

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Médecine
INSERM U866

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université de Bourgogne
Discipline : Sciences Vie
Spécialité : Immunologie

Par Julie VINCENT, Docteur en Médecine

ROLES DES CELLULES MYELOÏDES SUPPRESSIVES ET DES INFILTRATS IMMUNITAIRES DANS LE CANCER

Directeur de thèse

François Ghiringhelli

Membres du jury :

Pr Bruno CHAUFFERT

Pr Jean François EMILE

Dr Antoine TESNIERE

Dr Sylvain LADOIRE

Pr François MARTIN

Pr François GHIRINGHELLI

Dr Cédric REBE

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co encadrant

REMERCIEMENTS

RESUME

Le système immunitaire joue un double rôle dans le cancer : il peut non seulement supprimer la croissance tumorale en détruisant les cellules cancéreuses, mais aussi promouvoir la progression de la tumeur en sélectionnant les cellules tumorales ou en créant un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Notre idée principale est de développer des stratégies pour mieux comprendre l'immunologie du cancer colique.

Au cours de ma thèse, je me suis tout d'abord intéressée à une population du système immunitaire : les MDSC (Myeloïd Derived Suppressor Cells). Nous avons exploré des stratégies pour réduire le nombre de ces cellules au cours de la croissance tumorale. Nous avons pu découvrir que de petites doses de 5 fluorouracil sont capables d'induire spécifiquement une mort par apoptose des cellules myéloïdes suppressives. Nous avons ainsi caractérisé un effet immunologique positif nouveau du 5-fluorouracil. Cet effet immunologique contribue à l'effet antitumoral du 5-fluorouracil chez la souris.

Dans une deuxième partie nous avons étudié le rôle pronostic des infiltrats immunitaires dans une série de patients présentant un cancer du côlon avec des métastases hépatiques. Nous avons étudié le rôle pronostic des infiltrats en cellules CD8, CD45RO et Foxp3. Nous avons mis en évidence que la présence d'un fort infiltrat en cellules CD45RO et Foxp3 est un facteur de bon pronostic. L'association des 2 marqueurs permet de définir 3 groupes pronostics et ainsi d'individualiser un groupe de mauvais pronostic ne bénéficiant probablement pas de la chirurgie hépatique

Mots-clés : immunosurveillance, MDSC, cancer colique, Treg, CD8

ABSTRACT

Immune system plays a dual role in cancer: it can not only suppress tumor growth by destroying cancer cells, but also promote tumor progression by selecting immunoresistant tumor cells or by establishing an immunosuppressive microenvironment. Our main objective is to foster on the context of immune response in colon cancer setting

During my thesis, I focused on one population of the immunosuppressive cells immune system: MDSC (myeloid derived suppressor cells). In this work, we explored strategies to reduce the number of these cells during tumor growth. We have discovered that small doses of 5 Fluorouracil are able to specifically induce apoptotic death of MDSC. We have characterized a novel positive immunological effect of 5-fluorouracil. This immunological effect contributes to the antitumor effect of 5-fluorouracil in mice.

In the second part we investigated the prognostic role of immune infiltrates in a series of colon cancers with liver metastases. We investigated the prognostic role of tumor infiltrates, by CD8, CD45RO and Foxp3 cells. We found that the presence of a strong infiltrate of tumors by CD45RO and Foxp3 cells is a factor of good prognosis. The combination of the two markers could be used to define three prognostic groups and underline a poor prognosis group which may not benefit of liver surgery

Keywords: immunosurveillance, MDSC, CD8, Treg, colon cancer

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
RESUME	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES	10
ABREVIATIONS	11
I. INTRODUCTION.....	14
A. Le concept d'Immunoediting	16
1. La phase d'élimination	16
a) Les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale	16
(1) Les cellules dendritiques	16
(2) Les lymphocytes T	17
(3) Les NK.....	17
(4) Les NKT	18
(5) Les lymphocytes $T\gamma\delta$	18
(6) Les lymphocytes B	19
b) Les preuves du concept d'immunosurveillance	19
(1) Chez la souris.....	19
(2) Chez l'homme.....	22
2. La phase d'équilibre	23
3. La phase d'échappement	24
a) Lien entre les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et la réponse immunitaire	26
(1) Autosuffisance aux facteurs de croissance	26
(2) Insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs.....	26
(3) Evasion de l'apoptose.....	27

(4) Angiogenèse favorisée	27
b) Immunosélection.....	28
c) Immunosubversion.....	29
(1) Les cellules dendritiques	29
(2) Les lymphocytes T	29
(3) Les lymphocytes T régulateurs	30
(4) Les NKT	30
(5) Les lymphocytes B	30
(6) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	31
(7) Les macrophages.....	31
B. Les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells)	33
1. Sous-populations.....	34
a) Chez la souris.....	34
b) Chez l'homme.....	35
2. Origine et devenir des MDSC	36
3. Expansion des MDSC	37
a) GM-CSF	37
b) VEGF	37
c) IL-6 et IL-1 β	38
d) PGE2	38
e) Protéines S100.....	39
f) Autres facteurs impliqués.....	40
4. Activation des MDSC	40
a) Voie IFN γ STAT1.....	40
b) Voie IL-4 STAT6.....	41
c) Les récepteurs Toll Like	41
d) Le complément.....	42

5.	Mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des MDSC	43
a)	Métabolisme de la L-arginine	43
b)	Les espèces réactives de l'oxygène	44
c)	Le peroxy-nitrite	44
d)	Autres mécanismes	46
6.	Effets suppresseurs sur les différents effecteurs de la réponse immunitaire (Figure 7)	46
a)	Les lymphocytes CD8.....	46
b)	Les lymphocytes CD4.....	47
c)	Les lymphocytes T régulateurs.....	47
d)	Les macrophages	48
e)	Les NK	49
f)	Les cellules dendritiques	49
7.	STAT3.....	50
a)	La famille des STATs	50
b)	Signalisation STAT3.....	51
c)	Rôle de STAT3 dans les MDSC	53
8.	Les thérapeutiques ciblant les MDSC.....	54
a)	Promotion de la différenciation des MDSC.....	54
b)	Inhibition de l'expansion des MDSC.....	55
c)	Inhibition des fonctions des MDSC.....	55
d)	Élimination des MDSC	56
C.	Le cas du cancer colique.....	56
1.	Epidémiologie du cancer colorectal	56
2.	Localisations secondaires hépatiques	58
3.	Facteurs pronostiques et place de la chimiothérapie adjuvante.....	59
a)	Données cliniques et anatomopathologiques.....	54
b)	Données moléculaires	60

c)	Facteurs pronostiques après métastasectomie hépatique.....	62
4.	Immunité, inflammation et cancer.....	62
a)	Inflammation et cancer	62
b)	Infiltrat lymphocytaire tumoral et pronostic	67
c)	Lymphocytes T régulateurs (Treg).....	68
D.	Objectifs du travail de thèse	71
II.	RESULTATS.....	73
A.	Article sur le projet 1.....	73
	Discussion.....	84
B.	Projet 2.....	86
1.	Caractéristiques de la population	86
a)	Caractéristiques cliniques et biologiques	86
b)	Caractéristiques immunologiques.....	89
2.	Survie sans récurrence	91
a)	Analyse univariée	91
b)	Analyse multivariée.....	95
3.	Survie globale	96
4.	Association lymphocytes T mémoires et T régulateurs	97
C.	DISCUSSION.....	99
1.	Infiltrats lymphocytaires T CD8+, Foxp3+, CD45RO+ et cancers	99
a)	CD8+ et CD45RO+	99
b)	Lymphocytes T régulateurs Foxp3+.....	102
2.	Hypothèses expliquant le rôle pronostic favorable des Treg dans le cancer colorectal.....	105
a)	Les cellules Foxp3+ infiltrant les tumeurs colorectales correspondent-elles bien à des lymphocytes T régulateurs aux fonctions immunosuppressives ?	105
b)	cause septique.....	106
c)	Implication thérapeutique du rôle favorable d'une forte infiltration en Treg Foxp3+ ..	108

d) Infiltration immunologique et phénotype MSI	109
e) Valeur de la localisation des cellules de la réponse immune anti tumorale	110
f) Infiltrats immunologiques et chimiothérapie.....	111
3. Perspective	113
a) Interaction entre Tregs et Th17 infiltrant les cancers colorectaux	113
b) Rôle pronostic de l'IL-21.....	114
c) Etude de l'infiltration macrophagique des métastases hépatiques des cancers colorectaux	115
III. CONCLUSION PERSPECTIVES	119
IV. BIBLIOGRAPHIE	123
V. Annexe.....	158
Liste des autres publications	158

