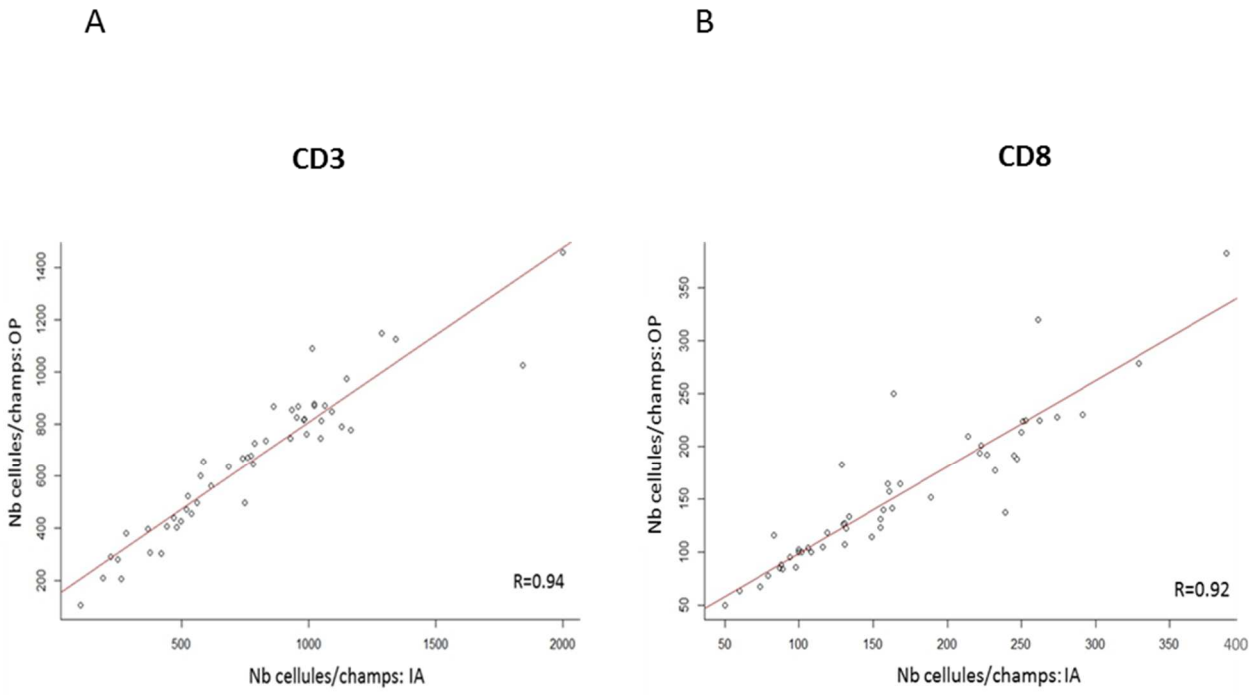
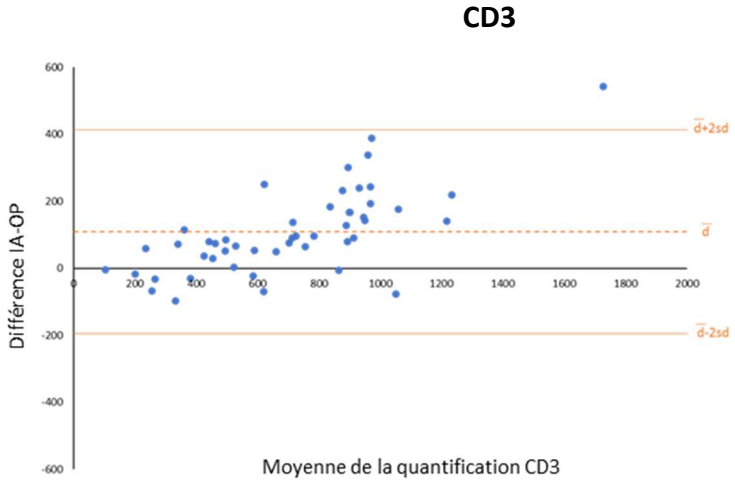


Figure 15. Corrélation de Pearson entre une quantification optique et une quantification par le logiciel d'analyse d'image (IA) des lymphocytes CD3+, CD8+. Le nombre de lymphocytes CD3+ (A) ou CD8+ (B) a été quantifié par un opérateur (OP) ou par le logiciel d'analyse d'image Developer XD sur 50 champs « random » d'une image analysée en CD3 ou en CD8.

En évaluant l'ampleur de désaccord entre les deux méthodes de comptage, illustré par le graphique Bland et Haltman (Figure 16), un biais de quantification (đ=122 cellules) en faveur du logiciel d'analyse d'image a été calculé pour le CD3 à partir de 900 cellules quantifiées. Toutefois, la limite de la concordance n'a pas été dépassée (moyenne des différences de quantification đ +/- 2standard déviation : đ+/-2SD) (Figure 16.A). Cette légère discordance pourrait s'expliquer par la difficulté du comptage à l'œil du nombre de cellules, lorsque la densité cellulaire devient importante (pour le CD3 : min=105, max=1728 cellules positives). Pour le CD8+, cette discordance est moins visible (đ= 14 cellules), le nombre de cellules quantifiées à l'œil étant moins important que le CD3 (CD8 : min=50, max=380 cellules positives) (Figure 16.B).

A



B

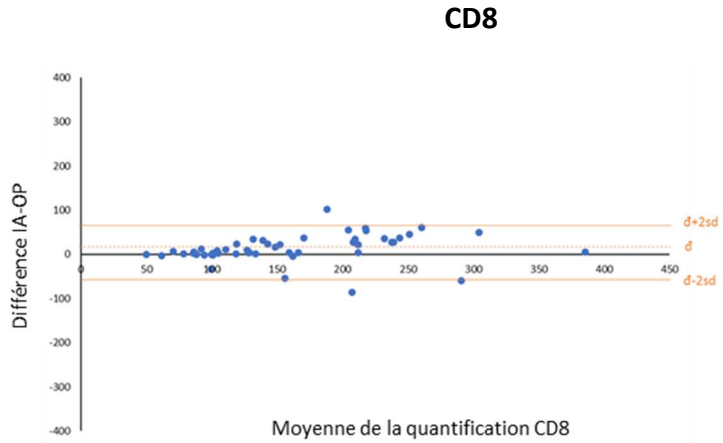


Figure 16. Graphique de Bland et Altman. Mesure de l'ampleur du désaccord entre le comptage de l'opérateur (OP) et le comptage du logiciel d'analyse d'image Developer XD (IA), pour les cellules positives CD3+ avec un biais calculé de đ=122 cellules (+/-2SD) (A), et les cellules positives CD8+, (đ=14 cellules (+/-2SD) (B).

2.2.2. Répétabilité de comptage du logiciel d'analyse d'image

Pour contrôler la stabilité de comptage du logiciel, une image d'un champ numérisé en CD3 ou CD8 a été analysée 20 fois au cours du temps. Le coefficient de variation (CV) obtenu par cette analyse est inférieur à 1% pour les deux marqueurs, CD3 et CD8 (données non montrées). La répétabilité de l'analyse par le logiciel est donc très performante.

2.3. Variabilité du test Immunoscore induite par l'opérateur

2.3.1. Répétabilité de la quantification par un opérateur

Lors de l'analyse sur le logiciel, la délimitation de la tumeur (CT) est réalisée manuellement par un opérateur (OP). Cette classification est suivie d'une détection automatique de la marge d'invasion (IM) (voir chapitre matériel et méthodes).

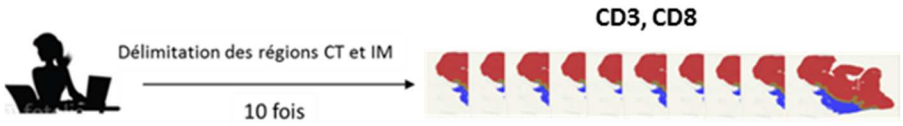
Pour évaluer la variabilité que pourrait apporter un opérateur sur le résultat obtenu de la densité immunitaire, CD3+, CD8+, 10 analyses ont été effectuées sur une même image d'un tissu tumoral immunomarqué et numérisé (Figure 17.A).

Le coefficient de variation (CV), soit le degré de dispersion, a été calculé pour les 10 analyses dans les deux régions CT et IM, des deux marqueurs CD3 et CD8 (Figure 17.B).

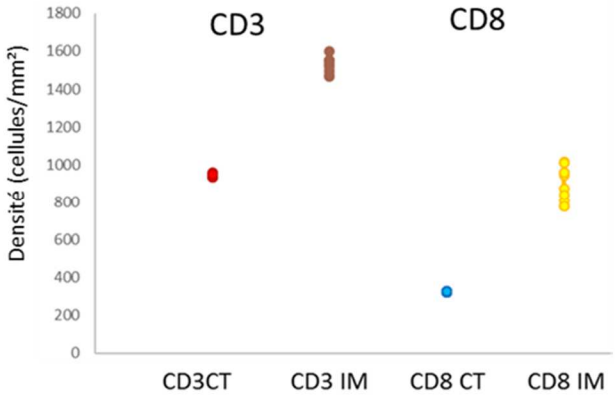
Nous avons obtenu un CV inférieur à 2% pour la densité immunitaire évaluée dans les deux régions tumorales (CT/IM) du CD3 et un CV inférieur à 6% pour celle du CD8.

De plus, le calcul de l'Immunoscore (IS) pour cet échantillon est identique pour les 10 analyses. La variation induite par un opérateur sur la délimitation tumorale est donc très minime.

A



B



Densité immunitaire (CV%)

	CD3	CD8
Région CT	0.76%	0.64%
Région IM	2.6%	10.36%
Région CT/IM	1.7%	5.5%

Immunoscore I3

Figure 17. Répétabilité par un opérateur de la quantification immunitaire (cellules/mm²) dans les régions CT et IM à partir d'une image d'un tissu tumoral immunomarqué en CD3, CD8 et numérisé (A). Evaluation du coefficient de variation (CV) et de l'Immunoscore des 10 analyses del'image dans les régions CT et IM (B).

2.3.2. Reproductibilité de la quantification par différents opérateurs selon deux méthodes d'analyse du score immunitaire.

Des analyses de corrélation de densités immunitaires ont été effectuées pour évaluer la reproductibilité de l'Immunoscore sur un même échantillon entre différents opérateurs.

Deux méthodes d'analyse permettant l'évaluation de la densité immunitaire au sein des régions tumorales ont également été comparées. La première méthode a été utilisée pour l'évaluation du score immunitaire lors des analyses en puce tissulaire (TMA) de l'équipe**.** Elle consiste à calculer la moyenne des 3 champs (3 Hot spots) les plus infiltrés en CD3, CD8 dans le CT et dans l'IM (Galon et al., 2006) (Pagès et al., 2009). La deuxième méthode, plus applicable en pratique clinique, consiste à déterminer la moyenne de la densité lymphocytaire, dans chaque région tumorale, CT et IM.

Pour cette analyse, 18 coupes de tissus tumoraux issus de blocs FFPE respectifs ont été immunomarqués en CD3 ou CD8 et numérisés. Les images de ces lames numérisées ont été envoyées et analysées par 8 pathologistes. La moyenne de la densité immunitaire pour chaque

échantillon a été calculée selon les deux méthodes. La corrélation de la densité immunitaire évaluée dans les deux régions respectives, CT et IM, obtenue entre les pathologistes sur une même image et analysée selon les deux méthodes est illustrée par la figure 18.

La méthode d'analyse des 3 « Hot spots » les plus infiltrés montre une bonne corrélation entre les densités immunitaires évaluées par les 8 pathologistes, dans les deux régions tumorales (CT et IM). La moyenne des coefficients de Pearson est de R= 0.89 pour le CT et R= 0.94 pour l'IM. Toutefois, une meilleure corrélation est obtenue pour les densités immunitaires calculées par la moyenne de la région tumorale CT et IM, la moyenne des coefficients de Pearson étant de R= 0.97 pour les deux régions CT et IM, respectivement.

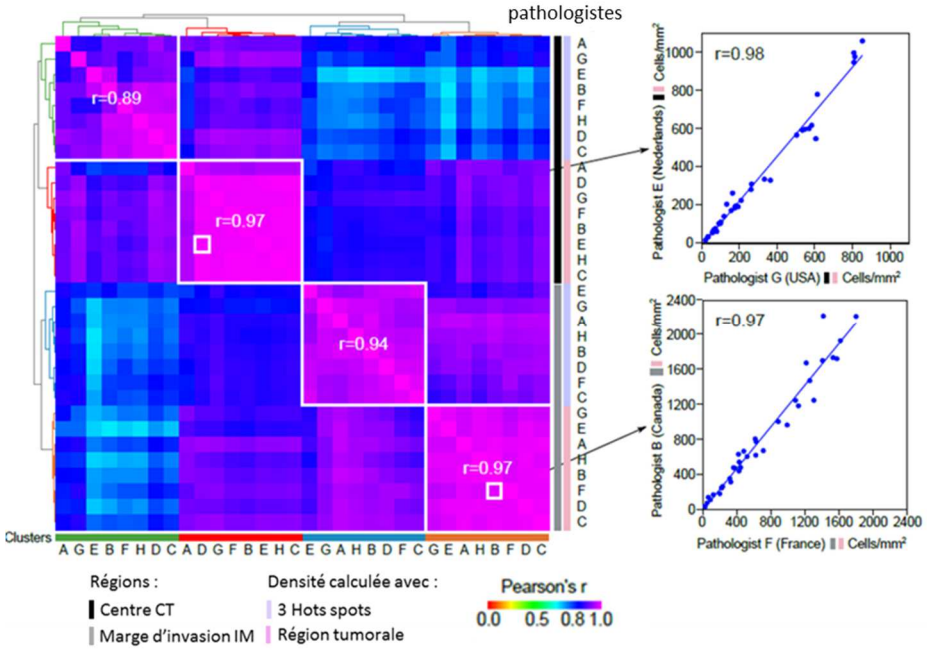


Figure 18. Matrice de corrélation des densités immunitaires selon différents opérateurs. Quantification de 8 images par 8 pathologistes (A-H). Comparaison des moyennes de densité immunitaire obtenue dans la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM) entre 8 pathologistes selon une méthode d'analyse des 3 champs (3 Hot spots) les plus infiltrées ou selon une analyse des régions tumorales CT et IM.

2.4. Variabilité du test Immunoscore induite par l'échantillon

2.4.1. Variabilité du test Immunoscore en fonction du niveau de coupe de l'échantillon

Le bloc FFPE (ou échantillon) sélectionné et utilisé pour l'évaluation de l'Immunoscore permet de réaliser un très grand nombre de coupes de 4µm (environ 100 à 200 coupes par bloc). Entre chaque coupe adjacente du bloc de tissu tumoral FFPE, il existe une différence spatiale.

Afin d'évaluer cette variabilité de quantification entre niveaux de coupes, nous avons analysé une série de 4 coupes adjacentes de 4 blocs FFPE (Figure 19). Le coefficient de variation (CV) a été calculé pour la densité des régions CT et IM entre les lames 1-2 ; 2-3 ; 3-4 en CD3 et CD8, respectivement. La moyenne du CV obtenue pour les densités des régions CT et IM des 4 échantillons a été, respectivement, de 5.5% et 6.7% pour le CD3, et de 6.7% et 9.1% pour le CD8. Au total, un CV moyen inférieur à 10% a été déterminé pour les 4 blocs, entre 4 coupes adjacentes (Tableau 2). N'ayant pas de référentiel théorique sur la variabilité minimale à obtenir entre deux coupes adjacentes, ce résultat a été validé.

Figure 19. Variabilité de la densité lymphocytaire CD3+ et CD8+ sur 4 coupes tissulaires adjacentes de 4 blocs. Chaque série de coupes sériées a été immunomarquée en CD3+ ou en CD8+, numérisée et analysée sur le logiciel d'analyse d'image par un seul opérateur.

	Coefficient de Variation (CV) des densités immunitaires CD3+, CD8+ sur des coupes adjacentes de 4 échantillons			
	Région CD3 CT	Région CD3 IM	Région CD8 CT	Région CD8 IM
Échantillons 1-4	5.5%	6.7%	6.7%	9.1%

Tableau 2. La moyenne des coefficients de variations (CV) de la densité immunitaire de chaque coupe sériée des 4 blocs a été calculée et représentée en pourcentage

Trois échantillons (blocs) de patients (S1, S2, S3) ont également été analysés afin de déterminer l'influence du niveau de coupe au-delà de la coupe adjacente. En moyenne, 40 coupes adjacentes de chaque bloc (S1=40 ; S2=42 ; S3=36) ont été immunomarquées alternativement en CD3 (coupe n1) et en CD8 (coupe n2). Pour chaque échantillon, et chaque marqueur, la densité de la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM) a été analysée et comparée à l'ensemble des coupes du même bloc. Les densités obtenues en CT et en IM, pour le marqueur CD3, sont peu variables pour chacun des blocs (Figure 20.A). Cette variabilité est un peu plus prononcée pour le marqueur CD8 (Figure 20.B). Toutefois, les différences observées ne sont pas suffisantes pour modifier l'évaluation de l'Immunoscore (IS), en 3 groupes (Lo : I0-I1, Int : I2, Hi : I3-I4) (Tableau 3).