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Le concept de l'immunoediting.....	15
Figure 2 Expérience illustrant l'importance du système immunitaire dans l'apparition des tumeurs induites par les carcinogènes.	20
Figure 3 Les tumeurs chez les souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs chez des souris immunodéficientes.....	21
Figure 4 Les cinq caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales.....	25
Figure 5 Récapitulatif des mécanismes de l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire décrits ci-dessus.	32
Figure 6 Voies de signalisations impliquées dans l'expansion des MDSC.....	42
Figure 7 Mécanismes d'immunosuppression des MDSC touchant les différents effecteurs de la réponse immunitaire.....	50
Figure 8 Signalisation STAT3.....	53

ABREVIATIONS

ADCC: Antibody dependant cell cytotoxicity	HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Ahr: Aryl hydrocarbon receptor	HGFR: Hepatocyte Growth Factor Receptor
APC: Adenomatous Polyposis Coli	HLA: Human Leucocyte Antigen
ATRA: acide tout-trans rétinolique	HSP: Heat Shock Protein
BATF: basic leucine zipper transcription factor ATF-like	IDO: Indoleamine 2, 3-dioxygenase
Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large	IFN: Interféron
CCR7: C-C chemokine Receptor type 7	Ig: Immunoglobuline
CDK: Cyclin-Dependent Kinase	iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase
CIA: Collagen-Induced Arthritis	IRF4: Interferon Regulatory Factor 4
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	JAK: Janus Kinase
COX: Cyclo-Oxygénase	KC: keratinocyte-derived chemokine
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène	KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte	LAP: Latency Associated Peptide
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	L-Arg: L-Arginine
DC: Dendritic Cell	LIF: Leukemia Inhibitory Factor
DMA: Dimethyl amiloride	LILRB3: leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 3
DMBA: 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene	LMC: Leucémie Myéloïde Chronique
DR: Death Receptor	LMP: Low Molecular mass Polypeptide
EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	LXR: Liver X Receptor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	MCA: Methylcholanthrene
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor	MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell
FLIP: FLICE-Like Inhibitory Protein	MICB/A: MHC class I polypeptide-related sequence B/A
FoxP3: Forkhead box P3	Min: Multiple Intestinal Neoplasia
Gfi-1: Growth factor independent 1	MIP: Macrophage Inflammatory Protein
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	MMP9: Matrix Metalloproteinase 9

M-SCF: Macrophage colony-Stimulating Factor

MUC1: Mucin 1

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NKT: Natural Killer T

NO: Nitric Oxide

NT: Nitro tyrosine

OSM: Oncostatin M

ORL: Oto-Rhino-Laryngologie

pAg: phospho-antigène

pDC: plasmacytoid Dendritic Cell

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PDL-1: Programmed cell death 1 ligand 1

PGE2: Prostaglandine E2

PIAS: Protein Inhibitors of Activated Stats

PIR-B: Paired Immunoglobulin-like Receptor B

PNN: Polynucléaire neutrophile

PTPase: Protein Tyrosine Phosphatases

Rag: Recombination Activating Gene

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROR: RAR-related orphan receptors

ROS: Reactive oxygen species

SCF: Stem Cell Factor

SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disorder

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signalling

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TAM: Tumor-Associated Macrophage

TAP: Transporter associated with Antigen Processing

TCR: T Cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg: lymphocytes T régulateur

TRP-1: Tyrosine-Related Protein 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

α GalCer: Galactosylceramide

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les mutations génétiques qui induisent une modification des voies de signalisation intracellulaires peuvent entraîner la transformation des cellules et éventuellement conduire au développement d'une tumeur. Au cours de l'oncogenèse, les cellules acquièrent six caractéristiques principales : elles produisent leurs propres signaux de croissance, ignorent les signaux d'inhibition de croissance, échappent à la mort cellulaire, se multiplient indéfiniment, promeuvent l'angiogenèse, et envahissent les tissus par la circulation générale et/ou par effraction de la membrane basale ¹. Il a été proposé, plus récemment, que l'échappement au système immunitaire puisse constituer la septième caractéristique des cellules cancéreuses ². Le système immunitaire intervient en effet dans la prévention des tumeurs selon trois mécanismes. Premièrement, il protège l'hôte contre les tumeurs induites par les virus en le protégeant des infections virales. Deuxièmement, il élimine les organismes pathogènes, et permet la résolution rapide des phénomènes inflammatoires qui pourraient conduire à la tumorigénèse. Enfin, il identifie et détruit les cellules tumorales, en reconnaissant des antigènes ou des molécules spécifiques induites lors de perturbations des cellules tumorales. En cas d'inflammation chronique, le système immunitaire est capable de détecter les cellules exprimant des états précancéreux ou cancéreux, et de les détruire avant qu'elles ne deviennent dangereuses. Ce phénomène est appelé immunosurveillance anti-tumorale ³. Cependant, malgré cette surveillance opérée par le système immunitaire, certaines cellules tumorales peuvent se développer et constituer une tumeur. Le concept d'immunosurveillance a donc été repensé, laissant la place à la théorie de l'immunoediting. Cette théorie définit les relations entre les cellules transformées et le système immunitaire selon trois phases : l'élimination, l'équilibre, et l'échappement ³ (Figure 1).

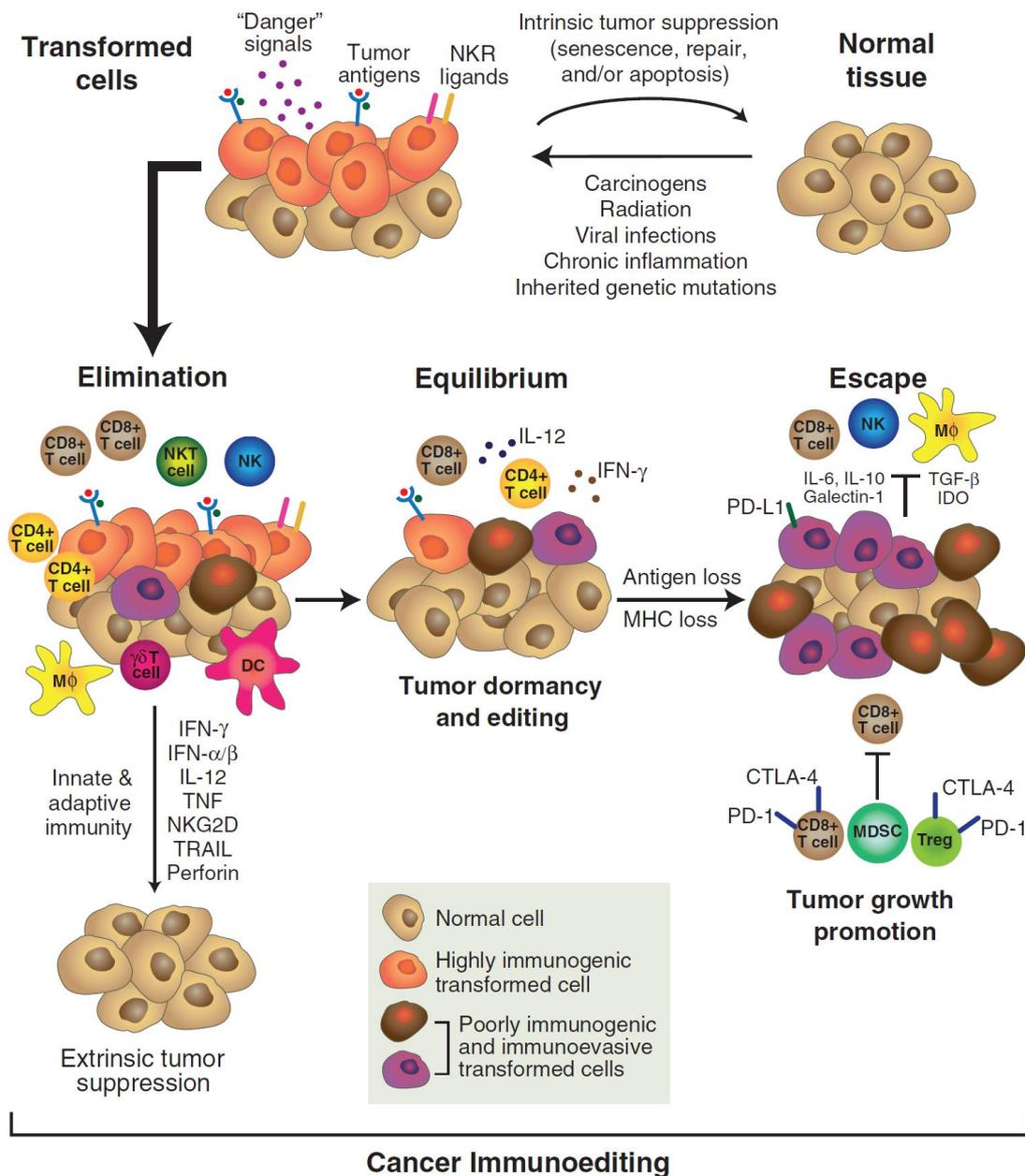


Figure 1 Le concept de l'immunoediting.

Il se compose de trois phases successives: l'élimination, l'équilibre, et l'échappement. Dans la phase d'élimination, l'immunité innée et adaptative travaillent ensemble pour détruire les tumeurs en développement bien avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes. Si la réponse est efficace, le cancer peut être éliminé. Si, toutefois, ce n'est pas le cas, les cellules tumorales peuvent entrer dans la phase d'équilibre qui implique seulement des effecteurs de l'immunité adaptative. Lors de cette phase, l'immunogénicité des tumeurs est modifiée. Des variants de cellules tumorales peuvent émerger car elles ne sont plus reconnues par l'immunité adaptative, elles deviennent insensibles à la réponse immunitaire effectrice, ou elles induisent un état immunosuppresseur dans le microenvironnement de la tumeur. Ces cellules tumorales peuvent alors entrer dans la phase d'échappement, durant laquelle leur croissance n'est plus supprimée par l'immunité. Ces cellules tumorales apparaissent et provoquent une maladie cliniquement apparente. D'après Schreiber et al ⁴

A. Le concept d'Immunoediting

1. La phase d'élimination

La phase d'élimination, définie par la théorie de l'immunosurveillance, est la phase au cours de laquelle les cellules transformées sont reconnues et éliminées par le système immunitaire. Le développement d'une réponse immunitaire à toute agression antigénique se traduit par l'activation de 2 systèmes de défense : une réponse innée ou naturelle qui constitue la première ligne de défense de l'organisme, et une réponse spécifique ou adaptative impliquant des réponses humorales et des réponses à médiation cellulaire. Parmi les différents acteurs de l'immunosurveillance, on peut citer les molécules et les cellules effectrices de l'immunité innée telles que les cellules $T\gamma\delta$, les cellules natural killer (NK), les cellules dendritiques (DC), les cellules T natural killer (NKT), TRAIL, perforine/granzyme ainsi que les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B).

Comme toute réponse immunitaire, la réponse anti-tumorale adaptative doit être déclenchée par des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules tumorales sont des cellules du soi et, de ce fait, bien qu'anormales, très faiblement inductrices de réponse du fait de leur faible antigénicité. Le rôle des cellules présentatrices d'antigène (CPA) est alors crucial pour le développement d'une défense efficace. Il est bien établi que les cellules tumorales peuvent être reconnues spécifiquement par les cellules effectrices du système immunitaire.

Il a été démontré que les cellules dendritiques étaient des CPA efficaces pour engendrer des effecteurs cytotoxiques spécifiques des cellules tumorales.

a) Les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

(1) Les cellules dendritiques (DC)

Les cellules dendritiques sont des cellules qui présentent comme les macrophages des fonctions d'endocytose et de phagocytose. Dans le cas d'une tumeur, les antigènes reconnus viennent de débris cellulaires, de lysats ou de corps apoptotiques des cellules cancéreuses. Dans le cas d'une réponse immunitaire anti-tumorale idéale, les DC internalisent les antigènes exogènes dans les tissus périphériques, puis migrent, sous l'influence de différents

facteurs, jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Dans les ganglions de drainage, la réponse T se met en place. La sécrétion de cytokines par les CPA oriente une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Th1), pilier de la réponse immunitaire anti-tumorale.

(2) Les lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4 spécifiques reconnaissent, via le TCR, l'antigène au niveau des molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) classe 2 du CPA et s'activent seulement si ce dernier signal est accompagné des signaux de co-stimulation via l'interaction de CD80/CD86 et du récepteur CD28. Différentes molécules d'adhérence permettent de stabiliser ces interactions. Les lymphocytes T CD4 activés sécrètent des cytokines. Les lymphocytes T CD4 de type Th1 vont libérer de l'interféron γ (INF γ). L'INF γ s'oppose à l'angiogenèse, et exerce une activité cytostatique⁵. Les lymphocytes T CD4 de type Th2, qui produisent de l'IL-4, bloquent indirectement la néo-angiogenèse par un effet sur les cellules endothéliales du stroma tumoral⁶. L'INF γ convertit les macrophages infiltrant la tumeur (TAM) (de type M2 sécréteurs d'IL-10) en macrophages de type M1, producteurs d'INF- γ ⁷.

Des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont également générés et sont capables de reconnaître via le CMH les antigènes exprimés par les cellules tumorales. Ils peuvent lyser les cellules tumorales par un mécanisme de cytotoxicité dépendante de la perforine et des granzymes ou d'induction d'apoptose. De façon parallèle, ces cellules sont capables de sécréter de l'INF- γ , qui polarise la réponse T vers une réponse Th1.

(3) Les NK

Les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales n'exprimant plus les ligands des récepteurs inhibiteurs des NK. En effet, le manque d'expression du CMHI, dans les cellules cancéreuses, les sensibilise à la cytotoxicité des NK. Les cellules tumorales exprimant des ligands des récepteurs activateurs des NK peuvent aussi être tuées. L'activité cytotoxique spontanée est apportée principalement par le récepteur activateur NKG2D⁸. Dans certaines hémopathies comme la leucémie myéloïde chronique (LMC), les cellules NK peuvent en outre être activées via NKG2D par les DCs.

(4) Les NKT

Les cellules T natural killer (NKT) participent à la reconnaissance de glycolipides tumoraux présentés par les CPA via leur récepteur CD1d, signal capable de les activer. Les NKT activées sont alors capables de libérer de l'INF- γ , et de tuer les cellules tumorales via TRAIL et la perforine. Plusieurs travaux ont démontré l'importance des NKT dans le rejet tumoral, notamment dans des souris suite à des injections de galactosylcéramide (α -GalCer) ou d'IL-12^{9,10,11}. L' α -GalCer a été identifié comme le ligand présenté par la molécule CD1d au TCR des cellules NKT murines et humaines^{12,13}. Bien que possédant un TCR capable de reconnaître l' α -GalCer, il a été montré que les NKT ne jouaient pas le rôle d'effecteur lytique mais plutôt celui d'activateur des cellules NK dans cette réponse anti-tumorale^{14,15}.

(5) Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent à la fois des caractéristiques de cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Ils expriment le récepteur de reconnaissance des antigènes TCR associé au complexe CD3. Cependant, la diversité du TCR est moindre que celle du TCR des lymphocytes T $\alpha\beta$ et les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'expriment que rarement CD4 ou CD8. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent lyser les cellules tumorales en reconnaissant à leur surface de petits métabolites phosphorylés, les phosphoantigènes (PAg). En plus de la reconnaissance des PAg par le TCR $\gamma\delta$, d'autres molécules complètent l'interaction entre l'effecteur et sa cible. Les récepteurs activateurs de type NKG2D reconnaissent des molécules de stress exprimées par certaines cellules tumorales. Après une stimulation antigénique, les T V γ 9V δ 2 secrètent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires IFN γ et TNF α , surexpriment le récepteur de l'IL-2 et se différencient en cellules cytotoxiques. Après activation, leurs granules lytiques s'orientent en direction du point de contact focal avec leur cible dans laquelle ils déversent des granzymes A/B grâce à l'action de perforines¹⁶.

(6) Les lymphocytes B

Il existe différents mécanismes impliquant les anticorps spécifiques des antigènes tumoraux dans la mort des cellules tumorales. Le mécanisme principal est appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody dependant cell cytotoxicity). Les anticorps liés aux cellules tumorales activent les cellules effectrices du système immunitaire. Les anticorps IgG se fixent via leur région Fc sur les macrophages ou sur les récepteurs CD16 des cellules NK. Cette fixation entraîne leur activation et la lyse des cellules tumorales^{17, 18}. La liaison des antigènes de tumeurs aux anticorps peut aussi entraîner la cascade classique du complément et donc la lyse des cellules¹⁹.

b) Les preuves du concept d'immunosurveillance

(1) Chez la souris

Il existe trois modèles standard de cancer murin illustrant l'importance du rôle de l'immunité dans l'élimination des tumeurs : les tumeurs induites par les carcinogènes, les tumeurs spontanées qui surviennent avec l'âge, et les tumeurs chez des souris génétiquement prédisposées au cancer. Les concepts de l'immunosurveillance et d'immunoediting ont été démontrés en exposant à des carcinogènes des souris immunocompétentes et des souris immunodéficientes, et en comparant l'incidence des tumeurs. Les deux modèles tumoraux les plus induits par les carcinogènes sont le sarcome, induit par le 3'-MCA, et le papillome cutané, induit par la combinaison du 7,12-diméthylbenz-anthracène (DMBA) et le 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA). A ce jour, de nombreuses souris avec des immunodéficiences bien définies ont été testées pour leur sensibilité aux carcinogènes.