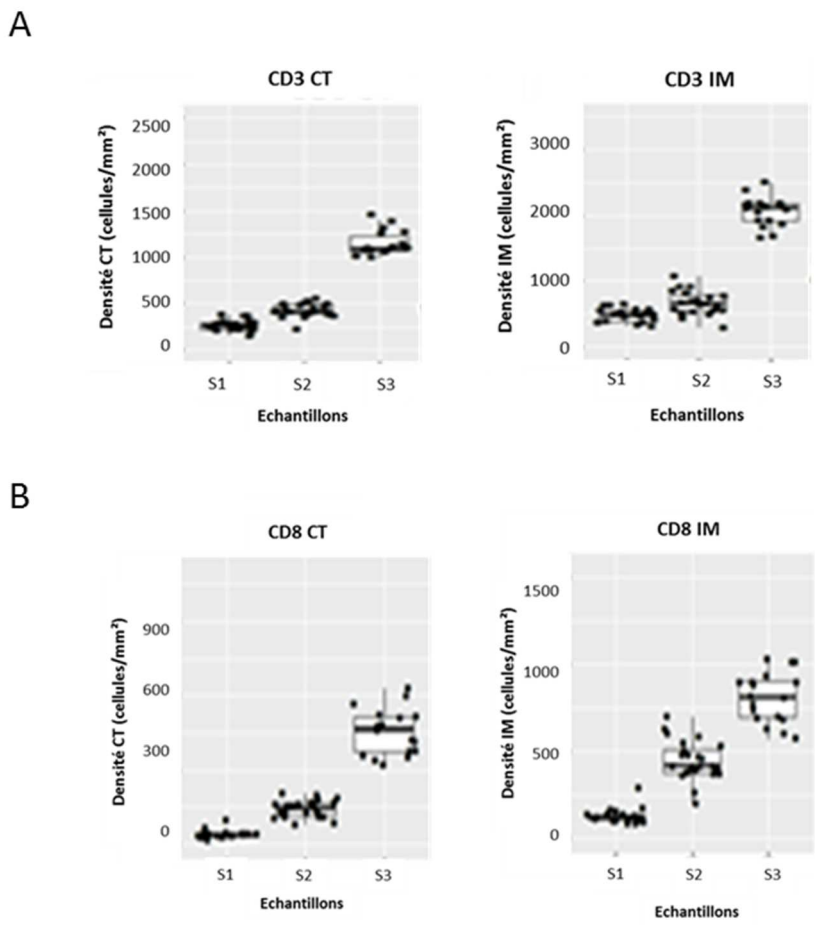


Figure 20. Variabilité de l'Immunoscore (IS) en fonction du niveau de coupe sur un même bloc. Box Plot de la densité immunitaire CD3+ (A) et CD8+ (B) de chaque coupe d'un bloc dans chaque région CT et IM respective.

Immunoscore Échantillons	Lo (I0-I1)	Int (I2)	Hi (I3-I4)
S1	**20**	0	0
S2	0	**24**	0
S3	0	0	**18**

Tableau 3. Evaluation de l'Immunoscore en 3 groupes : Lo : I0-I1, Int : I2, Hi : I3-I4, pour chaque couple CD3+/CD8+ de chaque échantillon (S1, S2, S3)

2.4.2. Variabilité du test Immunoscore en fonction du choix du bloc tumoral

Plusieurs blocs tissulaires FFPE sont éligibles pour l'évaluation de l'Immunoscore d'un patient atteint d'un cancer du côlon. Nous avons analysé la variabilité qu'il pourrait exister entre les différents blocs éligibles pour un même patient sur une cohorte de 166 patients atteints de cancer du côlon de stade II, selon la classification AJCC-UICC TNM. Parmi les blocs éligibles d'un patient, un bloc a été sélectionné (S) (voir le chapitre Matériel et Méthode), et un bloc a été tiré au sort (R, « Random »). Pour chaque bloc, deux coupes tissulaires ont été immunomarquées en CD3 et CD8, respectivement, et analysées. La figure 21 montre la comparaison entre la densité immunitaire des blocs sélectionnés (S) et des blocs tirés au sort (R) dans les deux régions CT et IM pour les deux marqueurs CD3 et CD8. La comparaison des moyennes entre la densité des blocs S et des blocs R pour chaque marqueur et chaque région ne montre pas de différence significative (p.value=0.97 pour CD3 CT ; 0.72 pour CD3 IM et p.value= 0.95 pour CD8 CT, 0.71 pour CD8 IM). On peut également remarquer une grande hétérogénéité de densité cellulaire entre patients.

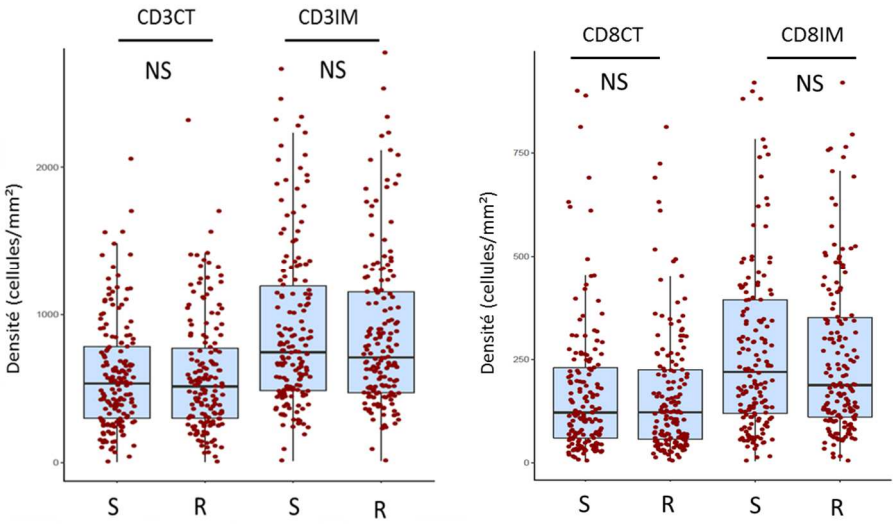


Figure 21. Variabilité de la quantification immunitaire en fonction du choix du bloc. Comparaison de la densité immunitaire sur une cohorte de 166 patients entre le bloc sélectionné (S) et le bloc « Random » (R) ; p (CD3CT) = 0.97 ; p (CD3IM) = 0.72 ; p (CD8CT) = 0.95 ; p (CD8IM) = 0.71 (t-test apparié).

L'Immunoscore a été évalué en 3 groupes [Lo (I0-I1), Int (I2) et Hi (I3-I4)], et comparé entre le bloc S et R. Il a été observé dans la cohorte de 166 patients que 9% des cas ont une différence d'1 score entre le bloc sélectionné et le bloc « random » pour le groupe « Lo », 9% pour le groupe « Int » et 15% pour le groupe « Hi » (Tableau 4).

n=166		**Blocs sélectionnés (S)**		
Blocs "Random" (R)	**Score**	**Lo (I0-I1)**	**Int (I2)**	**Hi (I3-I4)**
	Lo (I0-I1)	48	7	
	Int (I2)	5	78	4
	Hi (I3-I4)		1	23

Tableau 4. Comparaison de l'Immunoscore, en 3 groupes (Lo : I0-I1, Int : I2, Hi : I3-I4), entre le bloc sélectionné (S) et le bloc « Random » (R) pour chaque patient d'une cohorte de n=166 patients.

2.5. Comparaison intercentre de l'Immunoscore

Afin d'évaluer la variabilité intercentre, trois cohortes de patients atteints de cancer du côlon (Belgique = 119 patients ; HEGP = 101 patients, Commerciaux (HDX) = 24) ont été analysées. Pour chaque patient, deux échantillons respectifs composés de 2 coupes tissulaires adjacentes issues d'un bloc FFPE sélectionné ont été immunomarqués en CD3 et CD8, numérisés et analysés respectivement par le centre de référence, l'HEGP à Paris, et par la société HalioDX (HDX), Marseille. Une bonne corrélation des densités immunitaires en CD3 et en CD8 dans les

deux régions CT et IM a été observée entre les deux centres, le coefficient de corrélation de Pearson étant respectivement de 0.95 pour la quantification du CD3 en CT et IM entre les deux centres et de 0.91 pour le CD8 (Figure 22). En comparant l'IS (en 3 groupes) de la cohorte de Belgique entre les deux centres, 88% des patients ont obtenu une concordance identique, 2% des patients ont eu une différence d'un score de +1 et 8% ont eu une différence d'un score de -1 (Tableau 5). La concordance du test entre 2 laboratoires est donc validée.

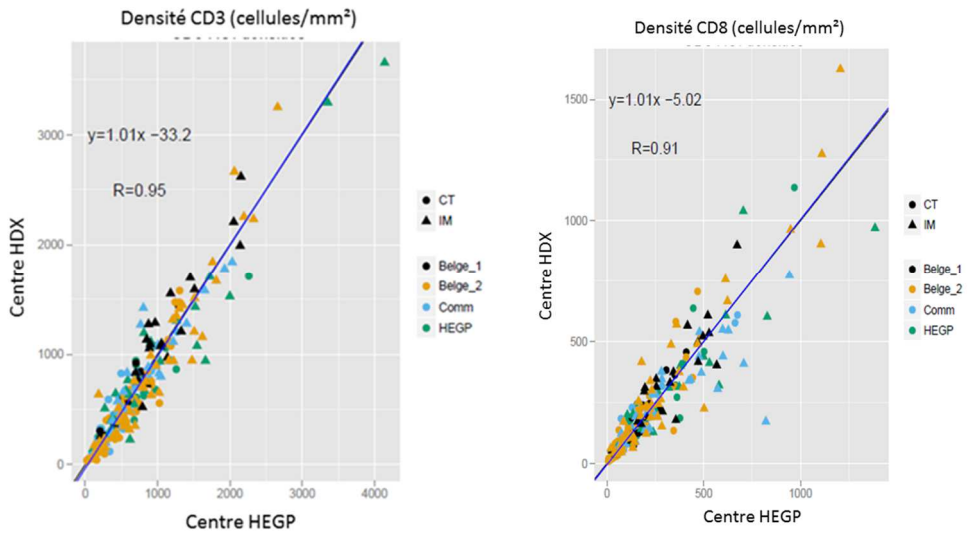


Figure 22. Comparaison intercentre du test Immunoscore. Corrélation de Pearson entre la densité immunitaire CD3+, CD8+ dans les deux régions CT et IM de deux cohortes (n Total = 244 ; Belgique, n=119 ; HEGP, n=101 ; blocs Commerciaux (Comm.) = 24).

n=119		**Centre Paris**		
HalioDX	**Score**	**Lo (I0-I1)**	**Int (I2)**	**Hi (I3-I4)**
	Lo (I0-I1)	36	5	
	Int (I2)	2	52	5
	Hi (I3-I4)			17

Tableau 5. Evaluation de l'Immunoscore en 3 groupes (Lo : I0-I1, Int : I2, Hi : I3-I4), sur la cohorte de Belgique (n=119) entre le centre HEGP et le centre HalioDX (HDX).

2. Validation clinique du test Immunoscore chez des patients atteints de cancer du côlon : étude rétrospective multicentrique internationale

2.1. Normalisation intercentre de la méthode d'analyse

Une étude internationale rétrospective a été réalisée pour introduire l'Immunoscore en pratique clinique et valider sa méthode auprès de nombreux laboratoires anatomopathologistes. Un consortium mondial a été mis en place en réunissant 14 centres dans 13 pays. La normalisation des protocoles a été coordonnée par le centre référent de Paris (HEGP, plateforme Immunomonitoring). Avant toute analyse des cohortes de chaque centre, une étape de normalisation a été effectuée pour évaluer la qualité de marquage. Deux lames issues de 3 blocs FFPE de tissu de cancer du côlon, réalisées par le centre Suisse, Bern, ont été envoyées et immunomarquées respectivement en CD3 et CD8 par chaque centre selon un protocole d'immunomarquage recommandé. Les lames adjacentes aux lames envoyées à chaque centre ont également été immunomarquées en parallèle par le centre référent de l'HEGP en CD3 ou en CD8 (Figure 23). Cent soixante-dix lames ont été analysées et comparées sur l'ensemble des 14 centres.

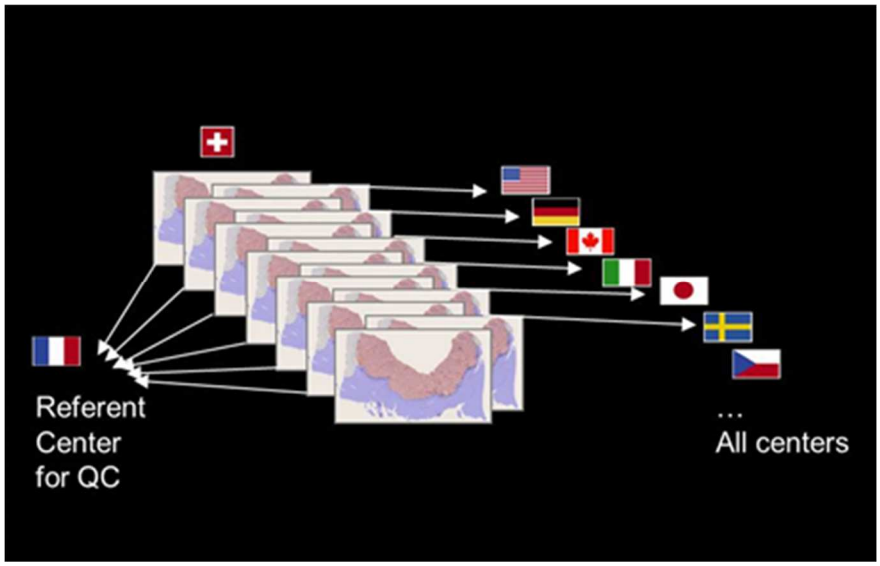
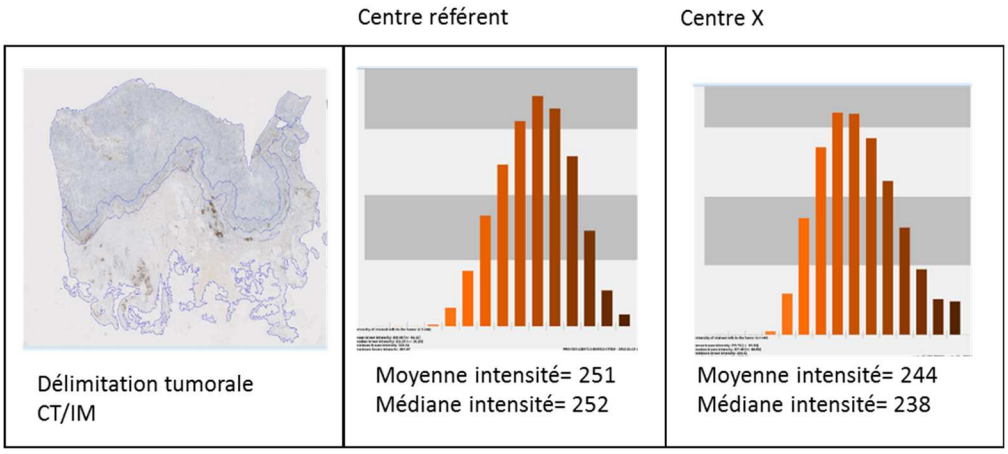


Figure 23. Méthode de normalisation des protocoles d'immunomarquage CD3, CD8. Pour un immunomarquage, une lame d'un bloc FFPE est envoyée et immunomarquée par un centre selon un protocole recommandé ; la lame adjacente est immunomarquée par le centre référent.

Le centre référent HEGP a analysé les lames de chaque centre avec le logiciel d'analyse d'image. Le marquage a tout d'abord été évalué qualitativement (absence de bruit de fond,

homogénéité du marquage et de la contre-coloration du tissu). Puis, la moyenne d'intensité de marquage CD3, CD8 de la lame immunomarquée par le centre X a été comparée à celle de la lame adjacente, immunomarquée par le centre référent (Figure 24). Si la différence obtenue entre les deux moyennes comparées, était supérieure à 20%, le protocole d'immunomarquage du marqueur analysé était alors à nouveau optimisé par le centre X (Figure 24.A),

A



B

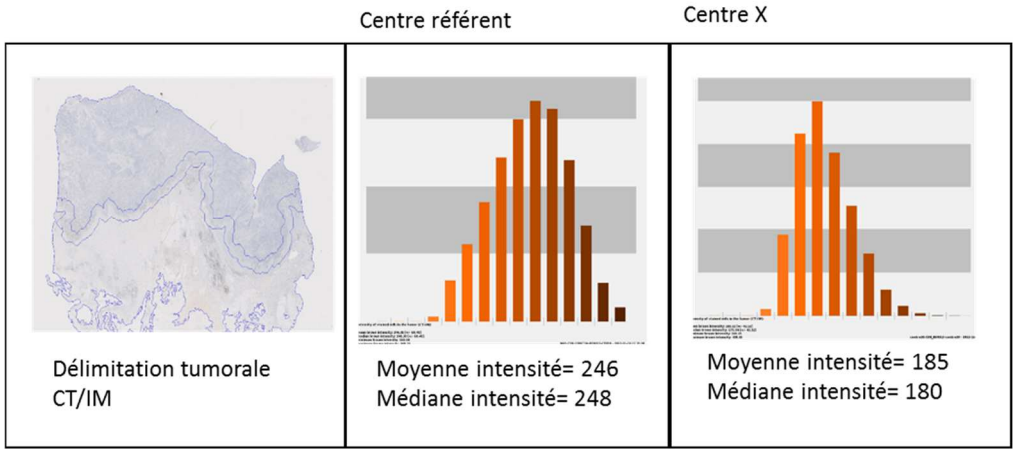


Figure 24. Comparaison de la valeur de la moyenne d'intensité de marquage CD3, CD8 entre le centre X et le centre référent sur deux lames adjacentes d'un bloc FFPE. Les valeurs des moyennes d'intensité du marquage étaient soit similaire (A) soit présentaient une différence supérieure à 20% et n'étaient pas validées (B).