Les cellules du système inné et adaptatif ont un rôle crucial dans l'élimination des sarcomes primaires induits par MCA. Les souris Rag1^{-/-} et Rag2^{-/-} déficientes en lymphocytes, SCID et Nude sont plus susceptibles à l'induction de tumeurs après exposition au MCA (Figure 2).

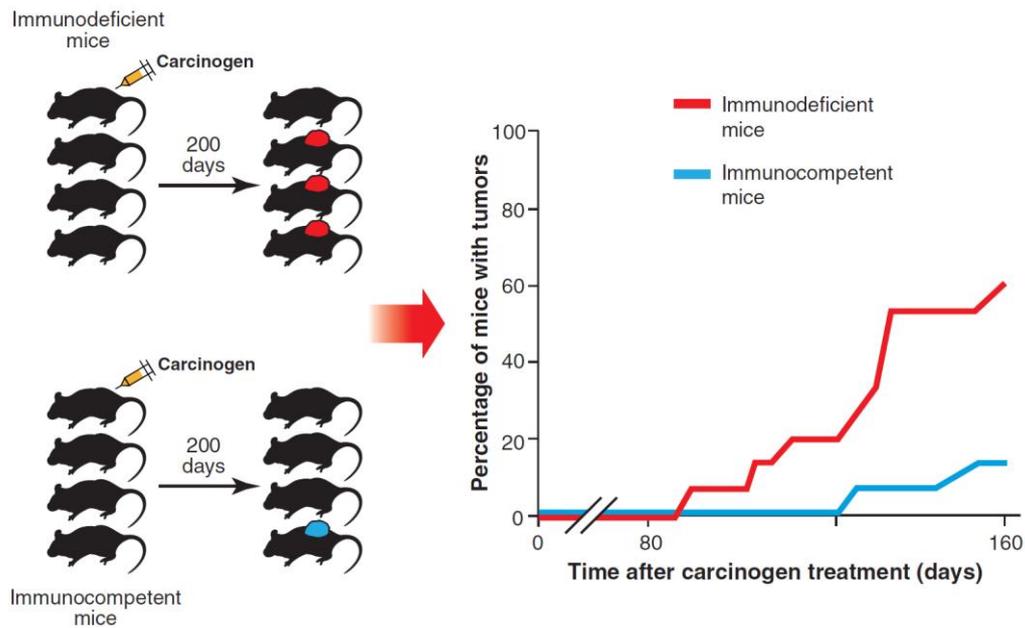


Figure 2 Expérience illustrant l'importance du système immunitaire dans l'apparition des tumeurs induites par les carcinogènes.

Des études ont établi que des souris immunodéficientes sont plus sensibles que des souris immunocompétentes aux traitements avec des agents cancérogènes tels que le MCA. Ce type d'expérience utilise des souris immunodéficientes génétiquement modifiées avec des déficits dans les effecteurs de l'immunité innée ou adaptative ou des souris de type sauvage rendues immunodéprimées par l'administration chronique d'anticorps monoclonaux qui ciblent par exemple, les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ ou l'interféron- γ . Ce schéma est basé sur des expériences²⁰. D'après Schreiber et al⁴.

De façon surprenante, 40% des tumeurs dérivées de souris Rag2^{-/-} sont rejetées quand elles sont transplantées chez des souris immunocompétentes, mais elles grossissent progressivement chez les souris Rag2^{-/-} ou chez des souris sauvages déplétées en CD4⁺ et CD8⁺, alors que les tumeurs dérivées de souris immunocompétentes poussent facilement dans les souris sauvages et dans les souris Rag2^{-/-}. Ces observations montrent que les sarcomes dérivés des souris immunodéficiences sont plus immunogéniques que ceux qui proviennent de souris ayant un système immunitaire fonctionnel, mettant en évidence le concept d'immunoediting^{21,22,20,23} (Figure 3).

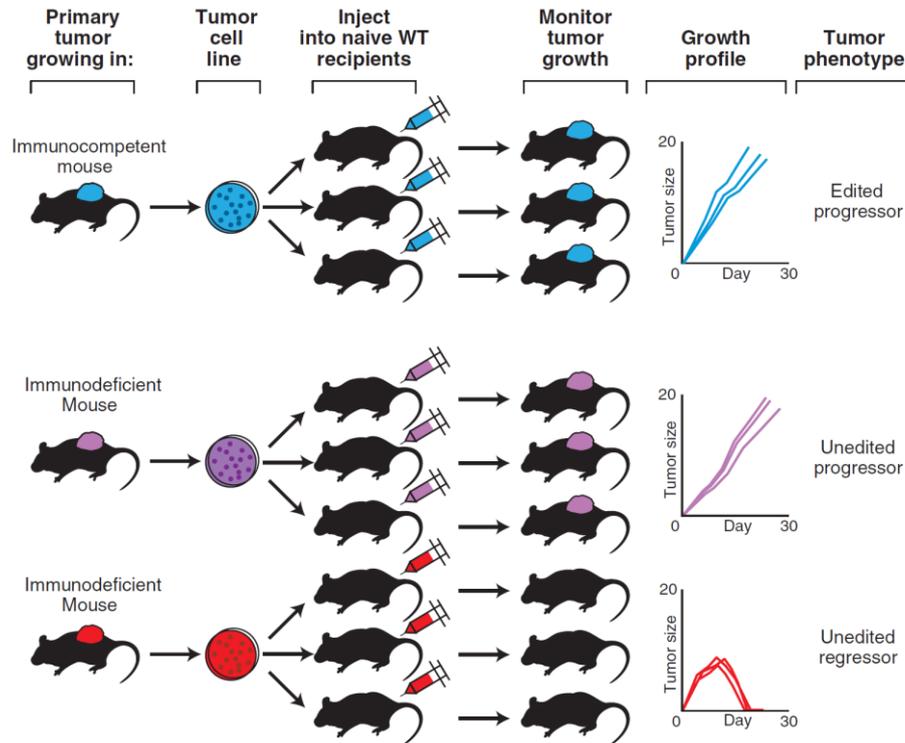


Figure 3 Les tumeurs chez les souris immunocompétentes sont qualitativement différentes des tumeurs chez des souris immunodéficientes.

Cette observation, qui a conduit à la formulation de l'hypothèse de l'immunoediting du cancer, est basée sur des analyses comparatives des tumeurs induites par des cancérogène, récoltées à partir de souris immunodéficientes et immunocompétentes²⁰. D'après Schreiber et al⁴

D'autres études ont montré que les souris déficientes en lymphocytes $T\alpha\beta$ ou en $T\gamma\delta$ ont un nombre de sarcomes induits par le MCA augmenté par rapport aux souris sauvages, ce qui montre que ces deux populations lymphocytaires jouent un rôle dans la suppression des tumeurs induites par le MCA^{24, 25}. Les cellules NKT et NK sont également essentielles dans l'élimination des cellules transformées. Ainsi, il existe un nombre augmenté de tumeurs chez les souris déficientes pour CD1d²⁶ ou les souris déplétées en NK²³. De nombreuses souris déficientes pour des molécules effectrices ou pour leurs récepteurs ont été examinées dans le contexte de la carcinogénèse induite par le MCA, incluant des souris déficientes en perforine, en $IFN\gamma$ ²⁷ ou en son récepteur^{28,20}. Ces souris ont une sensibilité au MCA augmentée suggérant que les lymphocytes cytotoxiques et produisant de l' $IFN\gamma$ suppriment l'initiation de la tumeur *in vivo*. L'interféron peut contribuer aux effets anti-tumoraux par de nombreuses voies. L' $IFN\gamma$ a un effet direct sur les cellules tumorales en augmentant l'expression du CMH1, les rendant plus accessibles aux lymphocytes CD8+ spécifiques de la

tumeur^{28, 29}. De plus, les voies de signalisation de l'IFN γ dans les cellules du système immunitaire telles que les CTLs via STAT1³⁰ ou dans les cellules stromales³¹ montrent que les effets de l'IFN γ dans les différents compartiments cellulaires génèrent une immunité anti-tumorale. Cependant, dans un autre modèle de cancer induit par le DMBA/TPA, la perte de l'IFN γ ou de son récepteur entraîne la diminution de la tumorigénèse³². Ces différentes observations montrent les effets pléiotropiques de l'IFN γ et la nécessité d'une analyse multimodale durant la carcinogénèse.