2.2. Hétérogénéité de la densité lymphocytaire dans la région tumorale chez des patients atteints de cancer du côlon

La cohorte internationale de 3593 patients atteints de cancer du côlon stade I/II/III, nous a permis d'évaluer l'hétérogénéité de la densité lymphocytaire dans les régions tumorales (CT et IM). La figure 25 montre cette hétérogénéité. La population lymphocytaire CD3+ pour un patient peut être de densité faible (<10 cellules/mm²) à très forte (> 10000 cellules/mm²) dans la tumeur (CT). Cinquante pour cent des patients de la cohorte ont une densité lymphocytaire comprise entre 1000 cellules/mm² et 5000 cellules/mm². Cette hétérogénéité a également été retrouvée dans la marge d'invasion avec les lymphocytes TCD3, ainsi qu'avec la population lymphocytaire cytotoxique (CD8+) dans les deux régions tumorales analysées CT et IM (Données non montrées).

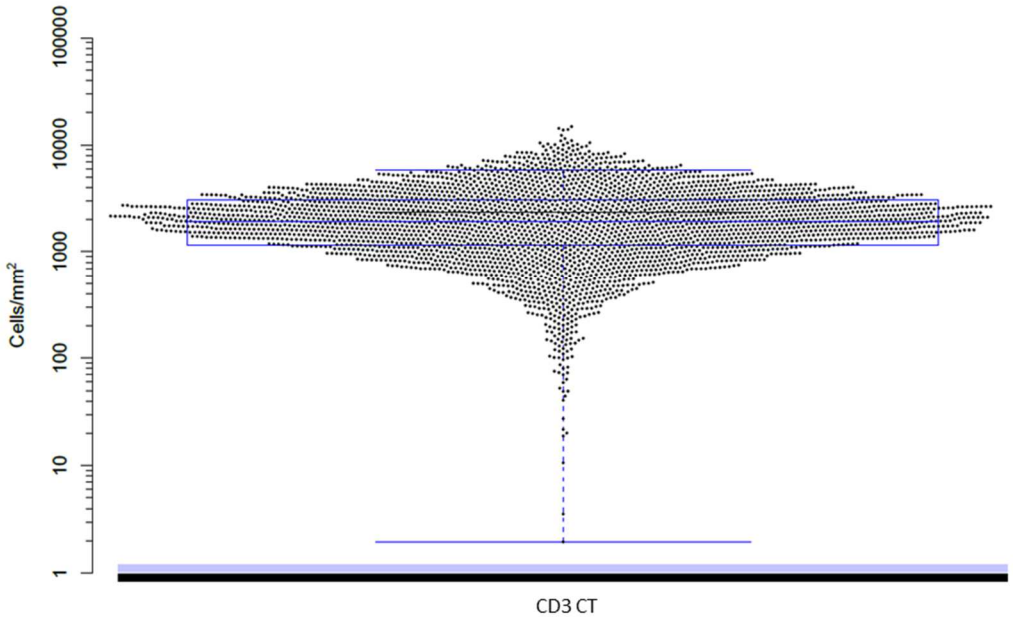


Figure 25. Hétérogénéité de la densité lymphocytaire T (CD3) parmi les patients (n=3855 patients). Quantification immunitaire des lymphocytes T (CD3) dans la tumeur (CT).

2.3. Evaluation pronostique de l'Immunoscore du cancer du côlon

2.3.1. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore

2.3.1.1. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore de la cohorte Test

A partir de la cohorte Test (n=700 patients), nous avons évalué la survie sans récidive (DFS) associée à l'Immunoscore des patients. Les Immunoscores ont été catégorisés en 3 sous-groupes : Lo (I0-I1), Int (I2), Hi (I3-I4) (voir chapitre précédent « analyse de l'Immunoscore »). Dans la figure 26, les patients présentent un faible taux de rechute avec un Immunoscore Hi, après 5 ans de suivi clinique à l'inverse des patients catégorisés Immunoscore Lo.

Le taux de survie sans récidive des patients avec un Immunoscore Lo, Het et Hi sont respectivement de 67.3% (95%IC : 59.4-76.2), 81% (95%IC : 77.7-86.3) et 92.3% (95%IC : 88.2-96.6) (HR [Hi vs Lo] = 0.19; 95% IC, 0.10 - 0.37; p< 0.0001).

Des résultats similaires ont été obtenus en OS (data non montrée).

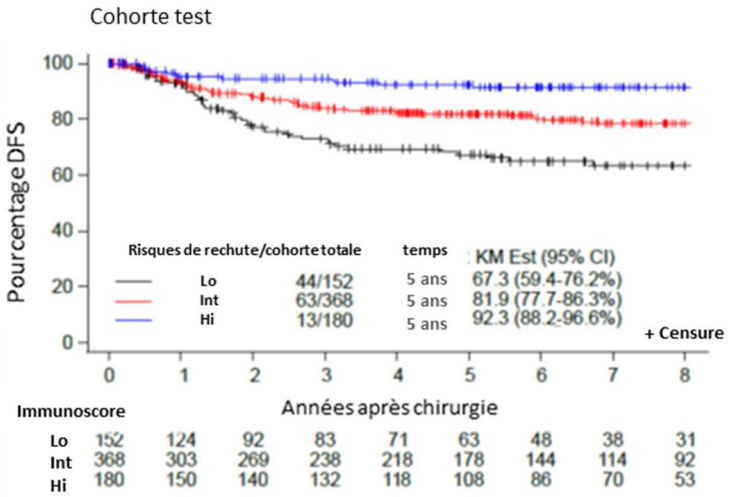


Figure 26. Cohorte Test (n=700 patients) : courbes de Kaplan-Meier illustrant le temps de survie sans récidive (DFS) de patients atteints de cancer du côlon stade I à III. Les Immunoscores ont été catégorisés en 3 sous-groupes (Lo : I0-I1, courbe noire ; Int : I2, courbe rouge ; Hi : I3-I4, courbe bleue).

2.3.1.2. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore des cohortes de validation

Deux cohortes de validation indépendante ont été analysées avec la même méthodologie que la cohorte Test (TS) : la cohorte de validation interne (IVS) avec n= 636 patients et la cohorte de validation externe (EVS) avec n= 969 patients.

En stratifiant l'Immunoscore en 3 sous-groupes [Lo (I0-I1, Het (I2), Hi (I3-I4)], les patients ont présenté un faible taux de récidive avec un Immunoscore Hi, à 5 ans de suivi clinique dans les deux cohortes de validation.

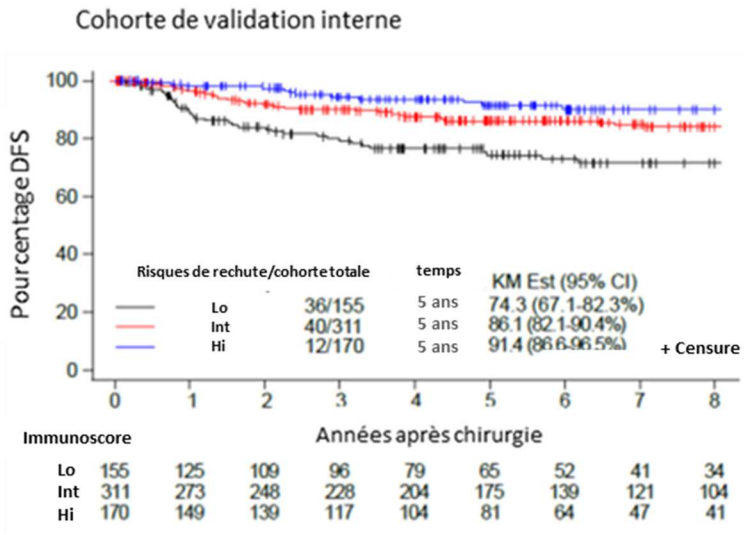
La cohorte IVS montre 91.4% ; 86.1% ; 74.3% de survie sans récidive (DFS), pour les Immunoscores Hi, Int et Lo, respectivement, (HR [Hi vs Lo] = 0.33; 95%IC, 0.22 à 0.49; p< 0.0001) (Figure 27.A).

Des résultats similaires ont été retrouvés dans la cohorte EVS, à un taux de survie à 5 ans, de 83.1% ; 72.0% ; 58.3% pour les Immunoscores Hi, Int et Lo, respectivement (Figure 27.B).

Ces deux cohortes de validation ont confirmé les résultats obtenus avec la cohorte Test.

Des résultats similaires ont également été retrouvés avec l'analyse de la survie globale (OS) associée à l'Immunoscore (Données non montrées).

A



B

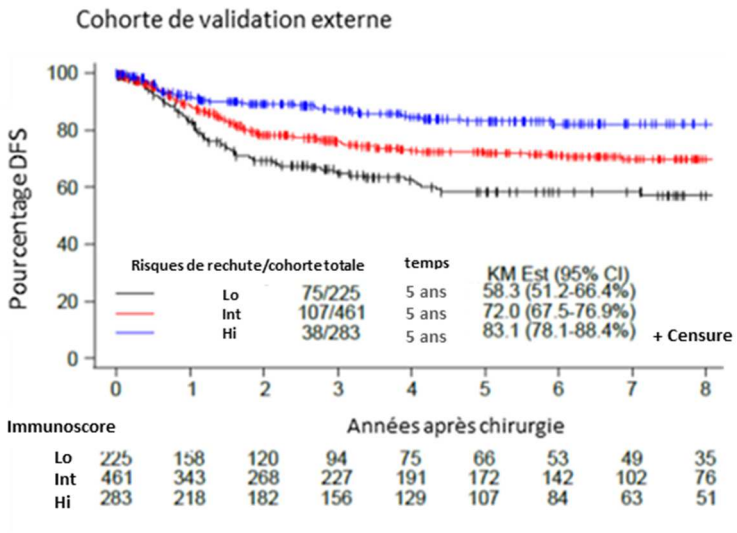


Figure 27. Cohorte de validation interne (IVS) (n=700 patients) (A) et de validation externe (EVS) (B) : Les courbes de Kaplan-Meier illustrent le temps de survie sans récidive (DFS) de patients atteints de cancer du côlon stade I à III, catégorisés par l'Immunoscore en 3 sous-groupes (Lo : I0-I1, courbe noire ; Int. : I2, courbe rouge ; Hi : I3-I4, courbe bleue).

2.3.1.3. Analyses multivariées associées à l'Immunoscore

En utilisant des analyses multivariées selon le modèle de Cox pour la DFS ajustées pour l'Immunoscore (IS), l'âge, le sexe, le stade T, stade N (Tableau 6), l'IS reste un facteur pronostique significatif en 2 groupes ($p<0.0008$) pour les 3 cohortes respectives, et est encore plus significatif en 3 ($p<0.0001$) et 5 groupes ($p<0.0001$) ou pour la totalité des patients ($p<0.0001$). L'index de concordance (C-index) montre également que l'IS est un bon marqueur

pronostique (c-index>0.5) pour l'ensemble des patients (cohorte Test, IVS, EVS) avec des valeurs respectives pour un Immunoscore catégorisé en 2 ; 3 et 5 groupes, de 0.73 (0.66-0.80), 0.73 (0.67-0.80) et 0.73 (0.67-0.80).

Ces résultats sont également obtenus en survie globale (OS) (Données non montrées).

	TS : Cohorte Test		IVS : Validation interne		EVS : Validation externe	
Immunoscore	P-Values	C-index	P-Values	C-index	P-Values	C-index
2 groupes	0.0008	0.72 (0.60-0.84)	0.0007	0.72 (0.60-0.84)	0.0076	0.72 (0.60-0.84)
3 groupes	<0.0001	0.73 (0.61-0.85)	0.0019	0.73 (0.61-0.85)	<0.0025	0.73 (0.61-0.85)
5 groupes	<0.0001	0.73 (0.61-0.85)	0.0007	0.73 (0.61-0.85)	<0.0048	0.73 (0.62-0.85)

Totalité des patients

Immunoscore	P-Values	C-index
2 groupes	<0.0001	0.73 (0.66-0.80)
3 groupes	<0.0001	0.73 (0.67-0.80)
5 groupes	<0.0001	0.73 (0.67-0.80)

Tableau 6. Analyses multivariées en DFS pour l'Immunoscore en 2 ; 3 ou 5 groupes de chaque cohorte, cohorte test (n=700 patients), de validation interne (n=636 patients) et de validation externe (n=969 patients) ou pour la totalité des patients (n= 2305).

2.3.2. Evaluation pronostique associée à l'Immunoscore et au statut MSI

Parmi nos analyses, nous avons combiné le statut de l'instabilité microsatellitaire (MSI ou MSS) à l'Immunoscore en 2 groupes, Lo (I0-I1) et Hi (I2-I3-I4). Nous avons évalué la survie sans récidive (DFS) de 1290 patients à partir de la cohorte totale (Test, IVS, EVS), pour lesquels le statut MSI était connu.

Les courbes de Kaplan-Meier (Figure 28) montrent que les patients catégorisés avec un Immunoscore fort [Immune-Hi (I-Hi)], ont un meilleur pronostic de survie sans récidive (DFS), indépendamment du statut MSI. En effet, les patients ayant un Immunoscore bas [Immune-Lo (I-Lo)], présentent un haut risque de récidive quelquesoit le statut MSI ou MSS.

Ainsi, la figure 28 montre un pronostic de survie sans récidive, à 5 ans, pour les patients « I/Lo – MSI » de 49% (95% IC : 35.2%-68.1%), et de 45.2% (95% IC : 39.1%-52.4%) pour les patients « I/Lo – MSS ». Les patients « I/Hi – MSI » présentent un pronostic de survie sans récidive à 5 ans de 78.0% (95% IC : 72.7%-83.8%), et de 67.2% (95% IC : 63.7%-70.8%) pour les patients « I/Hi – MSS ».

Des résultats similaires ont été observés en OS (figure non montrée).

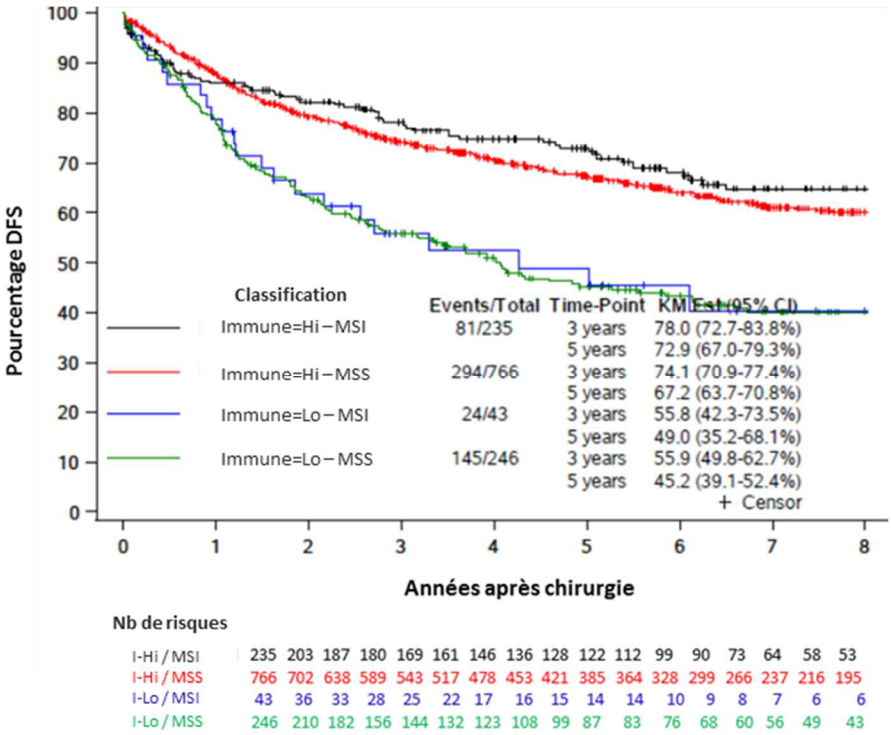


Figure 28. Courbes de survie sans récidive (DFS) associées à l'Immunoscore (I), catégorisé en 2 groupes (Immune-Hi : infiltrat immunitaire fort ; Immune-Lo : infiltrat immunitaire faible), et au statut MSI, MSS de patients atteints de cancer colique (n=1290 ; cohorte Test, IVS et EVS), (I-Hi/MSI : courbe noire ; I-Hi/MSS : courbe rouge ; I-Lo/MSI : courbe bleue ; I-Lo/MSS : courbe verte).

Dans un modèle de Cox, en analyses univariées, nous avons obtenu respectivement pour la DFS et l'OS un HR de 0.50 (95%CI : 0.42-0.61) avec une p.value, p<0.0001, et de HR=0.55 (95%CI : 0.45-0.67). En analyses multivariées ajustées pour l'Immunoscore, l'âge, le sexe, le stade-T, le stade-N et le statut MSI, nous avons obtenu respectivement pour la courbe de DFS et OS, un HR = 0.56 (95%CI : 0.46-0.67) (p.value <0.0001), et un HR = 0.59 (95%CI : 0.48-0.72) (p.value <0.0001) (Annexe 2).

Ainsi, l'association du statut de l'instabilité microsatellitaire à l'Immunoscore n'apporte pas une meilleure évaluation pronostique de la survie sans récidive ou globale du patient.

3. Exploration de l'infiltrat immunitaire dans les cancers du rectum

3.1. Représentativité des populations immunitaires évaluée sur des biopsies de cancer du rectum

Les patients atteints de cancer du rectum localement avancé sont majoritairement traités par radiochimiothérapie (RCT). La réponse à ce traitement entraine de fortes modifications histologiques. Par conséquent, l'évaluation de l'Immunoscore sur la tumeur primaire n'était pas applicable chez une majorité des patients atteints de cancer du rectum. Pour pallier à cette impossibilité technique, nous avons analysé l'infiltrat immunitaire initial présent sur les biopsies à visée diagnostique de ces patients.

Cependant, comparée à la surface analysée de la pièce opératoire (bloc FFPE), la surface tumorale des biopsies est très petite. En moyenne, elle représente 12% de la surface tumorale des pièces opératoires correspondantes (Figure 29.A). Afin d'évaluer la représentativité de l'infiltrat immunitaire, estimée sur les biopsies diagnostiques, nous avons comparé la moyenne de la densité immunitaire obtenue à partir de ces biopsies à celle observée dans les régions tumorales de la pièce opératoire correspondante chez des patients non traitées par RCT (n=12). Les densités en LT CD3+ et CD8+ des biopsies n'étaient pas significativement différentes des densités observées sur les coupes tumorales issues des pièces opératoires des mêmes patients ($p>0,05$) (Figure 29.B). Il est donc concevable d'analyser l'infiltrat immunitaire sur les biopsies.

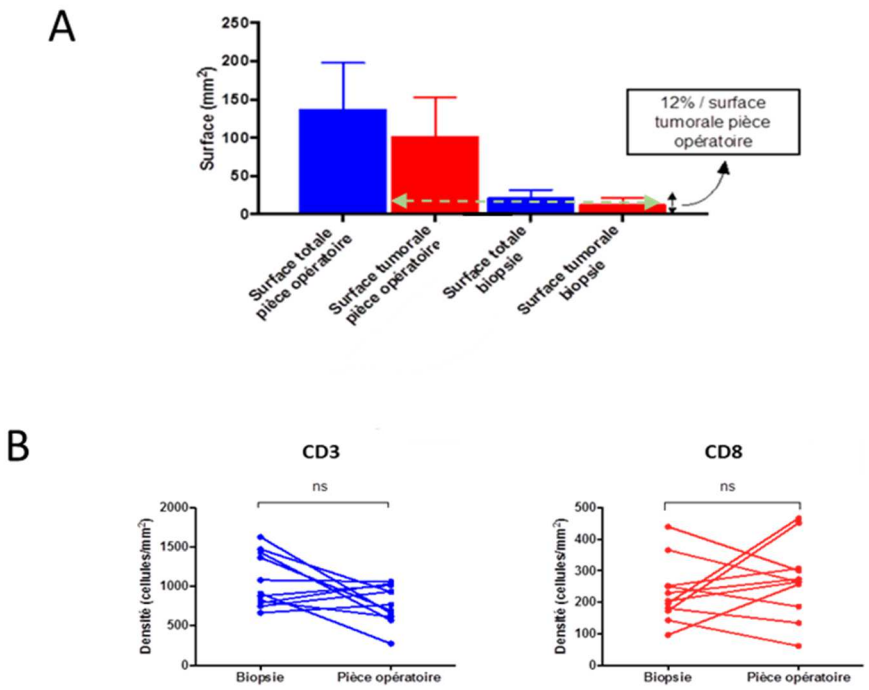


Figure 29. Surfaces tissulaires des biopsies et des coupes tumorales de pièces opératoires correspondantes de 12 cas de cancer du rectum non traités par RCT (A). Comparaison des densités en CD3 (bleu) et en CD8 (rouge) observées dans les régions tumorales des biopsies et des coupes tumorales de pièce opératoire correspondantes (p>0.05) (B).

3.2. Infiltrat immunitaire et prédiction à la réponse RCT

La densité immunitaire a été analysée à partir de biopsies entre un groupe de patients répondeurs à la RCT (n=45) et un groupe de patients non répondeurs (n=35) (cohorte de Belgique). La comparaison de la moyenne des densités de l'infiltrat immunitaire entre les patients bons répondeurs (Dvorak 3-4) et les patients non répondeurs à la RCT (Dvorak 0-1) montre une différence significative (CD3 : p=0,0257 ; CD8 p<0.001, Test Mann Whitney) (Figure 30).

De plus, une variabilité de la densité moyenne entre les patients a été observée dans chacun des groupes (CD3 : min = 10.1 - max = 6291 cellules/mm² ; pour le CD8 : min = 3.2 – max = 3017 cellules/mm²).

A. B.

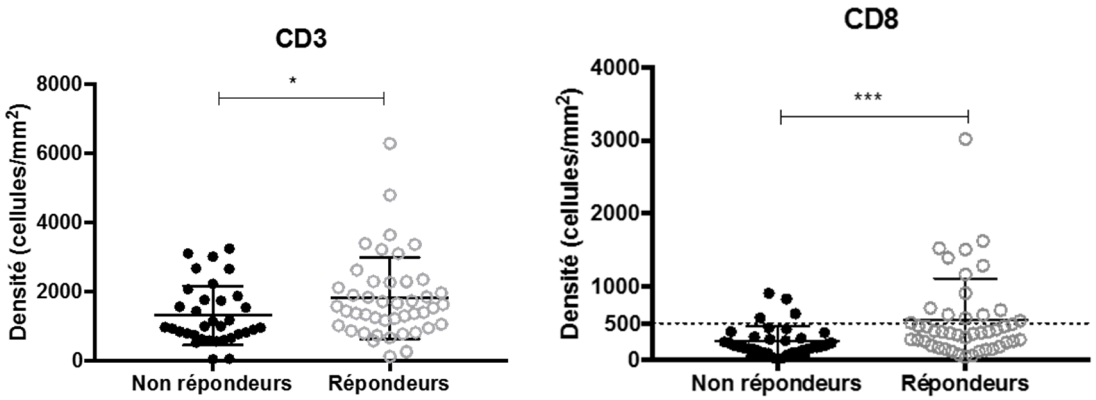


Figure 30. Comparaison des densités moyennes en lymphocytes CD3+ (A) et CD8+ (B) sur l'ensemble de la zone tumorale des biopsies de patients non répondeurs (n=35) à la RCT néoadjuvante (Dworak 0-1) et bons répondeurs (n=45) (Dworak 3-4). Un seuil de positivité a été fixé à 500 cellules CD8+/mm².

Dans l'hypothèse où un seuil de positivité serait fixé à 500 cellules /mm² pour le marqueur CD8+ sur les biopsies diagnostiques, il a été possible de catégoriser les patients prédictifs à une meilleure réponse à la RCT (Figure 30.B et tableau 7).

	Non répondeurs	**Répondeurs**	**Total**
Test positif (Densité CD8+< 500/mm²)	**31**	**30**	**61**
Test négatif (Densité CD8+> 500/mm²)	**4**	**15**	**19**
Total	**35**	**45**	**80**

Tableau 7. Tableau de contingence évaluant la densité en CD8 sur la biopsie diagnostique comme test prédictif de réponse à la RCT néoadjuvante. Seuil fixé à 500 cellules/mm2. Sn=89% ; SP=33% ; VPP=51%, VPN=79%. ***p<0.001

3.3. Modifications immunitaires induites par la RCT

3.3.1. Analyses d'expression de gènes « immunitaires » chez des patients traités et non traités, bons répondeurs et mauvais répondeurs

L'ARN issu de tumeurs du rectum, traitées ou non par une RCT néoadjuvante (cohorte Roumanie et Belgique), a été extrait à partir de coupes tissulaires épaisses (20 microns) issues des blocs tumoraux FFPE.

Quarante-huit gènes « immunitaires » (Annexe 3), préalablement sélectionnés par notre équipe pour leur valeur pronostique dans le cancer colorectal, a été analysés grâce à la technologie Nanostring, chez 32 patients traités et 13 patients non traités par RCT.

Dix-huit gènes sur les 48 étaient significativement plus exprimés chez les patients bons répondeurs (Dworak 3-4) que pour les patients non traités ou mauvais répondeurs à la RCT (Dworak 0-1).

Les gènes codant en particulier des protéines impliquées dans la cytotoxicité (*GNLY, GZMA, GZMK, GZMH, GZMM, PRF1*), dans la réponse Th1 (*CX3CL1, IFNγ, TBX21*), et dans l'activation T (CD69) étaient significativement plus exprimés chez les patients traités et bons répondeurs à la RCT que chez les patients non traités par la RCT néoadjuvante (Figure 31).

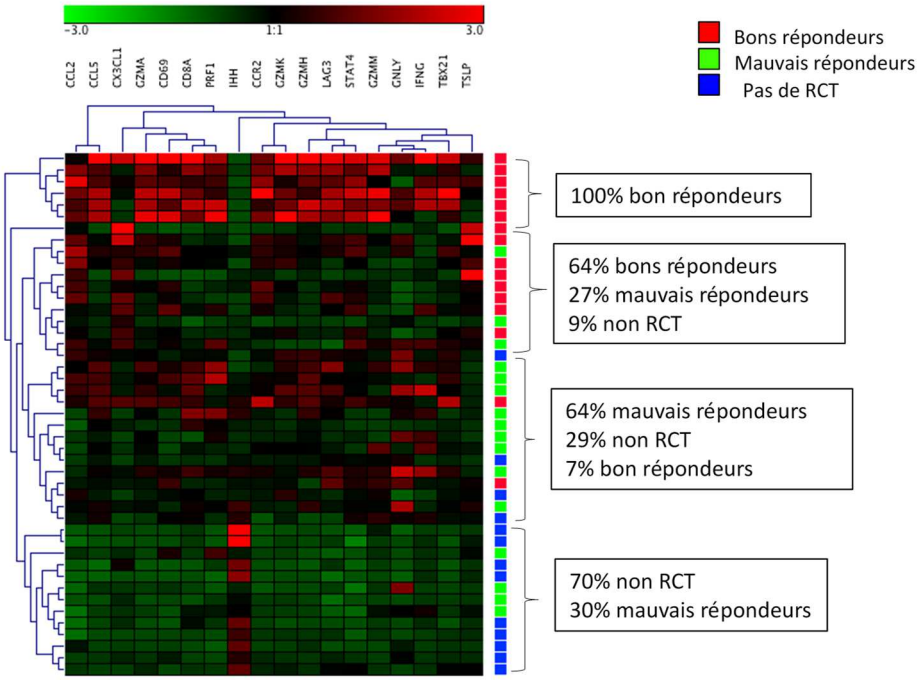


Figure 31. Expression de 48 gènes « immunitaires » analysée dans le microenvironnement tumoral chez 32 patients traités par RCT et 13 patients non traités par RCT. 18 gènes sur les 48 gènes analysés étaient différentiellement exprimés (test de Mann-Whitney, $p<0.05$) entre les 2 groupes de patients traités ou non à la RCT. Un clustering hiérarchisé des gènes non supervisés des patients a été réalisé. Parmi les différents clusters, on note un cluster composé de la majorité des patients sans RCT et un cluster composé de patients très bons répondeurs à la RCT (Dworak 3-4).

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

Parmi les patients traités à la RCT, nous avons comparé le niveau d'expression de gènes des 48 gènes analysés ci-dessus entre les patients bons répondeurs (Dworak 3-4) et les patients mauvais répondeurs (Dworak 0-1) à la RCT.

Comme décrit précédemment, une augmentation significative du niveau d'expression de gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GZMB, GZMK, GZMM*), dans la réponse Th1 (T*BX21*, *CD3E, STAT4*), dans l'activation T (*ICOS, CD69*), ainsi que des gènes codants pour des MCI (*LAG3*) a été observée chez les patients répondeurs. Le VEGF était quant à lui significativement plus faiblement exprimé chez les patients répondeurs (Figure 32).

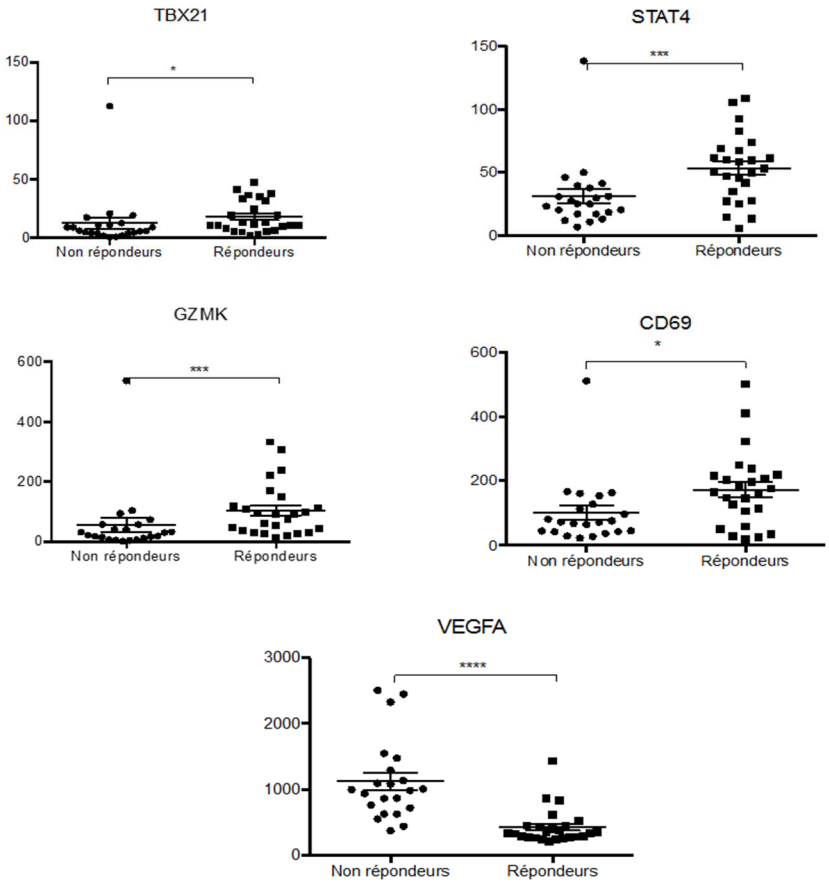


Figure 32. Comparaison du niveau d'expression de gènes immunitaires entre les patients non répondeurs (Dworak 0-1) et répondeurs (Dworak 3-4). Les gènes impliqués dans l'orientation Th1 (*TBX21, STAT4*), l'activation lymphocytaire (*CD69*), la cytotoxicité (*GZMK*) étaient significativement plus exprimés chez les répondeurs. Le VEGFA était plus exprimé chez les non-répondeurs. Test de Mann-Whitney, $p<0.05$

3.4. Infiltrat immunitaire et prédiction de survie chez les patients traités par la RCT

3.4.1. Analyse de la survie associée à l'infiltrat immunitaire chez les patients traités par RCT

La survie sans récidive (DFS) associée à la moyenne de la densité lymphocytaire CD3+, CD8+, (évaluée sur biopsies) a été analysée chez patients traités par RCT (n= 144 patients).

Les patients, ayant un fort infiltrat lymphocytaire initial (sur biopsie) en CD3 ou CD8, ont présenté un faible taux de rechute après 10 ans de suivi clinique (soit 15-20% de taux de rechute). Le taux de rechute des patients ayant un faible infiltrat lymphocytaire est significativement différent avec 50% en CD3, HR corrigé= 3,23 (95%IC : 1.85%-6.68%) ; p-corrigé=0.00469], et 65% en CD8, HR corrigé= 2.29 (95%IC : 1.4%-6.65%) ; p-corrigé = 0,14 (Figure 33).

Des résultats similaires ont été obtenus pour la survie globale (OS) (Donnée non montrée).

A B

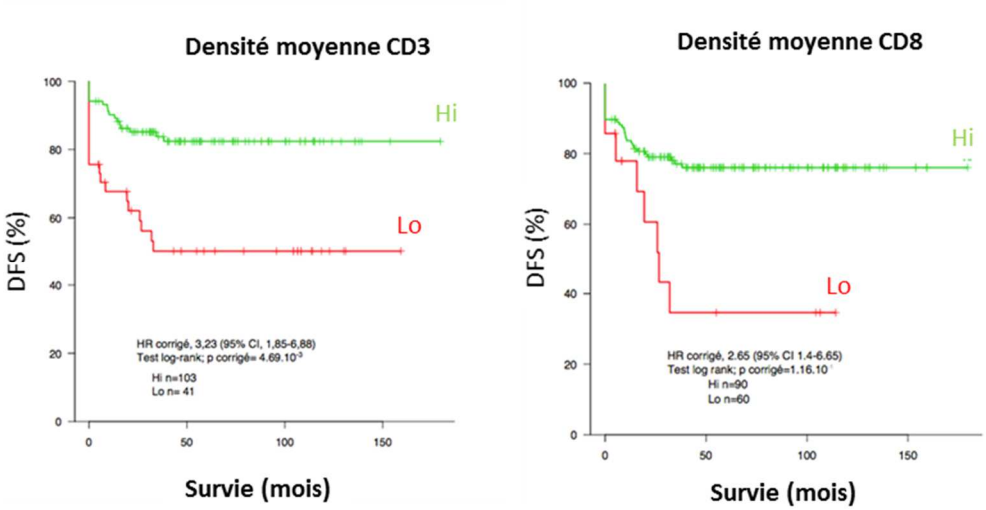


Figure 33. Courbes de survie sans récidive associées à l'infiltrat immunitaire évalué à partir de biopsie. Patients présentant un fort infiltrat immunitaire (Hi ; courbes vertes) vs faible (Lo ; courbes rouges) en CD3+ (A) ou CD8+ (B) à partir de biopsies diagnostiques (n=144).

3.4.2. Analyse de la survie des patients associées aux données immunitaires issues des biopsies, et à l'évaluation histologique de la réponse à la RCT sur la pièce opératoire (Score de Dworak)

Pour évaluer la réponse à la RCT, un score Dworak peut être déterminé par histologie sur la pièce opératoire après son exérèse. Ce score permet de catégoriser les patients mauvais répondeurs à la RCT (D0-D1), les patients partiellement répondeurs (D2) et les patients répondeurs à la RCT (D3-D4).

Cependant un pourcentage de patients bons répondeurs à la RCT rechute précocement, à l'inverse des patients mauvais répondeurs à la RCT peuvent avoir un meilleur taux de survie.