Une autre approche pour examiner le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral est d'éliminer certains composants du système immunitaire murin et d'évaluer l'incidence sur l'apparition de tumeurs spontanées après une période de deux ans. Alors que de nombreuses souris immunodéficientes ne développent pas de cancers au cours de cette période, des études de vieillissement ont clairement démontré un rôle critique de certaines voies cytotoxiques telle que la perforine³³, des sous-ensembles cellulaires comme les lymphocytes T et les cellules NK²⁸, et des cytokines comme l'IFN γ ³⁴ dans la prévention du développement de tumeurs spontanées.

(2) Chez l'homme

Chez l'homme, il existe de nombreuses preuves de l'existence d'une immunosurveillance. Ainsi, de nombreuses situations d'immunodéficiência sont associées à une prédisposition pour le développement de cancers, comme c'est le cas pour les patients transplantés, y compris pour des cancers non reliés à des infections virales^{35, 36}. Les patients porteurs d'un syndrome de Chediak-Higashi, caractérisé par un dysfonctionnement dans la cytotoxicité des NK, ont un risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains³⁷. Certains polymorphismes des récepteurs NKG2D, ou des KIRs affectant la cytotoxicité des NK, sont associés à un risque accru de développer certains cancers^{38, 39, 40, 41}. Il en est de même pour certains polymorphismes inactivateurs de Fas-ligand, ou pour les patients porteurs de mutations du gène de la perforine^{42, 43}. Dans une analyse de patients atteints de sarcomes gastrointestinaux, il existe une expression différentielle de variants du récepteur NKp30 issus d'épissage, qui affecte ses fonctions et le pronostic du patient⁴⁴. Par ailleurs, des preuves directes d'une immunosurveillance existent chez les patients porteurs de gammopathie monoclonale bénigne, un état pouvant précéder l'apparition d'un authentique myélome

multiple, chez qui il est possible de mettre en évidence une réponse T vis-à-vis des clones lymphocytaires B, qui n'est plus retrouvée chez les patients ayant évolués vers un myélome⁴⁵. D'autre part, la présence de lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux, comme MUC-1 ou HER2, a été mise en évidence dans la moelle osseuse de patientes porteuses d'une tumeur localisée du sein, et ces lymphocytes sont capables d'induire la régression tumorale lorsqu'ils sont transférés de façon passive à des souris xénogreffées avec la tumeur primitive⁴⁶.

Ainsi, dans de nombreux cancers, la présence d'un infiltrat tumoral lymphocytaire T est habituellement considérée comme le témoin d'une tentative de détection et d'élimination des cellules anormales par le système immunitaire, et a pu être reliée à un meilleur pronostic des patients porteurs de certains types tumoraux^{47, 48, 49}. Par ailleurs, chez des patients porteurs d'un cancer du côlon, une forte expression au sein du microenvironnement tumoral de molécules importantes pour les fonctions des lymphocytes Th1 (CD8 α , granzyme B, T-bet, INF- γ) est associée à une meilleure survie, et à un moindre risque métastatique^{50, 51, 52}.

Toutefois, des variants de cellules tumorales peuvent parfois ne pas être complètement éliminés, mais plutôt entrer dans une phase d'équilibre où le système immunitaire contrôle la croissance des cellules tumorales.

2. La phase d'équilibre

Dans cette phase d'équilibre, les cellules tumorales deviennent dormantes et demeurent cliniquement invisibles vis-à-vis de l'hôte. Ainsi, l'équilibre représente une seconde étape de l'immunoediting du cancer.

Dans la phase d'équilibre, le système immunitaire de l'hôte et les cellules tumorales entrent dans un équilibre dynamique, dans lequel l'immunité anti-tumorale contient, mais ne peut pas totalement éradiquer, une population hétérogène de cellules tumorales, dont certaines ont acquis des moyens de se soustraire au système immunitaire⁵³. La phase d'équilibre a été à l'origine de l'hypothèse qui explique la longue période de latence depuis l'événement de la transformation tumorale à la phase d'échappement et à l'émergence d'une maladie maligne. Cette phase d'équilibre peut être la plus longue des phases de l'immunoediting où les

effecteurs de la réponse immunitaire vont sélectionner les cellules tumorales qui acquièrent des mutations immuno invasives, pouvant conduire à la maladie cliniquement décelable.

Dans ce cas, les cellules tumorales sont en division, mais la lésion ne peut s'étendre au-delà d'une certaine taille en raison de limitations soit dans l'approvisionnement en sang, soit en raison de l'activité du système immunitaire. La dormance cellulaire peut se produire lorsque des cellules tumorales rentrent dans un état de quiescence. Une étude utilisant des faibles doses de MCA montre, pour la première fois, que l'immunité maintient les lésions primaires cancéreuses dans un état d'équilibre. Des analyses ont révélé que la déplétion des cellules de l'immunité adaptative (les cellules CD4+CD8+) ou des cytokines favorisant cette immunité (comme l'IFN γ et l'IL-12) induisent la croissance rapide des sarcomes au site d'injection du MCA dans 50% des cas, 200 jours après l'injection⁵⁴. Au contraire, les anticorps inhibant les fonctions NK n'induisent pas l'émergence de tumeurs. Ces résultats montrent bien que l'immunité adaptative, et non l'immunité innée, est impliquée dans le maintien de l'état d'équilibre. Ces expériences permettent de distinguer cette phase de la phase d'élimination où les deux immunités innée et adaptative interviennent⁵⁴.

Bien que les phases d'élimination et d'équilibre soient importantes dans le phénomène d'immunoediting, un résultat plus dramatique de ce phénomène se produit lorsque les tumeurs échappent au contrôle du système immunitaire, conduisant à l'apparition clinique du cancer.

3. La phase d'échappement

Ainsi, la phase d'échappement représente l'échec du système immunitaire soit pour éliminer ou pour contrôler les cellules transformées. Cette phase va permettre la survie de cellules tumorales et même leur croissance sans limitation par le système immunitaire. Les cellules cancéreuses subissent des modifications génétiques stochastiques et épigénétiques ce qui génère des modifications essentielles nécessaires pour contourner à la fois les défenses immunitaires innées et adaptatives.

Il existe de nombreuses différences moléculaires entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. Ces différences peuvent être classées en 6 caractéristiques distinctes (Figure 4).

Certaines de des caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales peuvent influencer la réponse immunitaire anti-tumorale.

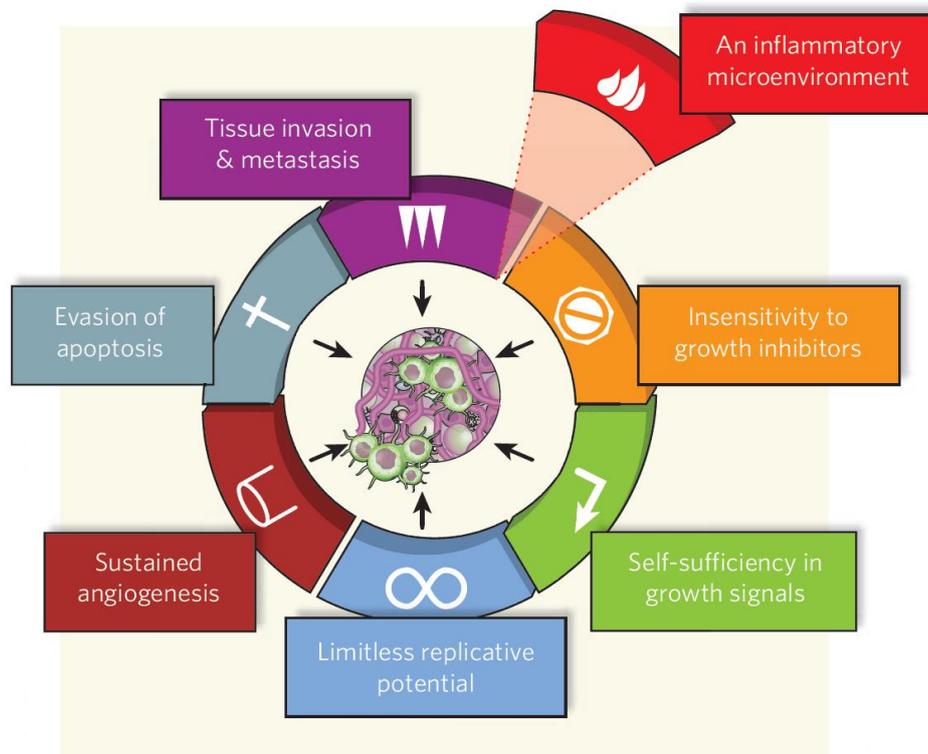


Figure 4 Les cinq caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales.