L'analyse de la survie sans récidive (DFS) associée à la densité lymphocytaire initiale (sur biopsie) en CD3 (ou CD8, données non montrées), et à la réponse à la RCT néoadjuvante, évaluée après chirurgie (score Dworak) semble permettre de discriminer ces patients.

Les courbes de DFS (Figure 34) montrent que les patients présentant un fort infiltrat immunitaire initial (Hi) avaient un faible taux de récidive, même en présence d'une mauvaise réponse à la RCT (Dworak D0 et D1). A l'inverse les patients, ayant une bonne réponse à la RCT

(Dworak D3 et D4) mais un faible infiltrat immunitaire initial (Lo), présentaient un fort taux de récidive.

Il serait donc possible de mieux discriminer les patients justifiant d'un traitement adjuvant après chirurgie à partir d'une analyse de la densité immunitaire initiale sur biopsie combinée à la réponse à la RCT néoadjuvante.

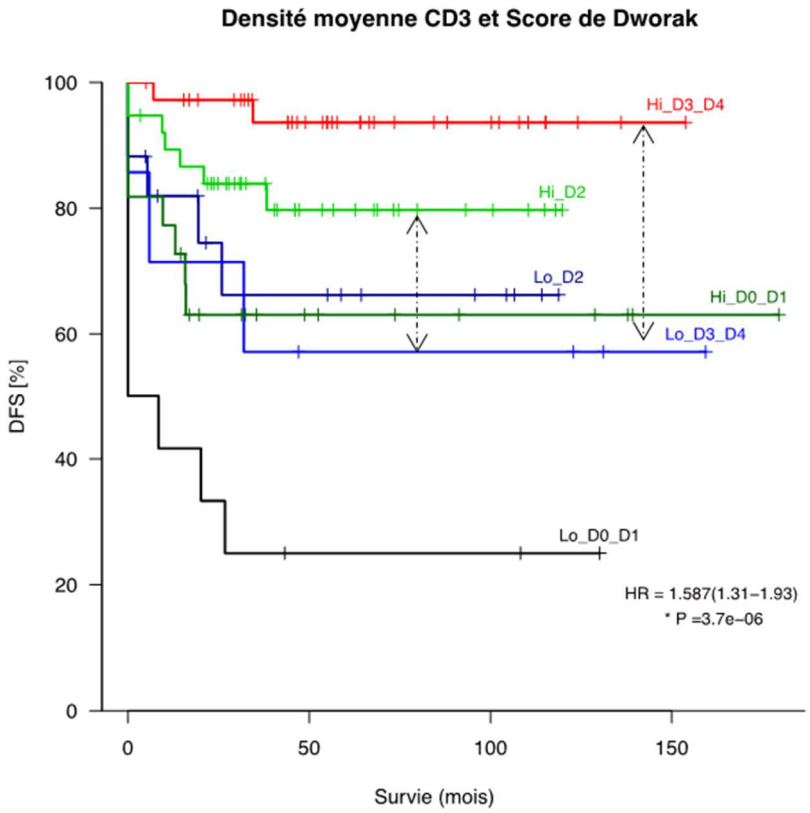


Figure 34. Courbes de survie sans récidive (DFS) associées à la combinaison à l'infiltrat immunitaire (CD3) et à l'évaluation histologique de la réponse à la RCT post-chirurgie (score de Dworak). Le score Dworak catégorise les patients bons répondeurs à la RCT (D3-D4), les patients partiellement répondeurs (D2) et les patients mauvais répondeurs à la RCT (D0-D1). Ce score a été associé à l'infiltrat immunitaire CD3+ initialement présent dans les biopsies, catégorisé en 2 groupes : fort (Hi) et faible (Lo).

3.4.3. Association des données immunitaires et de l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (ycTNM)

Nous avons également analysé l'intérêt de combiner l'évaluation immunitaire initiale sur biopsies diagnostiques à l'évaluation clinique obtenue en imagerie après la RCT et avant la chirurgie d'exérèse (classification ycTNM).

Les courbes de Kaplan-Meier montrent un faible taux de récidive chez des patients présentant une forte infiltration immunitaire initiale (Hi) même en présence d'une tumeur résiduelle post-RCT (stade II et III) évaluée en imagerie (ycTNM) (Figure 35).

En effet, l'association des données immunitaires à la classification ycTNM permet de mieux discriminer au sein d'un même stade, les patients à risque de récidive. Ainsi, dans la cohorte analysée, 5% des patients ayant un fort infiltrat CD3+ initial (Hi) rechutent avec une réponse au traitement classée ycTNM_stade II (Hi-ycTNM_II) contre 40% des patients de classe ycTNM-II, ayant un infiltrat CD3+ initial faible (Lo). De même, 15% des patients catégorisés Hi-ycTNM-III rechutent contre 35% des patients catégorisés Lo-ycTNM_III.

Ainsi, l'évaluation immunitaire initiale associée à la classification ycTNM semble être une bonne combinaison afin de mieux définir les patients pouvant bénéficier d'une chirurgie à minima ou d'un traitement « Watch and Wait » (traitement RCT sans chirurgie ; surveillance de l'évolution tumorale par imagerie).

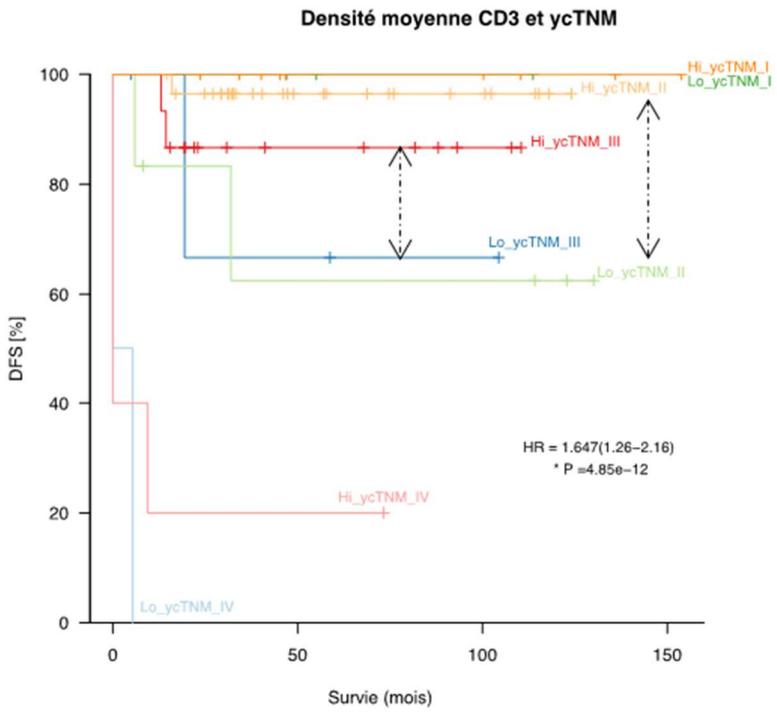


Figure 35. Courbes de survie sans récidive (DFS) associées à l'évaluation de l'infiltrat immunitaire (CD3) à partir de biopsies, et à l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (classification ycTNM). Classification ycTNM de la réponse à la RCT par imagerie (d'un stade I : résidu tumoral, à un stade IV : présence de la tumeur). Catégorisation de l'infiltrat immunitaire CD3+ en 2 groupes évalué sur biopsie : fort infiltrat immunitaire (Hi) et faible infiltrat immunitaire (Lo)

3.5. Conséquences thérapeutiques potentielles : stratégie de Watch and Wait

Ces dernières années, une volonté d'une chirurgie moins délabrante, de préservation des fonctions et de qualité de vie des patients a été recherché. Cependant des marqueurs prédictifs à la survie et à la réponse au traitement manquent pour identifier les patients favorables à être inclus dans des protocoles de stratégie « Watch and Wait ».

Suite aux résultats obtenus précédemment, l'évaluation de la densité lymphocytaire CD3 et CD8 sur les biopsies initiales de patients en réponse clinique complète post-RCT néoadjuvante non traité par chirurgie, pourrait être ces marqueurs de prédiction.

Une cohorte de 52 patients de 4 centres différents pratiquant la stratégie du « Watch and Wait » (Sao Paulo, Pr Harb Gama ; Buenos Aires, Dr Soledad ; Nice, Pr Gérard et Poitiers, Pr Tougeron) a pu être regroupée. Sur les 52 patients suivis en « Watch and Wait », 13 ont présenté une rechute : locale (n=8) ou à distance (n=5) (Figure36).

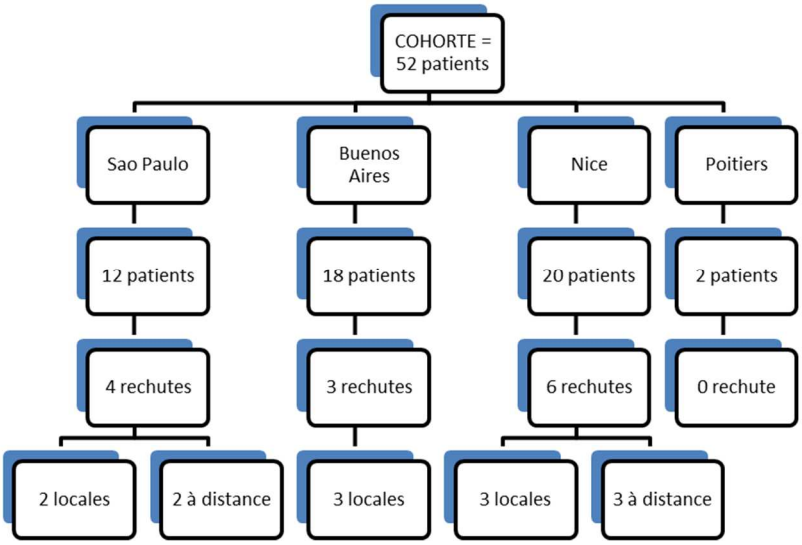


Figure 36. Diagramme descriptif des cohortes suivi en Watch and Wait.

Nous avons comparé la moyenne des densités lymphocytaires CD3 (et CD8, données non montrées) évaluée sur biopsies chez les patients ayant rechuté précocement (< 2 ans) ou tardivement (> 2 ans) après traitement, et les patients avec une absence de rechute (Figure 37). Une différence significative ($p = 0.0373$) a été observée entre le groupe de patients avec une absence de rechute (densité moyenne CD3+ =1329/mm²) et les patients ayant eu une

rechute (densité moyenne CD3+ = 862.8/mm²). On note que les patients ayant fait une rechute précoce (< 2 ans) avaient une densité en CD3 significativement plus basse que le groupe de patients sans rechute (p = 0.0048).

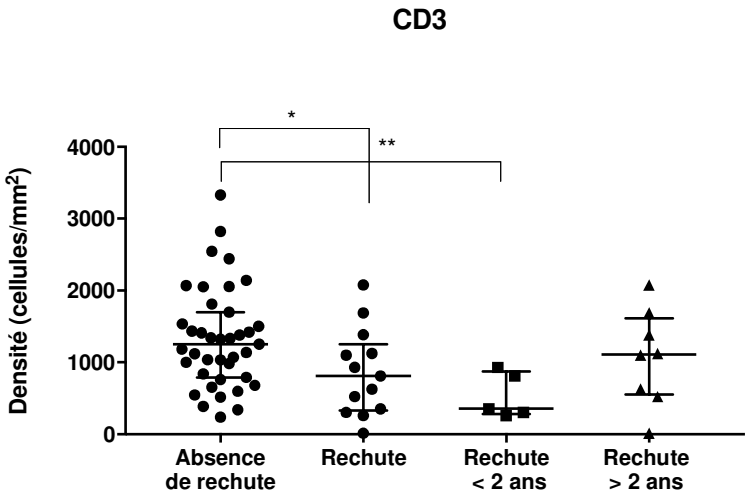


Figure 37. Moyenne des densités en CD3 sur les biopsies diagnostiques de patients suivis en « Watch and Wait » dans les groupes « Absence de rechute », « Rechute » et dans les sous-groupes « Rechute précoces » (<2 ans) et « rechutes tardive » (>2 ans). Différence significative entre les groupes « Absence de rechute » et « rechute » (p=0.0373) ainsi que « rechute précoce » et « rechute tardive » (p=0.0048).

Les courbes de Kaplan Meier (Figure 38) montrent la survie sans récidive des patients associée à l'infiltration immunitaire (combinaison CD3/CD8). L'évaluation de l'infiltrat immunitaire a été catégorisée en 3 groupes : les patients présentant un fort infiltrat en CD3 et CD8 (Hi-Hi), les patients présentant un infiltrat immunitaire en CD3 ou CD8 hétérogène (Het) et les patients présentant un faible infiltrat en CD3 et CD8 (Lo-Lo). Une différence à la limite de la significativité a été observée entre les différents groupes de patients (HiHi, LoLo, Het) sur le critère de la DFS (HR_corrigé = 2.03, 95%IC : 1.23%-5.53% ; p_corrigé = 0.0514).

CD3-CD8

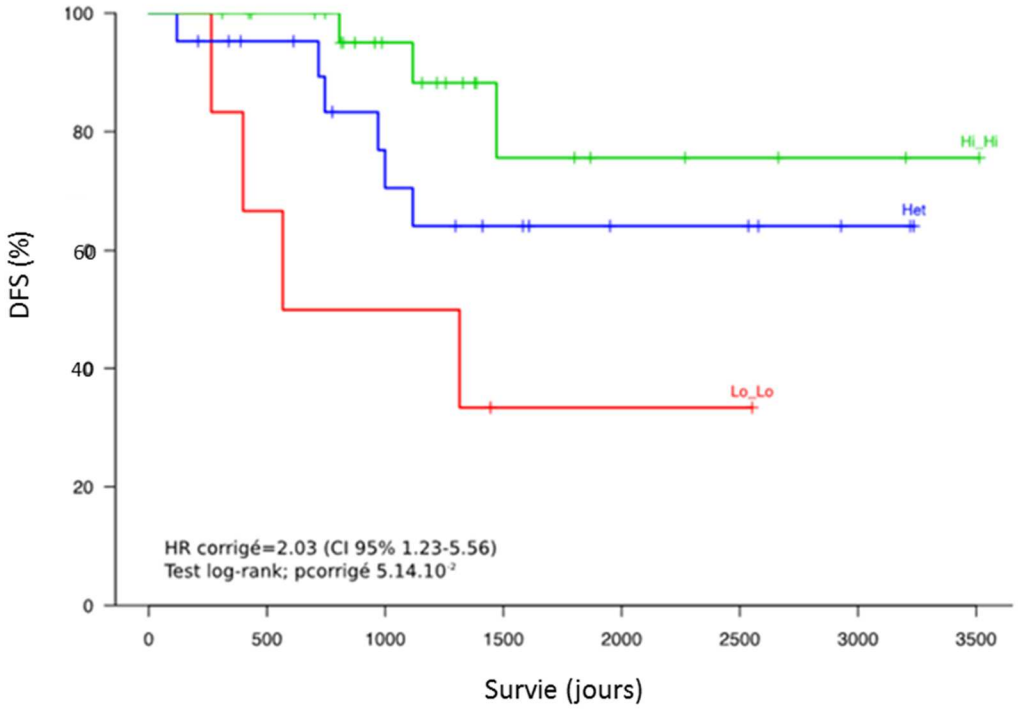


Figure 38. Courbes de survie sans récidive (DFS) associées à l'évaluation de l'infiltrat immunitaire (combinaison de CD3 et CD8). Un Immunoscore « dérivé » en 3 groupes a été appliqué à l'analyse de l'infiltrat immunitaire sur biopsies. Les patients présentant un infiltrat fort en CD3+ et CD8+ (Hi-Hi, courbe verte), les patients présentant un faible infiltrat en CD3+ et CD8+ (Lo-Lo, courbe rouge) et les patients présentant un infiltrat fort en CD3+ et faible en CD8+ ou faible en CD3+ et fort en CD8+ (Het, courbe bleue : Hi-Lo ou Lo-Hi).

DISCUSSION

1. Valeur pronostique et thérapeutique de l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs : nécessité d'introduire de nouveaux biomarqueurs immunitaires en pratique clinique

Des progrès importants ont été réalisés en cancérologie dans la perception du pronostic grâce aux recherches effectuées sur la composante immunitaire du microenvironnement tumoral.
Il est désormais établi que les tumeurs solides humaines présentent un infiltrat polymorphe et variable d'un patient à l'autre. Cet infiltrat est composé de macrophages, de cellules dendritiques, de polymorphonucléaires, de cellules NK et de cellules de l'immunité adaptative telles que les lymphocytes B et T.
Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche a montré qu'un fort infiltrat lymphocytaire présent dans les tumeurs colorectales était associé à une survie prolongée des patients. En effet, de nombreuses études de notre équipe, ont révélé qu'une forte infiltration intra-tumorale en lymphocytes T CD3+, cytotoxiques (CD8+), et mémoires (CD45RO+) était corrélée à une survie sans récidive prolongée et un accroissement de la survie globale (Pagès et al., 2005) (Galon et al., 2006) (Pagès F et al, J Clin Oncol 2009) (Mlecnik B et al, J Clin Oncol 2011). Cette contexture immunitaire a été, par la suite, montrée dans de nombreuses autres tumeurs solides (Fridman et al., 2012).
De ce fait, l'évaluation immunitaire au niveau de la tumeur permettrait de mettre en place d'excellents candidats biomarqueurs à visée pronostique. Elle pourrait également jouer un rôle de biomarqueur prédictif de réponse à de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ces thérapies telles que les agonistes des récepteurs Toll-like (TLR) (Vacchelli, Galluzzi, et al., 2012), les vaccinations à base de cellules dendritiques (Vacchelli, Martins, et al., 2012), les thérapies adoptives de lymphocytes T et les biothérapies utilisant des anticorps monoclonaux bloquant les antigènes inhibiteurs de la réponse immunitaire, ont montré une activité antitumorale significative, avec des taux de guérison parfois spectaculaires dans des essais cliniques de phases II et III. Récemment, des essais cliniques ont été réalisés afin de moduler des molécules clés qui régulent l'activation lymphocytaire T telles que les CTLA-4 et les PD-1 et les PDL-1. Il a été montré, dans des situations avancées de cancers métastatiques, que le

système immunitaire n'était pas un système inerte. Il reste un système en état de suppression réversible, caractérisé par la coexistence d'une immunité antitumorale et de mécanismes immunosuppresseurs (Tumeth et al., 2014). Cependant, seul un pourcentage restreint de patients répond à ces traitements et la prédiction à cette réponse reste difficile. La présence de biomarqueurs pronostiques robustes et prédictifs serait donc utile afin d'orienter le traitement vers une meilleure efficacité thérapeutique et une moindre toxicité. Elle permettrait également de diminuer les coûts associés à ces nouvelles thérapies.

Le test Immunoscore proposé par notre équipe est une analyse définie par l'association de deux biomarqueurs lymphocytaires T (CD3+) et cytotoxique (CD8+), évalués par immunohistochimie, dans la tumeur primaire (CT) et sa marge d'invasion (IM). Ainsi, ce test simple pourrait être introduit comme biomarqueur en pratique clinique pour des évaluations immunitaires de routine.

2. Performance intrinsèque de l'Immunoscore

L'intérêt que représente un bon marqueur pronostique, utilisable en routine clinique, est d'être simple, peu coûteux, rapide, robuste et reproductible (Galon et al., 2012).

Le test Immunoscore est basé sur une technique d'immunomarquage en DAB à partir de deux coupes adjacentes d'un même bloc de tissu tumoral. Les marqueurs CD3 et CD8 sont ensuite analysés dans les régions d'intérêt grâce à un logiciel d'analyse dédié.

Pour valider l'Immunoscore et l'introduire en routine clinique, la performance intrinsèque du test a été évaluée en intégrant les différents paramètres variables de l'analyse.

En effet, malgré la simplicité de cette technique d'analyse, plusieurs questions se sont posées du fait de la variabilité intrinsèque même de l'échantillon et de l'introduction de la pathologie digitale comme outil d'analyse. Ces problématiques ont déjà été abordées, par exemple dans l'évaluation du marqueur Ki67 en analyse standardisée et automatisée dans le cancer du sein (Zhong et al., 2016) (Røge et al., 2016).

Au cours de mon travail, j'ai donc évalué les performances du test Immunoscore en prenant en compte :

1. La variabilité induite par la technique : l'immunoréactivité des antigènes apporte une variabilité au niveau de l'intensité de marquage. Cette variabilité impliquerait une discordance dans la bonne détection et la quantification des cellules positives.

2. La variabilité induite par l'opérateur lors des analyses réalisées avec le logiciel d'analyse d'image.

3. La variabilité induite par l'échantillon : plusieurs blocs éligibles pour un même patient peuvent être sélectionnés et plusieurs coupes sur un même bloc peuvent être analysées. Nous avons donc évalué la variabilité qu'apporterait le choix du bloc ainsi que le niveau de coupe au sein d'un même bloc sur le test Immunoscore.

Variabilité induite par la technique :

En considérant que de nombreux facteurs influençaient l'immunoréactivité, en particulier les étapes pré-analytiques (Thompson et al., 2013), nous avons cherché à limiter l'influence de ces paramètres lors de l'analyse des marqueurs CD3 et CD8. La pathologie digitale, récemment introduite comme un outil d'analyse dans certains laboratoires d'anatomopathologie (Laurinaviciene et al., 2014), exige à fortiori une bonne qualité de marquage afin d'obtenir une très bonne détection des cellules « positives » et éviter la détection de « faux positifs ».

De ce fait, chaque coupe et chaque immunomarquage ont été réalisés avec une procédure standardisée : épaisseur de la coupe, délai minimum entre la coupe et l'immunomarquage, choix des clones des anticorps utilisés, procédure standardisée d'immunomarquage mise au point sur automate.

Malgré cette standardisation de la technique, nous avons observé une variabilité d'intensité de marquage entre les blocs de différents échantillons tumoraux. L'intensité du marquage évolue également en fonction de l'âge du bloc FFPE.

Un contrôle d'intensité de marquage a donc été introduit dans chaque analyse pour pallier à cette variabilité. Un seuil minimal de moyenne d'intensité de marquage (μ= 152 UA) a été recommandé pour valider les analyses de quantification de la cohorte internationale SITC.

Pour valider les quantifications réalisées par le logiciel d'analyse d'image dédié, nous avons cherché à obtenir une bonne corrélation entre la quantification du logiciel d'analyse d'image et une quantification « à l'œil ». La comparaison de ces deux méthodes de quantification montre une bonne performance du logiciel. En effet, une bonne corrélation a été obtenue entre le comptage du logiciel d'analyse d'image et le comptage de l'opérateur (R= 0.94 en CD3 ; R=0.92 en CD8). Cependant, on remarque que le comptage optique effectué par l'opérateur a ses limites : une discordance (erreur de comptage) a été observée pour de fortes

densités immunitaires. A partir d'un nombre important de cellules (900 cellules), l'œil de l'opérateur ne peut plus comptabiliser les cellules immunomarquées avec exactitude.
Le logiciel d'analyse d'image est également fiable dans la répétabilité du comptage d'un spot contrôle (CV< 1% ; données non montrées).

La variabilité induite par l'opérateur :

L'analyse de la quantification immunitaire à l'aide du logiciel d'analyse d'image est une méthode semi-automatique où l'opérateur intervient manuellement lors de la délimitation de la tumeur (CT). La marge d'invasion (IM) est ensuite détectée automatiquement en fonction de cette délimitation. Au cours de mon travail, j'ai montré que la variabilité introduite par un opérateur sur l'analyse d'une image répétée plusieurs fois reste faible. De même, j'ai vérifié que la variabilité induite par plusieurs opérateurs sur une même analyse d'image est également faible (Figures 17 et 22). Pour ces deux paramètres analysés, nous avons obtenu une bonne corrélation entre les résultats de densité.

La variabilité induite par l'échantillon *:*

La variabilité de l'échantillon a également constitué une problématique pour l'évaluation de l'Immunoscore. En effet, pour un même patient atteint de cancer colique, un ensemble de blocs éligibles est disponible. La sélection du bloc est réalisée sur une lame HES à partir de deux critères : 1. Un infiltrat immunitaire important dans la région tumorale ; 2. La présence de tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM). De plus, chaque bloc peut permettre d'obtenir un nombre important de coupes susceptible d'être utilisé pour l'analyse.
Malgré ces variabilités d'échantillonnage possibles de la tumeur, une bonne concordance (CV<10%) a été observée entre les niveaux de coupe d'un même bloc tumoral. De plus, la différence n'était pas significative entre la quantification immunitaire du tissu tumoral issu du bloc sélectionné, et la quantification du tissu tumoral issu d'un bloc tiré au sort parmi les blocs éligibles. Ainsi, en tenant compte de ces différents paramètres, une faible discordance a été trouvée lors de l'évaluation de l'Immunoscore (Tableau 4).

Enfin, en intégrant la variabilité de l'ensemble des paramètres (niveaux de coupes, clones des anticorps, automates, opérateurs), nous avons réalisé une comparaison d'une analyse Immunoscore entre deux centres (HalioDX, Marseille et HEGP, Paris). Nous avons pu ainsi

démontrer la performance de l'Immunoscore lorsque les échantillons étaient analysés par deux centres. En effet, une bonne corrélation des densités immunitaires quantifiées dans la tumeur et sa marge d'invasion a été obtenue entre les 2 centres (R=0.95 pour CD3 ; R=0.91 pour CD8). L'évaluation de l'Immunoscore (en 3 groupes : Hi, Int. Lo) entre les centres a également été performant. Nous avons obtenu 88% des patients catégorisés correctement et 12% des patients ayant une différence d'un score sur une cohorte de 119 patients.

Malgré la variabilité des paramètres induite par les étapes pré-analytiques, l'échantillon et l'opérateur, la performance du test Immunoscore a montré que l'Immunoscore était un test répétable, reproductible et fiable. L'Immunoscore pourrait donc être introduit dans les laboratoires de routine grâce à une analyse automatisée et standardisée.

3. Robustesse et puissance du test Immunoscore dans le cancer du côlon et implication clinique

En regroupant nos données collectées depuis plusieurs années sur de larges cohortes de cancer colorectal, notre équipe a montré que la densité des lymphocytes T (CD3, CD8 et CD45RO) observée dans la tumeur (CT) et son front d'invasion (IM) présentait un facteur favorable à la survie sans récidive et la survie globale (Galon et al., 2006) (Pagès et al., 2005) (Bindea et al., 2013). Les statistiques en analyse multivariée, nous ont également révélé, de façon inattendue, que la valeur pronostique des paramètres immunitaires était indépendante et supérieure à celle fournie par l'évaluation histopronostique de la tumeur (stade T, stade N) (Mlecnik et al., 2011).

De ce fait, en 2012, notre équipe a mis en place un consortium international (14 centres dans 13 pays) afin d'introduire le test Immunoscore comme un outil de pronostic en pratique clinique. Cette étude a permis, par ailleurs, de le valider sur une cohorte rétrospective internationale de plusieurs milliers de patients atteints de cancer colique (stade I/II/III (AJCC-UICC TNM)) et d'évaluer sa faisabilité en pratique clinique.

Comme décrit précédemment, la quantification de l'infiltrat immunitaire réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image demande une bonne qualité de marquage immunohistochimique c'est-à-dire une forte intensité de marquage, une absence de bruit de fond et une absence d'artefacts (tissus déchirés, plis, bulles et tâches colorées par le DAB).

Pour appliquer l'Immunoscore dans chacun des 14 centres impliqués dans l'étude, nous avons dû normaliser la procédure pré-analytique et analytique, à savoir : l'épaisseur de coupe, le délai entre la coupe et l'immunomarquage, la procédure d'immunomarquage sur automate, la numérisation du tissu tumoral et son analyse avec un logiciel dédié. Malgré cette normalisation de la procédure, la variabilité de l'intensité du marquage en DAB est observable entre les blocs et les différents laboratoires. Toutefois, la standardisation des étapes pré-analytiques a été étudiée ces dernières années dans les laboratoires de pathologie (Grillo et al., 2015).

Pour limiter cette variabilité, nous avons donc recommandé l'application de notre procédure d'analyse à l'ensemble des 13 autres centres. De ce fait, j'ai réalisé une comparaison de la qualité des immunomarquages du marqueur CD3, CD8 entre les centres externes et notre centre référent. Les protocoles de marquage de chaque centre ont été optimisés jusqu'à obtenir une qualité proche du nôtre. Ainsi, nous avons obtenu une homogénéité de marquage en termes d'intensité de plus de 80% de la cohorte totale. Si le marquage avait une moyenne d'intensité inférieure au seuil d'intensité minimal retenu (152 UA), celui-ci était exclu des analyses finales. En évaluant l'infiltrat immunitaire au sein des régions tumorales chez les 3588 patients de la cohorte, nous avons observé une forte variabilité des densités de cet infiltrat immunitaire entre les patients, allant de 10 cellules/mm² à 10 000 cellules/mm².

Au cours de cette étude, nous avons validé la méthode d'analyse définitive de l'Immunoscore. Celle-ci est basée sur la quantification de la moyenne de la densité pour chaque marqueur lymphocytaire TCD3 et TCD8 dans la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM). Chaque densité est convertie en percentiles, par comparaison avec les densités immunitaires observées sur l'ensemble de la cohorte internationale. Quatre percentiles sont ainsi obtenus (2 marqueurs dans 2 régions). La moyenne des percentiles est calculée afin d'être convertie en Immunoscore faible (0-25e percentile), intermédiaire (25-70e percentile) et fort (70-100e percentile). Ainsi, une forte densité en lymphocytes T (CD3+) et en lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) est associée à un bon pronostic en termes de survie (DFS et OS). A l'inverse, une faible densité de l'infiltrat lymphocytaire est prédictive d'un mauvais pronostic et d'un haut risque de récidive pour le patient.

Les données statistiques obtenues lors de cette étude, confirment les résultats de nos précédentes études. En effet, les analyses multivariées en DFS et OS selon le modèle de Cox

ajustées pour l'âge, le sexe, la classification TNM, le statut MSI et l'Immunoscore ont montré la valeur pronostique indépendante de l'Immunoscore par rapport aux autres variables.
De plus, le critère immunitaire d'un Immunoscore catégorisé en 2, 3, ou 5 groupes est un autre pronostic indépendant et reste significativement associé au pronostic de survie sans récidive et de survie globale. Enfin, le degré de prédiction à la survie du patient associée à l'Immunoscore, est très significatif (c-index<0.72) (Tableau 6).
Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirme une valeur pronostique de l'Immunoscore indépendante de celle du système de classification AJCC-UICC TNM. Une association de ces deux classifications aurait donc un impact clinique important dans la prédiction d'une récidive pour le patient ainsi que dans le choix des traitements (article en soumission).

En analyses complémentaires, nous avons également montré que l'infiltrat immunitaire (et l'Immunoscore) est un critère pronostique supérieur à celui fourni par l'évaluation du statut MSI pour la survie sans récidive et la survie globale chez les patients atteints de cancer colique. En effet, la valeur pronostique associée au statut MSI apparait liée à sa capacité à induire une forte réaction immunitaire. Or, les patients MSI+ fortement infiltrés ne représentent qu'une minorité des patients fortement infiltrés. Les autres patients MSI+ associés à un faible infiltrat immunitaire (20% des cas) ont un pronostic similaire à celui des patients présentant une tumeur MSS faiblement infiltrée (Figure 28).
Le dernier volet exploratoire de l'Immunoscore porte sur l'impact pronostique et thérapeutique possible de ce marqueur. Avec les nouvelles immunothérapies anti-PD-1/PDL-1, il apparait aujourd'hui que l'expression tumorale PDL-1 est le biomarqueur le plus performant pour discriminer le groupe de patients répondeurs à des thérapies. Toutefois, il a été montré, dans des mélanomes de stade avancé, que cette expression tumorale peut se réaliser dans un contexte de réponse immunitaire locale, de type Th1 cytotoxique. Dans ce contexte, le facteur prédictif à la réponse de l'immunothérapie anti-PD-1 est la densité de l'infiltrat immunitaire TCD8+ initialement présent dans la tumeur et son front d'invasion (Tumeh et al., 2014). Ainsi, l'existence d'une réponse immunitaire locale de type Th1 cytotoxique semble être pré-requise à la réponse aux immunothérapies.
L'introduction de l'Immunoscore en pratique clinique ainsi que l'exploration de la contexture immunitaire pourraient donc apporter une information supplémentaire pour les patients à haut risque de récidive, et orienter les patients atteints de cancer colique mais également de nombreux autres cancers, vers des traitements complémentaires.

4. Vers une évaluation pronostique et thérapeutique du cancer du rectum sur biopsie diagnostique

Dans certains cas thérapeutiques, notamment le cancer du rectum, deux situations peuvent se présenter : 1. Certaines tumeurs sont inopérables ; 2. En situation de tumeur opérable après traitement néoadjuvant, la tumeur a régressé, la structure histologique est profondément modifiée et la localisation tumorale est toute ou en partie remplacée par de la fibrose. L'Immunoscore ne peut alors pas être évalué à partir de l'échantillon tumoral (tumeur primaire). Aujourd'hui, l'analyse des biopsies, utilisées à titre diagnostique, pourrait s'avérer très utile pour évaluer la prise en charge thérapeutique des patients et indiquer une réponse à la radiochimiothérapie néoadjuvante et/ou à un risque de récidive à titre pronostique.

L'évaluation de la composante immunitaire des cancers du rectum sur les biopsies tumorales nous permettrait de mieux identifier les patients éligibles à des options thérapeutiques moins agressives telles que la stratégie du « Watch and Wait » ou la « chirurgie à minima », après un traitement radiochimiothérapique (RCT).

Nos analyses ont montré qu'en dépit d'une faible représentation du contingent tumoral sur les biopsies diagnostiques (12 % de la surface analysée sur une coupe tumorale de pièce opératoire), la quantification de l'infiltrat immunitaire permettait de recueillir des informations cliniques très utiles pour évaluer la prise en charge thérapeutique des patients.

En évaluant les densités en lymphocytes TCD3+ et TCD8+ présentes dans les biopsies tumorales, nous avons observé une corrélation entre la densité de l'infiltrat lymphocytaire initial et la réponse clinique immédiate suivant une radiochimiothérapie néoadjuvante. Les patients, présentant une tumeur très infiltrée, ont une forte probabilité de répondre à la radiochimiothérapie et de bénéficier d'une survie sans récidive. Ceci confirme les données préliminaires obtenues par notre équipe (Anitei et al., 2014) et par l'étude de Yasuda (Yasuda et al., 2011).

Cependant il ne semble pas indispensable d'avoir un fort infiltrat lymphocytaire initial pour répondre à la RCT. Le calcul de la densité immunitaire CD3+/CD8+ sur les biopsies diagnostiques ne permet donc pas, d'exclure les patients non répondeurs au traitement, puisque la sensibilité à la RCT dépend également de la sensibilité intrinsèque des cellules tumorales aux agents ionisants et chimiotoxiques.