En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé un modèle pour définir les six propriétés qu'acquiert une tumeur¹. Une autre étude indique que ce modèle devrait être révisé afin d'inclure l'inflammation liée au cancer comme caractéristique supplémentaire. D'après⁵⁵.

a) Lien entre les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales et la réponse immunitaire

(1) Autosuffisance aux facteurs de croissance

Les cellules tumorales peuvent produire des facteurs solubles qui touchent la tumeur elle-même mais aussi le système immunitaire de l'hôte. Des cellules tumorales acquièrent la capacité de synthétiser des facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles, ce qui crée une boucle autocrine de stimulation. Les facteurs de croissance impliqués dans cette boucle peuvent déstabiliser le système immunitaire. Par exemple, l'IL-4 et l'IL-10 sont des facteurs de croissance produits par certains carcinomes thyroïdiens⁵⁶. Ces deux cytokines peuvent polariser la réponse T vers une réponse Th2. Cette polarisation inactive l'immunité anticancéreuse liée à la réponse Th1. L'IL-6, impliqué dans de nombreux cancers (cancer de la prostate, du rein et le myélome), est l'un des plus importants facteurs de croissance agissant de manière autocrine. L'IL-6 induit l'activation du facteur de transcription STAT3. L'activation de STAT3 dans la tumeur permet l'échappement des cellules tumorales en bloquant la production et la détection des signaux inflammatoires par le système immunitaire⁵⁷.

(2) Insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs

Un des plus importants facteurs bloquant la prolifération est le TGF β . Dans de nombreux modèles, il a été mis en évidence que les cellules tumorales développent des mécanismes qui désactivent la voie du TGF β (mutation ou perte des récepteurs aux TGF β , mutations SMAD4...). De plus, le TGF β favorise la transition épithélio-mésenchymateuse, la motilité des cellules tumorales et la formation de métastases⁵⁸. Le TGF β est un facteur immunosuppresseur très puissant et agit à différents niveaux de la réponse immunitaire. Il inhibe la présentation des antigènes par les cellules dendritiques, l'activité de l'IFN γ , la prolifération des lymphocytes T, l'activité cytotoxique des NK et induit la prolifération des lymphocytes T régulateurs⁵⁹. En ignorant les signaux inhibiteurs de croissance liés au TGF β , les cellules tumorales peuvent croître dans un environnement normalement immunosuppresseur, riche en TGF β .

(3) Evasion de l'apoptose

Les cellules tumorales, qui sont incapables d'éviter la détection par les cellules immunitaires, peuvent développer des mécanismes pour échapper à la mort induite par la réponse immunitaire. Même lorsque les antigènes tumoraux sont exprimés, les tumeurs peuvent échapper aux lymphocytes effecteurs en exprimant des molécules anti-apoptotiques comme FLIP et BCL-XL^{60,61}. Des mutations rendant les récepteurs de mort TRAIL, DR5 et Fas inactifs, permettent aux cellules tumorales de résister à la lyse par les cellules immunitaires⁶².

Les stratégies d'échappement peuvent être considérées comme passives, impliquant la perte de la reconnaissance ou de la sensibilité à l'apoptose. Cependant, les cellules tumorales peuvent jouer un rôle plus actif et direct dans l'immunité à travers l'expression de ligands inhibiteurs à leur surface. Ces ligands inhibent l'action cytotoxique des cellules immunitaires après la reconnaissance directe des cellules tumorales. L'expression de B7-H1 (PD-L1), HLA-G, et HLA-E des cellules tumorales interagit avec les récepteurs membranaires des cellules T pour inhiber les fonctions cytotoxiques de lymphocytes T ou induire l'apoptose de la cellule T^{63,64,65}.

(4) Angiogenèse favorisée

En plus de promouvoir l'angiogenèse, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF pourrait inhiber l'immunité anti-tumorale, en inhibant l'activation du facteur NFκB dans les cellules dendritiques, empêchant leur maturation⁶⁶, mais également en supprimant l'activation des cellules T⁶⁷. De plus la prostaglandine E2 (PGE2) impliquée dans l'angiogenèse, inhibe l'immunité anti-tumorale par la suppression des macrophages et des lymphocytes T et par la polarisation de la réponse T vers les cellules TH2⁶⁸.

De plus, le système immunitaire contribue à la progression tumorale en sélectionnant les variants les plus agressifs des cellules tumorales et en bloquant la réponse anti-tumorale. Les cellules transformées sont capables d'échapper à l'immunosurveillance soit par immunosélection, c'est-à-dire par la sélection de variants cellulaires tumoraux non immunogènes, soit par immunosubversion, c'est-à-dire par des mécanismes actifs de suppression de la réponse immunitaire capables d'induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur.

b) Immunosélection

Les tumeurs développent une série de stratégies pour échapper à l'immunosurveillance, et ces stratégies sont le résultat de la pression sélective exercée par le système immunitaire. Elles sont donc appelées immunosélection.

L'échappement des cellules tumorales peut résulter de changements au niveau de la tumeur qui permettent d'inhiber directement la reconnaissance ou la cytolyse des cellules tumorales par les cellules effectrices du système immunitaire. La tumeur échappe totalement à la reconnaissance du système immunitaire en limitant sa croissance et en induisant une tolérance centrale ou périphérique. En plus de la tolérance, les cellules tumorales peuvent acquérir des défauts dans les voies de traitement et de présentation des antigènes ce qui empêche leur reconnaissance par les cellules du système adaptatif.

En particulier, la perte de TAP1, des molécules CMH de classe I, de la $\beta 2$ microglobuline, de LMP2, et de LMP7 et le développement de l'insensibilité à l'IFN γ ou l'IFN α/β par les cellules tumorales empêchent leur élimination par les cellules T, augmentant donc la progression tumorale^{69,57,70}. Ce processus d'évasion devient puissant lorsque les tumeurs perdent la capacité de répondre à l'IFN γ , par mutation ou inactivation épigénétique des gènes codant les composants des voies de signalisation de l'IFN γ (IFN γ R1, IFN γ R2, JAK1, JAK2, et STAT1)⁷¹. Dans ce cas, les cellules tumorales touchées ne parviennent pas à augmenter l'expression du CMH de classe I, et sont incapables de produire la machinerie intracellulaire qui facilite le traitement et la présentation d'antigène (TAP1, TAP2, et les composants du protéasome). En outre, l'instabilité génomique dans les cellules tumorales peut entraîner la perte des antigènes tumoraux, qui ne sont plus détectables par des cellules T CD8+ spécifiques de l'antigène. De même, les tumeurs peuvent ne plus être reconnues par les cellules du système immunitaire inné, soit par la perte de ligands pour les récepteurs NKG2D⁷² ou par la suppression de signaux pro-inflammatoires, ce qui empêche la maturation des DC de façon dépendante de STAT3⁵⁷. Ainsi, les cellules tumorales peuvent échapper, par de multiples mécanismes, à la reconnaissance par les systèmes innés et adaptatifs.

Plusieurs produits tumoraux qui ne sont pas indispensables aux caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses sont impliqués dans l'immunosubversion c'est-à-dire la suppression active de la réponse immunitaire (Figure 5).

c) Immunosubversion

(1) Les cellules dendritiques

L'immunité anti-tumorale peut être bloquée, à un stade précoce, par des facteurs dérivés de la tumeur qui inhibent la fonction des DC. En réponse à des signaux de danger et de stress cellulaire, les DC sont stimulées, migrent, et transportent les antigènes tumoraux dans les ganglions lymphatiques alertant ainsi l'immunité adaptative de la présence de cellules transformées. Pour inhiber cet événement initial, les cellules tumorales sécrètent des métabolites des stéroïdes, dont le ligand de LXR α , qui supprime l'expression de CCR7 à la surface des DC, ce qui perturbe leur migration vers les ganglions lymphatiques⁷³. Une étude récente démontre que des facteurs inconnus d'origine tumorale induisent l'expression du récepteur « scavenger » A1 sur les DC, ce qui entraîne une absorption excessive de lipides extracellulaires et une réduction de leur capacité à apprêter les antigènes^{74,75}.

(2) Les lymphocytes T

Certaines tumeurs (ou les cellules myéloïdes associées aux tumeurs) produisent une grande quantité d'oxyde nitrique et augmentent l'activité de l'arginase-1, inhibant ainsi les fonctions T⁷⁶. Plus important encore, la dégradation du tryptophane par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui est constitutivement exprimée par les tumeurs humaines (en particulier par les carcinomes de la prostate, du côlon et du pancréas) mais aussi par les cellules dendritiques interdigitées, favorise la résistance de la tumeur aux cellules immunitaires. IDO peut bloquer la prolifération des cellules T CD8+ sur le site tumoral⁷⁷, et promouvoir l'apoptose des lymphocytes T CD4+⁷⁸. De plus, la production de la galectine peut entraver l'activité et la survie des cellules T. Le blocage de ce facteur peut favoriser le rejet de la tumeur chez la souris⁷⁹. En règle générale, les lymphocytes T CD8+ spécifiques de la tumeur sont activés dès le stade de l'initiation tumorale, mais ces cellules montrent une perte de leur fonction cytolytique au cours de la croissance tumorale⁸⁰. De même, les cellules T CD4+ spécifiques

perdent progressivement leur activité anti-tumorale⁸¹, alors que le nombre de lymphocytes T régulateurs augmente⁸².

(3) Les lymphocytes T régulateurs

Les cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺ CD25⁺ exprimant le facteur de transcription Foxp3, inhibent la fonction CTL de différentes façons, y compris en produisant l'IL-10, le TGFβ, l'adénosine, et en exprimant CTLA-4 et PD-L1⁸³. Les Tregs sont essentiels dans la tolérance périphérique, et sont souvent recrutés dans le site tumoral où ils suppriment l'immunité anti-tumorale. Par ailleurs, la production de TGFβ par les cellules tumorales peut transformer les cellules T effectrices en Tregs qui, à leur tour, vont supprimer d'autres lymphocytes T effecteurs infiltrants la tumeur⁸⁴. Des modèles expérimentaux de tumeurs associés à l'élimination des Tregs montrent une réponse immunitaire anti tumorale efficace^{85,86}. En plus des Tregs, d'autres populations de lymphocytes régulateurs peuvent être mis en évidence, les cellules NKT et les lymphocytes B, qui inhibent les réponses effectrices^{87,88}.

(4) Les NKT

Dans un modèle de tumeur induite par des irradiations aux ultraviolets, l'immunosuppression est médiée par les cellules NKT exprimant CD1d. Ces cellules NKT CD4⁺ produisent de l'IL-13, qui supprime le rejet des tumeurs par les CTLs en utilisant une voie de signalisation impliquant la chaîne α du récepteur à l'IL-13 et STAT6⁸⁹.

(5) Les lymphocytes B

Certaines études montrent une augmentation de la réponse T CD4⁺ et CD8⁺ dans le modèle de tumeur mammaire TS/A chez les souris μMT déficientes en lymphocytes B. Ces résultats suggèrent que les cellules B peuvent également réguler négativement l'immunité tumorale⁸⁷.

(6) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Une autre population cellulaire recrutée au niveau de la tumeur, les DC plasmacytoïdes (pDC) peuvent jouer un rôle essentiel dans l'immunosuppression. Les produits dérivés de cellules cancéreuses ovariennes humaines activent les pDC, qui à leur tour favorisent l'expansion de lymphocytes CD8+ régulateurs produisant de l'IL-10⁹⁰. Les β -défensines recrutent des précurseurs des DC à travers CCR6 dans la tumeur. Le VEGF-A présent dans la tumeur transforme ces cellules en cellules de type endothélial qui améliorent la vascularisation et suppriment la fonction DC classique à travers la sécrétion de VEGF et d'autres cytokines pro-inflammatoires⁹¹.

(7) Les macrophages

De nombreuses tumeurs attirent les TAM en produisant l'IL-4 et l'IL-13. Les macrophages M2 peuvent inhiber l'immunité anti-tumorale par la production de TGF β , de l'arginase-1, de l'IL-10, et de la PGE2 et favoriser le développement du stroma et de l'angiogenèse par la sécrétion du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)⁹². Ces macrophages induisent des réponses TH2 (alors que les macrophages M1, qui sont tumoricides, produisent NOS2, IL-12 et la lymphotoxine-alpha)⁹³. De plus, les cellules tumorales sont capables d'exprimer Fas-ligand, pouvant ainsi induire la mort de lymphocytes T spécifiques de la tumeur exprimant Fas. D'autre part, des molécules comme B7-H1 (et B7-H4) qui sont exprimées par certaines tumeurs (par exemple, en réponse à l'INF- γ), favorisent directement l'apoptose des cellules T via PD1⁶³ ou par des voies indépendantes de PD1 (qui sont médiées par l'IL-10 ou CD95)^{94,95}.

L'immunosubversion pourrait être également liée au volume tumoral lui-même et à une tolérance liée à une exposition massive aux antigènes tumoraux. Il est ainsi montré que la libération de ligands de NKG2D, comme MICA ou MICB, survient progressivement au cours du développement de la tumeur⁹⁶. Ces ligands sont normalement capables d'activer une réponse anti-tumorale efficace dépendante des lymphocytes T CD8 et des NK⁴³. Ce phénomène existe essentiellement lorsque le volume tumoral est réduit, mais tend à disparaître progressivement avec l'augmentation de la taille tumorale, notamment en raison d'une diminution de NKG2D dans ces cellules^{97, 98}. Ce phénomène est induit par les ligands

solubles de NKG2D, qui sont capables (contrairement aux ligands membranaires) de provoquer l'internalisation du récepteur⁹⁶. Une preuve indirecte de ce concept d'immunosubversion induite par la masse tumorale est la constatation de la restauration d'une réponse T CD8 spécifique après une chimiothérapie efficace en terme de réduction du volume tumoral, ou après excrèse chirurgicale de la tumeur primitive⁹⁹. De même, les tumeurs sont capables de favoriser l'accumulation de cellules myéloïdes immatures suppressives (MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells), qui favorisent la croissance tumorale, et bloquent la réponse immunitaire via de nombreux mécanismes différents, qui feront l'objet du chapitre suivant.

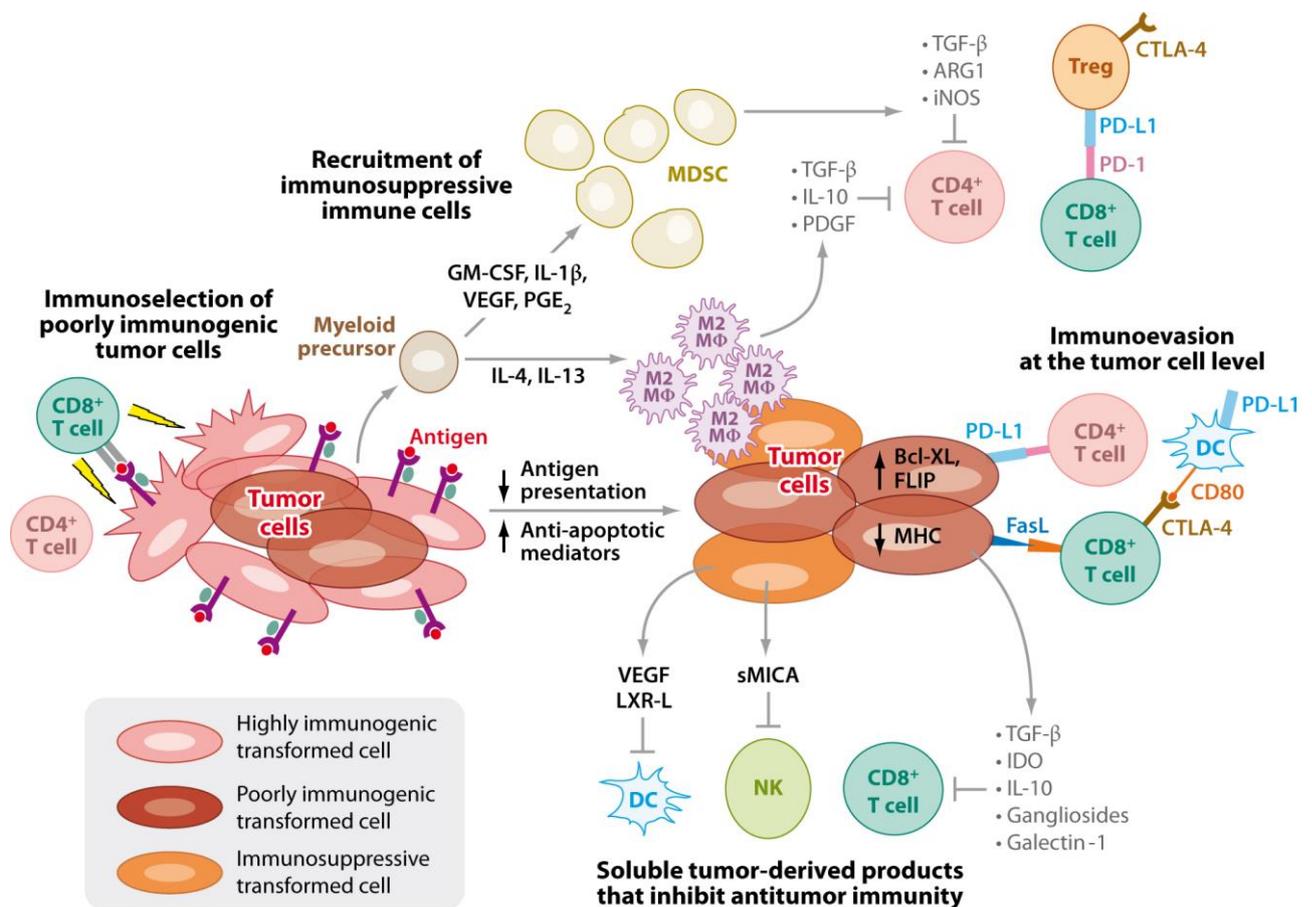


Figure 5 Récapitulatif des mécanismes de l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire décrits ci-dessus.