Par ailleurs, de récentes données ont démontré que la radiothérapie et certaines drogues de chimiothérapie, telles que les anthracyclines et l'oxaliplatine, stimulent la réponse immunitaire antitumorale en induisant une mort cellulaire immunogène (Zitvogel et al., 2008). Il est par conséquent concevable que la nature de l'infiltration immunitaire au site tumoral (sa qualité et son intensité) puisse moduler la qualité de la réponse à ces thérapies.

Nos analyses de transcriptome de l'infiltrat immunitaire chez des patients traités ou non par la radiochimiothérapie semblent confirmer ces récentes publications. En effet, nous avons pu observer pour les patients traités, une induction de la réponse immunitaire d'orientation Th1 cytotoxique (IFNγ, TBX21, GRZMB, STAT4), et notamment chez les patients bons répondeurs à la radiochimiothérapie (Figure 31 et 32).

Nous avons pu également noter une expression du ligand « indian Hedgehog » (IHh) chez les patients non traités contrairement aux patients traités par RCT. L'expression de ce gène est impliquée dans le développement des lymphocytes T et dans la différenciation, la prolifération et l'homéostasie de nombreux tissus, notamment dans le maintien des cellules épithéliales du côlon. Il a été montré récemment qu'une dérégulation de la voie Hedgehog (Hh) pouvait jouer un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs types de tumeurs, en particulier les cancers du système digestif (Wang et al., 2016) (Kebenko et al., 2015). Une perte d'expression du ligand IHh favoriserait le développement du cancer colorectal, et l'activation de la voie Hh pourrait agir comme un suppresseur de tumeur colique (Gerling et al., 2016). Cependant, à ce jour, le rôle spécifique de la voie Hh dans la cancérogenèse au niveau du système digestif (estomac, côlon) n'est pas complètement compris (Saqui-Salces et Merchant, 2010).

Au cours de nos travaux, nous avons montré, également, que l'infiltrat immunitaire CD3+/CD8+ avait, indépendamment de la réponse à la RCT, un impact sur le taux de survie sans récidive (DFS) des patients atteints de cancer du rectum. En effet, un patient ayant une forte densité lymphocytaire CD3+ ; CD8+ et présentant une réponse complète à la RCT, avait un meilleur pronostic de survie qu'un patient ayant également une réponse complète mais une faible densité lymphocytaire CD3+ ; CD8+ (Figure 35). Ainsi, l'évaluation de la densité lymphocytaire permettrait probablement de définir les patients avec un fort risque de rechute quel que soit la réponse à la RCT.

De plus, la combinaison de l'information immunitaire initiale et de l'évaluation clinique de la réponse à la RCT (ycTNM) semble permettre de prédire les patients ayant un faible risque de

rechute. Cette association permettrait ainsi de distinguer les patients ayant un bon pronostic et pouvant bénéficier d'une stratégie de conservation d'organe.

Ainsi, se dégage une perspective d'analyse combinée de différents critères (les critères intrinsèques à la tumeur, les critères immunitaires et les critères d'évaluation clinique de réponse au traitement néoadjuvant) pour tenter de mieux définir ce que sera la réponse à la RCT.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons analysé l'infiltrat immunitaire CD3+/CD8+ sur les biopsies diagnostiques d'une cohorte de 52 patients, inclus dans une stratégie de traitement « Watch and Wait ». Nous avons ainsi montré que l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire pouvait permettre de distinguer les patients à fort risque de rechute précoce (<2ans) malgré une réponse complète à la RCT, évaluée par imagerie. Malgré un nombre limité de patients, les résultats obtenus vont dans le sens d'une probabilité de rechute plus importante chez les patients peu infiltrés initialement. La confirmation de ces résultats pourrait permettre d'identifier les patients qui devraient bénéficier d'un suivi clinique plus important.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux de notre laboratoire indique qu'une analyse précise de la composante immunitaire du microenvironnement tumoral peut être essentielle pour mieux cibler les patients à fort risque de rechute et d'adapter leur traitement en conséquence. L'orientation immunitaire Th1 cytotoxique dans le microenvironnement constitue le profil immunitaire local le plus favorable en dépit d'un échappement manifeste de la tumeur primaire.

De ce fait, la prise en compte simultanée des critères de la tumeur et de son microenvironnement pourrait permettre de mieux cerner l'évolution du cancer, d'améliorer la discrimination des patients à risque de récidive, et la prédiction de la réponse à des thérapies conventionnelles et nouvelles thérapies. Ainsi, une analyse précise du microenvironnement de la tumeur par les pathologistes pourrait devenir essentielle pour une meilleure gestion des traitements des patients.

Au cours de mon travail, j'ai pu démontrer et valider la valeur pronostique ainsi que la robustesse de l'Immunoscore dans les cancers coliques au stade précoce (stade I et II) et avancé (stade III). L'Immunoscore semble être le plus fort facteur pronostique actuel pour la DFS et l'OS. Il pourrait également représenter un outil performant pour évaluer la réponse des patients aux nouvelles approches thérapeutiques, y compris l'immunothérapie. En effet, des essais cliniques ont récemment illustré la stimulation de la réponse lymphocytaire T par des traitements d'immunothérapie anti-CTLA-4, anti-PD1 et anti-PD-L1.

Dans la perspective d'introduire l'Immunoscore en pratique clinique et d'évaluer sa faisabilité en condition réelle, deux études nationales prospectives multicentriques, « ImmuCol 1 » et « ImmuCol 2 » se finalisent. Huit cent patients atteints de cancer colorectal de stades I/II/III/IV issus de 8 centres nationaux et d'un centre en Roumanie (étude ancillaire) ont été inclus à ces deux études. Afin de s'orienter vers une médecine plus personnalisée, nous avons associé au test pronostique Immunoscore des données propres à la tumeur. Plusieurs données cliniques des patients ont été recueillies : la classification AJCC-UICC TNM, le statut mutationnel, l'analyse d'expression de gènes immunitaires du microenvironnement tumoral, ainsi que le statut immunitaire systémique, l'état nutritionnel, la recherche de carence vitaminique et d'oligo-éléments, l'état psychologique du patient.

Afin d'être commercialisé et introduit comme biomarqueur pour le cancer du côlon de stade précoce (I-II) et avancé (III), la méthode de l'Immunoscore a récemment été transmis à la société HalioDX (Marseille, France). De ce fait, elle a déposé une demande de pris en charge par la sécurité sociale afin de faciliter l'introduire du test en pratique clinique. Ainsi, une évaluation de l'utilité du test dans la prise en charge thérapeutique du patient va être réalisée sur trois ans. Si le test Immunoscore est validé pour être appliqué en pratique clinique, il sera alors très utile pour aider la prise de décision sur le renforcement des traitements thérapeutiques à donner aux patients à fort risque de récidive (Immunoscore faible). A l'inverse, les patients présentant un faible risque de récidive (Immunoscore élevé) pourraient justifier d'une décroissance thérapeutique.

Ceci est en accord avec l'étude IDEA qui a comparé le schéma thérapeutique 6 mois versus 3 mois de chimiothérapie adjuvante (FOLFOX) chez des patients présentant un cancer du côlon de stade III (congrès de l'ASCO, 2017). La nécessité de s'appuyer sur des marqueurs autres que la classification TNM pour guider la thérapeutique a notamment été montrée au cours de cette étude. Nous débuterons dans les mois à venir une évaluation du test Immunoscore au sein de la cohorte française IDEA.

Enfin, dans la perspective d'étendre l'évaluation de l'Immunoscore à d'autres tumeurs solides, une analyse de l'Immunoscore dans les cancers du sein, du poumon, du pancréas, de l'œsophage, du cerveau, du mélanome et autres cancers à tumeurs solides, est actuellement en cours.

Par ailleurs, l'application dérivée de l'Immunoscore sur les biopsies diagnostiques dans les cancers du rectum montre l'importance que pourrait apporter la quantification de l'infiltrat immunitaire initial comme marqueur prédictif à la réponse au traitement néoadjuvant et aux taux de survie du patient. Ce travail a permis de montrer l'intérêt de la combinaison entre l'évaluation de l'infiltrat immunitaire initial et l'évaluation par imagerie de la réponse à la RCT (ycTNM). Il permettrait ainsi, de mieux distinguer les patients qui pourraient bénéficier d'une chirurgie « à minima » ou d'une stratégie de suivi « Watch and Wait ». Les résultats préliminaires obtenus sur l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire CD3+/CD8+ à partir des biopsies à visée diagnostique, dans le cancer du rectum, nous encouragent à poursuivre ces explorations à une échelle plus importante.

Notre système immunitaire apparait comme un élément essentiel dans la réponse anti-tumorale et dans les nouveaux traitements d'immunothérapie. L'échappement tumoral

observé lors du diagnostic semble être de nature fonctionnelle et réversible pour un nombre significatif de tumeurs solides répondant à ces nouveaux traitements. Ainsi, les tests évaluant la composante immunitaire *in situ* permettraient d'entrevoir des perspectives pronostiques et thérapeutiques importantes. L'Immunoscore serait l'un des premiers tests immunitaires en pathologie digitale à intégrer la pratique clinique.

ANNEXES

Tumeur primitive (T)

Tx Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive

T0 Pas de signe de tumeur primitive

Tis Carcinome in situ : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria

T1 Tumeur envahissant la sous-muqueuse

T2 Tumeur envahissant la musculeuse

T3 Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques non péritonisés

T4 T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral

T4b : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures

Ganglions régionaux (N)

Nx Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales

N0 Pas de métastase ganglionnaire

N1a Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional

N1b Métastases dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

N1c Nodule(s) tumoraux, c'est à dire satellite(s) dans la sous-séreuse, tissus non péritonisés péricoliques ou périrectaux sans métastase ganglionnaire régionale

N2a Métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux

N2b Métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

Métastases (M)

M0 Pas de métastase à distance

M1a Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) autre que régional

M1b Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Annexe 1 (A). Classification AJCC/UICC_TNM du cancer colorectal.

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

Annexe 1 (B). Classification TNM : Stade du cancer colorectal.

Data de la cohorte Test/IV/EV : Survie sans récidive

avgQuant - 2 groups, at 25				
Q2_7	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
0	289	22.40	289	22.40
1	1001	77.60	1290	100.00

Univariate Model	Comparisons		Model Fit Measures			
	HR (95% CI)	Wald P-value	N	Likelihood-Ratio P-value	AIC	C-index (95% CI)
Risk Subgroup			1290	<.0001	5551.643	0.56 (0.53-0.59)
1 vs 0	0.50 (0.42-0.61)	<.0001				
Stratified by center city						

Multivariate Model	Comparisons		Model Fit Measures			
	HR (95% CI)	Wald P-value	N	Likelihood-Ratio P-value	AIC	C-index (95% CI)
Risk Subgroup			1290	<.0001	5479.918	0.66 (0.62-0.71)
1 vs 0	0.56 (0.46-0.67)	<.0001				
Models adjusted for age, gender, t-stage, n-stage, and MSI Stratified by center city						

Data de la cohorte Test/IV/EV : Survie globale

avgQuant - 2 groups, at 25				
Q2_7	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
0	289	22.40	289	22.40
1	1001	77.60	1290	100.00

Univariate Model	Comparisons		Model Fit Measures			
	HR (95% CI)	Wald P-value	N	Likelihood-Ratio P-value	AIC	C-index (95% CI)
Risk Subgroup			1290	<.0001	4754.279	0.56 (0.52-0.59)
1 vs 0	0.55 (0.45-0.67)	<.0001				
Stratified by center city						

Multivariate Model	Comparisons		Model Fit Measures			
	HR (95% CI)	Wald P-value	N	Likelihood-Ratio P-value	AIC	C-index (95% CI)
Risk Subgroup			1290	<.0001	4722.022	0.64 (0.59-0.69)
1 vs 0	0.59 (0.48-0.72)	<.0001				
Models adjusted for age, gender, t-stage, n-stage, and MSI Stratified by center city						

Annexe 2. Analyses univariées et multivariées de survie sans récidives (DFS) ou de survie globale (OS) associées à l'Immunoscore en 2 groupes (Hi = sous-groupe 1 ; Lo= sous-groupe 0) et au statut MSI sur les trois cohortes internationales TS/IVS/EVS (n=1290).

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

Annexe 3. Liste des gènes analysés en technique Nanostring et leurs fonctions.

BIBLIOGRAPHIE

Anitei, Maria-Gabriela, Guy Zeitoun, Bernhard Mlecnik, Florence Marliot, Nacilla Haicheur, Ana-Maria Todosi, Amos Kirilovsky, et al. 2014. « Prognostic and Predictive Values of the Immunoscore in Patients with Rectal Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7): 1891‑99. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2830.

Baylin, Stephen B., et James G. Herman. 2000. « DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics ». *Trends in Genetics* 16 (4): 168–174.

Benson, Al B. 2007. « Epidemiology, Disease Progression, and Economic Burden of Colorectal Cancer ». *Journal of Managed Care Pharmacy: JMCP* 13 (6 Suppl C): S5-18.

Bindea, Gabriela, Bernhard Mlecnik, Marie Tosolini, Amos Kirilovsky, Maximilian Waldner, Anna C. Obenauf, Helen Angell, et al. 2013. « Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer ». *Immunity* 39 (4): 782‑95. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.003.

Blank, Christian, Thomas F. Gajewski, et Andreas Mackensen. 2005. « Interaction of PD-L1 on Tumor Cells with PD-1 on Tumor-Specific T Cells as a Mechanism of Immune Evasion: Implications for Tumor Immunotherapy ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 54 (4): 307‑14. doi:10.1007/s00262-004-0593-x.

Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, et al. 1998. « A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer ». *Cancer Research* 58 (22): 5248‑57.

Boon, T., et P. van der Bruggen. 1996. « Human Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes ». The Journal of Experimental Medicine 183 (3): 725‑29

Brahmer, Julie, Karen L. Reckamp, Paul Baas, Lucio Crinò, Wilfried E. E. Eberhardt, Elena Poddubskaya, Scott Antonia, et al. 2015. « Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 373 (2): 123‑35. doi:10.1056/NEJMoa1504627.

Bray, Freddie, Jian-Song Ren, Eric Masuyer, et Jacques Ferlay. 2013. « Global Estimates of Cancer Prevalence for 27 Sites in the Adult Population in 2008 ». *International Journal of Cancer* 132 (5): 1133‑45. doi:10.1002/ijc.27711.

Burnet, F. M. 1970. « The Concept of Immunological Surveillance ». *Progress in Experimental Tumor Research* 13: 1‑27.

Catenacci, Daniel V. T., Mark Kozloff, Hedy L. Kindler, et Blase Polite. 2011. « Personalized Colon Cancer Care in 2010 ». *Seminars in Oncology* 38 (2): 284‑308. doi:10.1053/j.seminoncol.2011.01.001.

Dong, Zhong-Yi, Wen-Zhao Zhong, Xu-Chao Zhang, Jian Su, Zhi Xie, Si-Yang Liu, Hai-Yan Tu, et al. 2017. « Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma ». Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 23 (12): 3012‑24. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2554.

Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2002. « Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape ». *Nature Immunology* 3 (11): 991‑98. doi:10.1038/ni1102-991.

Dhodapkar MV, Geller MD, Chang DH et al. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. J Exp Med 2003; 197:1667-76.

Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2004. « The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting ». *Immunity* 21 (2): 137–148.

Elie, Caroline, et Isabelle Colombet. 2011. « Methods of evaluation of reproducibility ». *Sang thrombose vaisseaux---Sang Thrombose Vaisseaux*, n° 3 (mars): 138–145. doi:10.1684/stv.2011.0592.

Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned. Tijdschr. Geneeskd. 5, 273–290.

Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, et Freddie Bray. 2015. « Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012 ». *International Journal of Cancer* 136 (5): E359-386. doi:10.1002/ijc.29210.

Folkman, J., P. Hahnfeldt, et L. Hlatky. 2000. « Cancer: Looking Outside the Genome ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 76‑79. doi:10.1038/35036100.

Francim, HCL, InVS, INCa. 2016. « Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013 ».

Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sautès-Fridman, et Jérôme Galon. 2012. « The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 298‑306. doi:10.1038/nrc3245.

Gabrilovich, Dmitry I., et Srinivas Nagaraj. 2009. « Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (3): 162‑74. doi:10.1038/nri2506.

Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, et al. 2006. « Type, Density, and Location of Immune Cells within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795): 1960‑64. doi:10.1126/science.1129139.

Galon, Jérôme, Franck Pagès, Francesco M. Marincola, Helen K. Angell, Magdalena Thurin, Alessandro Lugli, Inti Zlobec, et al. 2012. « Cancer Classification Using the Immunoscore: A Worldwide Task Force ». *Journal of Translational Medicine* 10 (octobre): 205. doi:10.1186/1479-5876-10-205.

Galon, Jérôme, Franck Pagès, Francesco M. Marincola, Magdalena Thurin, Giorgio Trinchieri, Bernard A. Fox, Thomas F. Gajewski, et Paolo A. Ascierto. 2012. « The Immune Score as a New Possible Approach for the Classification of Cancer ». *Journal of Translational Medicine* 10 (janvier): 1. doi:10.1186/1479-5876-10-1.

Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethé, F. Brasseur, et T. Boon. 1994. « Human Gene MAGE-3 Codes for an Antigen Recognized on a Melanoma by Autologous Cytolytic T Lymphocytes ». The Journal of Experimental Medicine 179 (3): 921‑30.

Gerling, Marco, Nikè V. J. A. Büller, Leonard M. Kirn, Simon Joost, Oliver Frings, Benjamin Englert, Åsa Bergström, et al. 2016. « Erratum: Stromal Hedgehog Signalling Is Downregulated in Colon Cancer and Its Restoration Restrains Tumour Growth ». *Nature Communications* 7 (septembre): 12936. doi:10.1038/ncomms12936.

Grillo, Federica, Simona Pigozzi, Paola Ceriolo, Paola Calamaro, Roberto Fiocca, et Luca Mastracci. 2015. « Factors Affecting Immunoreactivity in Long-Term Storage of

Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections ». *Histochemistry and Cell Biology* 144 (1): 93‑99. doi:10.1007/s00418-015-1316-4.

Habr-Gama, Angelita, Rodrigo Oliva Perez, Wladimir Nadalin, Jorge Sabbaga, Ulysses Ribeiro, Afonso Henrique Silva e Sousa, Fábio Guilherme Campos, Desidério Roberto Kiss, et Joaquim Gama-Rodrigues. 2004. « Operative versus Nonoperative Treatment for Stage 0 Distal Rectal Cancer Following Chemoradiation Therapy: Long-Term Results ». *Annals of Surgery* 240 (4): 711-717; discussion 717-718.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2000. « The hallmarks of cancer ». *cell* 100 (1): 57–70.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646‑74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma ». *The New England Journal of Medicine* 363 (8): 711‑23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.

Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer AM, Lengerich EJ. Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. Cancer 2005; 104:1962-7.

Hofman, Véronique, Marius Ilie, Elodie Long, Catherine Butori, Sandra Lassalle, Kevin Washetine, Salomé Lalve, Charles-Hugo Marquette, Jean-Charles Soria, et Paul Hofman. 2016. « [Issues and current limits for immunohistochemical assessment of PD-L1 status in bronchial biopsies] ». Bulletin Du Cancer 103 (4): 368‑80. doi:10.1016/j.bulcan.2016.01.014.

Huang, Dan, et Xiang Du. 2008. « Crosstalk between Tumor Cells and Microenvironment via Wnt Pathway in Colorectal Cancer Dissemination ». *World Journal of Gastroenterology* 14 (12): 1823‑27.

Jass, J. R. 1986. « Lymphocytic Infiltration and Survival in Rectal Cancer ». *Journal of Clinical Pathology* 39 (6): 585‑89.

Jothy, S., S. Y. Yuan, et K. Shirota. 1993. « Transcription of Carcinoembryonic Antigen in Normal Colon and Colon Carcinoma. In Situ Hybridization Study and Implication for a New in Vivo Functional Model ». *The American Journal of Pathology* 143 (1): 250‑57.

Katz, Jessica B., Alexander J. Muller, et George C. Prendergast. 2008. « Indoleamine 2,3-Dioxygenase in T-Cell Tolerance and Tumoral Immune Escape ». *Immunological Reviews* 222 (avril): 206‑21. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00610.x.

Kawakami H. 2016. "Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer". Clin Gastroenterol Hepatol. 2016 May ; 14(5): 651–658. doi:10.1016/j.cgh.2016.02.008

Kebenko, Maxim, Astrid Drenckhan, Stephanie J. Gros, Manfred Jücker, Nicole Grabinski, Florian Ewald, Astrid Grottke, et al. 2015. « ErbB2 Signaling Activates the Hedgehog Pathway via PI3K-Akt in Human Esophageal Adenocarcinoma: Identification of Novel Targets for Concerted Therapy Concepts ». *Cellular Signalling* 27 (2): 373‑81. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.022.

Kim, Soo Hee, Hee Jin Chang, Dae Yong Kim, Ji Won Park, Ji Yeon Baek, Sun Young Kim, Sung Chan Park, Jae Hwan Oh, Ami Yu, et Byung-Ho Nam. 2016. « What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? » *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association* 48 (3): 998‑1009. doi:10.4143/crt.2015.254.

Kobayashi N. Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodefi ciency syndrome. Jpn J Clin Oncol 1985;15(Suppl. 1):307-12.

Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, et Robert D. Schreiber. 2007. « Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State ». Nature 450 (7171): 903‑7. doi:10.1038/nature06309.

Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, Oliver Kepp, et Laurence Zitvogel. 2013. « Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy ». *Annual Review of Immunology* 31: 51‑72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008.

Laurinaviciene, Aida, Benoit Plancoulaine, Indra Baltrusaityte, Raimundas Meskauskas, Justinas Besusparis, Daiva Lesciute-Krilaviciene, Darius Raudeliunas, Yasir Iqbal, Paulette Herlin, et Arvydas Laurinavicius. 2014. « Digital Immunohistochemistry Platform for the Staining Variation Monitoring Based on Integration of Image and Statistical Analyses with Laboratory Information System ». *Diagnostic Pathology* 9 Suppl 1: S10. doi:10.1186/1746-1596-9-S1-S10.

Le, Dung T., Jennifer N. Uram, Hao Wang, Bjarne R. Bartlett, Holly Kemberling, Aleksandra D. Eyring, Andrew D. Skora, et al. 2015. « PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency ». *The New England Journal of Medicine* 372 (26): 2509‑20. doi:10.1056/NEJMoa1500596.

Lièvre, Astrid, Jean-Baptiste Bachet, Delphine Le Corre, Valérie Boige, Bruno Landi, Jean-François Emile, Jean-François Côté, et al. 2006. « KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer ». *Cancer Research* 66 (8): 3992‑95. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0191.

Locker, Gershon Y., Stanley Hamilton, Jules Harris, John M. Jessup, Nancy Kemeny, John S. Macdonald, Mark R. Somerfield, Daniel F. Hayes, Robert C. Bast, et ASCO. 2006. « ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (33): 5313‑27. doi:10.1200/JCO.2006.08.2644.

Loeb, L. A. 1991. « Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis ». *Cancer Research* 51 (12): 3075‑79.

Loeb, Lawrence A., Keith R. Loeb, et Jon P. Anderson. 2003. « Multiple Mutations and Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3): 776‑81. doi:10.1073/pnas.0334858100.

Loupakis, F., C. Cremolini, L. Salvatore, G. Masi, E. Sensi, M. Schirripa, A. Michelucci, et al. 2014. « FOLFOXIRI plus Bevacizumab as First-Line Treatment in BRAF Mutant Metastatic Colorectal Cancer ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (1): 57‑63. doi:10.1016/j.ejca.2013.08.024.

Luster, A. D., et P. Leder. 1993. « IP-10, a -C-X-C- Chemokine, Elicits a Potent Thymus-Dependent Antitumor Response in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 178 (3): 1057‑65.

Merlin Jean-Louis. 2014. « Diagnostic moléculaire des tumeurs solides ». In *Les biomarqueurs moléculaires en oncologie*, 40‑45. Paris, Berlin: Springer.

Meyer, L.R. et al. 2017. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual. Springer International, 978-3-319-40617-6

Mlecnik, Bernhard, Marie Tosolini, Amos Kirilovsky, Anne Berger, Gabriela Bindea, Tchao Meatchi, Patrick Bruneval, et al. 2011. « Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated with the State of the Local Immune Reaction ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (6): 610‑18. doi:10.1200/JCO.2010.30.5425.

Moinfar, Farid, Yan Gao Man, Laurent Arnould, Gary L. Bratthauer, Manfred Ratschek, et Fattaneh A. Tavassoli. 2000. « Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis ». *Cancer research* 60 (9): 2562–2566.

Ogino, Shuji, et Ajay Goel. 2008. « Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 10 (1): 13‑27. doi:10.2353/jmoldx.2008.070082.

Old, L. J., et E. A. Boyse. 1964. «Immunology experimental tumor». Annual Review of Medicine 15: 167‑86. doi:10.1146/annurev.me.15.020164.001123.

Pagès, Franck, Anne Berger, Matthieu Camus, Fatima Sanchez-Cabo, Anne Costes, Robert Molidor, Bernhard Mlecnik, et al. 2005a. « Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 353 (25): 2654‑66. doi:10.1056/NEJMoa051424.

Pagès, Franck, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Martin Asslaber, Marie Tosolini, Gabriela Bindea, Christine Lagorce, et al. 2009. « In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (35): 5944‑51. doi:10.1200/JCO.2008.19.6147.

Prendergast, George C. 2012. « Immunological Thought in the Mainstream of Cancer Research: Past Divorce, Recent Remarriage and Elective Affinities of the Future ». *OncoImmunology* 1 (6): 793‑97. doi:10.4161/onci.20909.

Qin, Zhihai, et Thomas Blankenstein. 2000. « CD4+ T cell–mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFNγ receptor expression by nonhematopoietic cells ». *Immunity* 12 (6): 677–686.

Ribic, Christine M., Daniel J. Sargent, Malcolm J. Moore, Stephen N. Thibodeau, Amy J. French, Richard M. Goldberg, Stanley R. Hamilton, et al. 2003. « Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 349 (3): 247‑57. doi:10.1056/NEJMoa022289.

Røge, Rasmus, Rikke Riber-Hansen, Søren Nielsen, et Mogens Vyberg. 2016. « Proliferation Assessment in Breast Carcinomas Using Digital Image Analysis Based on Virtual Ki67/Cytokeratin Double Staining ». *Breast Cancer Research and Treatment* 158 (1): 11‑19. doi:10.1007/s10549-016-3852-6.

Rosenberg, S. A. 1999. « A New Era for Cancer Immunotherapy Based on the Genes That Encode Cancer Antigens ». Immunity 10 (3): 281‑87.

Rosine Guimbaud. 2014. « Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique ».

Saqui-Salces, Milena, et Juanita L. Merchant. 2010. « Hedgehog Signaling and Gastrointestinal Cancer ». Biochimica Et Biophysica Acta 1803 (7): 786‑95. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.03.008.

Schreiber, R. D., L. J. Old, et M. J. Smyth. 2011. « Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». *Science* 331 (6024): 1565‑70. doi:10.1126/science.1203486.

Silva, Felipe Cavalcanti Carneiro da, Mev Dominguez Valentin, Fábio de Oliveira Ferreira, Dirce Maria Carraro, et Benedito Mauro Rossi. 2009. « Mismatch Repair Genes in Lynch Syndrome: A Review ». *Sao Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina* 127 (1): 46‑51.

Sonnenschein, C., et A. M. Soto. 2011. « The Death of the Cancer Cell ». *Cancer Research* 71 (13): 4334‑37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0639.

Stoler, Daniel L., Neng Chen, Mark Basik, Morton S. Kahlenberg, Miguel A. Rodriguez-Bigas, Nicholas J. Petrelli, et Garth R. Anderson. 1999. « The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (26): 15121–15126.

Stutman, O. 1974. « Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 183 (4124): 534‑36.

Stutman, O. 1979. « Chemical Carcinogenesis in Nude Mice: Comparison between Nude Mice from Homozygous Matings and Heterozygous Matings and Effect of Age and Carcinogen Dose ». *Journal of the National Cancer Institute* 62 (2): 353‑58.

J. Taïeb. 2011. "*MSI phenotype and resectable colorectal cancer: clarifying things*." La Lettre du Cancérologue, Vol. XX - n° 3 - mars 2011

Terabe, Masaki, et Jay A. Berzofsky. 2004. « Immunoregulatory T Cells in Tumor Immunity ». *Current Opinion in Immunology* 16 (2): 157‑62. doi:10.1016/j.coi.2004.01.010.

Thies, Svenja, et Rupert Langer. 2013. « Tumor Regression Grading of Gastrointestinal Carcinomas after Neoadjuvant Treatment ». *Frontiers in Oncology* 3 (octobre): 262. doi:10.3389/fonc.2013.00262.

Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer. 1982. YaleJ. Biol. Med. 55, 329–333

Thompson, Seonaid M., Rachel A. Craven, Niroshini J. Nirmalan, Patricia Harnden, Peter J. Selby, et Rosamonde E. Banks. 2013. « Impact of Pre-Analytical Factors on the Proteomic Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue ». *Proteomics. Clinical Applications* 7 (3‑4): 241‑51. doi:10.1002/prca.201200086.

Toh, James W. T., Paul de Souza, Stephanie H. Lim, Puneet Singh, Wei Chua, Weng Ng, et Kevin J. Spring. 2016. « The Potential Value of Immunotherapy in Colorectal Cancers: Review of the Evidence for Programmed Death-1 Inhibitor Therapy ». *Clinical Colorectal Cancer* 15 (4): 285‑91. doi:10.1016/j.clcc.2016.07.007.

Tumeh, Paul C., Christina L. Harview, Jennifer H. Yearley, I. Peter Shintaku, Emma J. M. Taylor, Lidia Robert, Bartosz Chmielowski, et al. 2014. « PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance ». *Nature* 515 (7528): 568‑71. doi:10.1038/nature13954.

Vacchelli, Erika, Lorenzo Galluzzi, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, Jerome Galon, Catherine Sautès-Fridman, Eric Tartour, Laurence Zitvogel, et Guido Kroemer. 2012. « Trial Watch: FDA-Approved Toll-like Receptor Agonists for Cancer Therapy ». *Oncoimmunology* 1 (6): 894‑907. doi:10.4161/onci.20931.

Vacchelli, Erika, Isabelle Martins, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, Jerome Galon, Catherine Sautès-Fridman, Eric Tartour, Laurence Zitvogel, Guido Kroemer, et Lorenzo Galluzzi. 2012. « Trial Watch: Peptide Vaccines in Cancer Therapy ». *Oncoimmunology* 1 (9): 1557‑76. doi:10.4161/onci.22428.

Velho, Sérgia, Cátia Moutinho, Luís Cirnes, Cristina Albuquerque, Richard Hamelin, Fernando Schmitt, Fátima Carneiro, Carla Oliveira, et Raquel Seruca. 2008. « BRAF, KRAS and PIK3CA Mutations in Colorectal Serrated Polyps and Cancer: Primary or Secondary Genetic Events in Colorectal Carcinogenesis? » *BMC Cancer* 8 (septembre): 255. doi:10.1186/1471-2407-8-255.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, et J. L. Bos. 1988. « Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development ». *The New England Journal of Medicine* 319 (9): 525‑32. doi:10.1056/NEJM198809013190901.

Waldhauer, I., et A. Steinle. 2008. « NK Cells and Cancer Immunosurveillance ». *Oncogene* 27 (45): 5932‑43. doi:10.1038/onc.2008.267.

Wang, Yihan, Qian Peng, Hongyuan Jia, et Xiao Du. 2016. « Prognostic Value of Hedgehog Signaling Pathway in Digestive System Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers* 16 (1): 71‑79. doi:10.3233/CBM-150542.

Willimsky, Gerald, et Thomas Blankenstein. 2005. « Sporadic Immunogenic Tumours Avoid Destruction by Inducing T-Cell Tolerance ». *Nature* 437 (7055): 141‑46. doi:10.1038/nature03954.

Yasuda, Koji, Takako Nirei, Eiji Sunami, Hirokazu Nagawa, et Joji Kitayama. 2011. « Density of CD4(+) and CD8(+) T Lymphocytes in Biopsy Samples Can Be a Predictor of Pathological Response to Chemoradiotherapy (CRT) for Rectal Cancer ». *Radiation Oncology (London, England)* 6 (mai): 49. doi:10.1186/1748-717X-6-49.

Zhang, Liying. 2008. « Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing for Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. Part II. The Utility of Microsatellite Instability Testing ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 10 (4): 301‑7. doi:10.2353/jmoldx.2008.080062.

Zhong, Fangfang, Rui Bi, Baohua Yu, Fei Yang, Wentao Yang, et Ruohong Shui. 2016. « A Comparison of Visual Assessment and Automated Digital Image Analysis of Ki67 Labeling Index in Breast Cancer ». *PloS One* 11 (2): e0150505. doi:10.1371/journal.pone.0150505.

Zitvogel, Laurence, Lionel Apetoh, François Ghiringhelli, et Guido Kroemer. 2008. « Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (1): 59‑73. doi:10.1038/nri2216.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Exploration de la composante immunitaire des cancers colorectaux par des approches d'imagerie et transcriptomiques. Implications cliniques potentielles

Marliot Florence

Date de soutenance : 24 novembre 2017

RÉSUMÉ

Le rôle de la réaction immunitaire au site tumoral est aujourd'hui reconnu comme étant déterminant dans l'évolution clinique des patients présentant un cancer. Dans les cancers colorectaux, nous avons observé un impact pronostique majeur de l'infiltration immunitaire. Une forte infiltration en lymphocytes TCD3+ et TCD8+ cytotoxiques dans un contexte d'orientation Th1 au site de la tumeur et dans sa marge d'invasion, jouerait un rôle pronostique majeur. Un score immunitaire nommé « Immunoscore » basé sur une technique d'immunohistochimie a été défini pour quantifier cet infiltrat immunitaire. Des performances intrinsèques de ce test en termes de robustesse, de répétabilité et de reproductibilité ont été analysées pour valider ce test en pratique clinique. Pour valider et promouvoir l'Immunoscore comme un nouveau paramètre de la classification du cancer en routine clinique, un consortium international a été initié. Les résultats obtenus de cette étude internationale montrent que l'utilisation de l'Immunoscore permettrait d'améliorer l'appréciation pronostique des patients. L'application dérivée de ce test pourrait également s'étendre aux biopsies diagnostiques pour les cancers traités par radiochimiothérapie (RCT) néoadjuvante. L'analyse de la densité en CD3 et CD8 dans le cancer du rectum sur ces biopsies, nous a permis de montrer une corrélation entre la densité de l'infiltration immunitaire et la réponse à la RCT. Une bonne infiltration immunitaire était également corrélée à un meilleur taux de survie sans récidive. Les analyses transcriptomiques sur des cancers du rectum traités ou non par RCT, nous ont permis de montrer l'induction d'une réponse Th1 cytotoxique. L'association du critère immunitaire au critère de réponse clinique à la RCT pourrait permettre d'individualiser les patients bons répondeurs à la RCT et les orienter vers une stratégie de conservation d'organe (Watch and Wait).

MOTS-CLÉS : cancer colorectal, infiltrat immunitaire, Immunoscore, lymphocytes, marqueur pronostique, marqueur prédictif, cancer du rectum, biopsie diagnostique, RCT, Watch and Wait.