Le système immunitaire permet la progression tumorale en sélectionnant les variants les plus agressifs des cellules tumorales et en bloquant la réponse anti-tumorale. D'après¹⁰⁰

B. Les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells)

Une des étapes majeures du processus d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est l'accumulation de cellules myéloïdes suppressives.

Cependant, malgré l'intérêt croissant pour cette population cellulaire et son rôle dans le cancer, la nature exacte, la caractérisation, le développement de ces cellules chez l'animal et chez l'homme restent encore mal définis. Chez les personnes atteintes d'un cancer, ces cellules sont susceptibles d'être un facteur majeur bloquant l'efficacité des immunothérapies¹⁰¹.

Les cellules myéloïdes suppressives ont été décrites il y a plus de 20 ans chez les patients atteints d'un cancer^{102,103,104}, mais leur importance fonctionnelle dans le système immunitaire n'a été que récemment appréciée. L'accumulation des cellules myéloïdes et leur fonction suppressive chez les personnes atteintes d'un cancer ont été reconnues lorsqu'un nombre excessif de cellules myéloïdes CD34+ a été remarqué dans le sang des patients atteints de carcinomes épidermoïdes ORL^{105,106} et chez la souris présentant des tumeurs pulmonaires. Actuellement, il est clair que cette population de cellules ayant une activité suppressive contribue à la régulation négative des réponses immunitaires au cours de la croissance tumorale et dans d'autres maladies. Les propriétés qui sont communes à toutes les MDSC sont leur origine myéloïde, leur état immature et une remarquable capacité à supprimer les réponses des cellules T. En plus de leurs effets suppresseurs sur les réponses immunitaires adaptatives, les MDSC régulent aussi les réponses immunitaires innées en modulant la production de cytokines par les macrophages¹⁰⁷. D'autres fonctions des MDSC ont également été décrites, telles que la promotion de l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases. Les MDSC sont une population hétérogène de cellules qui se compose de cellules progénitrices myéloïdes et des cellules myéloïdes immatures (IMC). Chez les individus sains, les IMC qui sont générées dans la moelle osseuse se différencient rapidement en granulocytes matures, en macrophages ou en cellules dendritiques (DC). Ces cellules s'accumulent aussi lors de la réponse immunitaire à une infection bactérienne^{108,109} et parasitaires¹¹⁰, à la chimiothérapie¹¹¹, dans l'auto-immunité induite expérimentalement^{112,113}, ainsi que dans le stress¹¹⁴. Les MDSC ont un rôle majeur dans les

dysfonctionnements du système immunitaire chez la plupart des patients atteints de tumeurs¹¹⁵.

Dans des conditions pathologiques, l'activation des MDSC se traduit par l'expression de facteurs immunosuppresseurs, telles que l'arginase 1 (codée par ARG1) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS; également connu sous le nom NOS2), ainsi qu'une augmentation de la production de NO (oxyde nitrique) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Chez des souris porteuses de tumeurs, les MDSC s'accumulent dans le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate, ainsi que dans les tumeurs solides primaires et métastatiques, et dans une moindre mesure dans les ganglions lymphatiques^{116,108,117,118,119}. Chez les patients cancéreux, elles sont présentes dans le sang^{120,121,122}.

1. Sous-populations

a) Chez la souris

Chez la souris, les MDSC sont caractérisées par les marqueurs Gr-1 et CD11b. L'antigène de la lignée myéloïde, Gr-1, est exprimé sur les cellules précurseurs myéloïdes, granulocytes, et de façon transitoire sur les monocytes¹²³. Le récepteur CD11b (Mac-1) est une intégrine αM qui est exprimée sur la surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques (DC), des granulocytes, et des lymphocytes B et T activés. Les cellules Gr-1+ CD11b+ représentent environ 30-40% des cellules normales de la moelle osseuse et seulement 2-4% des splénocytes nucléés. L'analyse morphologique montre que ces cellules sont composées d'un mélange de cellules myéloïdes de morphologie polynucléaire et mononucléaire.

En présence de facteurs de croissance appropriés et/ou des cytokines, les cellules Gr-1+ d'une souris porteuse d'une tumeur peuvent être différenciées *in vitro* en DC ou en macrophages^{124, 125, 126}. Ces cellules ont la capacité se différencier dans les organes lymphoïdes et dans la tumeur.

Dans les organes lymphoïdes, les MDSC se différencient principalement en cellules présentatrices d'antigène, notamment en cellules dendritiques et en macrophages, tandis que, dans le microenvironnement de la tumeur, elles deviennent des macrophages associés à la tumeur et/ou à des cellules endothéliales. La proportion de cette population de cellules

myéloïdes dans la rate des souris porteuses de tumeurs peut atteindre jusqu'à 50% de tous les splénocytes¹²⁷.

L'antigène de différenciation myéloïde Gr-1 (Ly6G et C) est exprimé par des cellules exprimant le marqueur de granulocytes Ly-6G et par des cellules monocytaires exprimant le marqueur Ly6C. Il est devenu évident que ces deux populations peuvent avoir une fonction et une configuration différentes dans les maladies infectieuses et auto-immunes^{128,112}. Chez les souris porteuses de tumeurs, les MDSC granulocytaires (G-MDSC) sont caractérisées par le phénotype CD11b+ Gr1^{hi}Ly6G+ Ly6C^{low/mid}CD49d-. Elles représentent la majorité des MDSC circulantes. Les MDSC monocytiques (M-MDSC) sont principalement CD11b+ Gr1^{mid}Ly6G⁻ Ly6C^{hi}CD49d+^{129,130}. Ce sous-ensemble de MDSC peut également inclure des progéniteurs qui produisent un sous-ensemble de macrophages CD11b^{hi}Gr1^{low}Ly6G⁻F4/80^{hi}CMH2+ avec de puissantes propriétés immunosuppressives^{131,132}. L'expansion des MDSC est limitée principalement aux G-MDSC dans la plupart des modèles de tumeurs. L' α -chaîne du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13 (IL-4R α)^{133,134}, le M-CSF-1R ou c-fms (CD115)¹³⁵, et la molécule de costimulation CD80¹³⁶ ont également été décrits sur certains sous-ensembles de MDSC. Apparemment, divers facteurs dérivés des tumeurs jouent un rôle dans l'expansion des différentes populations de MDSC. La nature exacte de ces facteurs doit encore être déterminée. Les G-MDSC et les M-MDSC inhibent la fonction des cellules T-via des mécanismes différents.

b) Chez l'homme

Les données sur les MDSC sont limitées dans les maladies humaines. Des marqueurs différents ont été utilisés pour analyser les sous-types de MDSC chez l'homme dans divers milieux cliniques, ce qui complique l'analyse des données. Les MDSC humaines sont CD11b+, CD33+, HLA-DRneg/low et peuvent être divisées en populations granulocytaires CD14- et en populations monocytaires CD14+. Le récepteur α à l'interleukine 4¹³⁷, le récepteur au VEGF¹³⁸, CD15¹²⁸ et CD66b ont été proposés pour être des marqueurs plus spécifiques des MDSC humaines. Cependant tous ces marqueurs ne peuvent être trouvés sur certains sous-ensembles de MDSC. Chez les patients porteurs de cancers du rein, du sein, du pancréas, ou du côlon^{138, 139}, il existe un contingent majoritaire de cellules myéloïdes polymorphonucléaires exprimant CD11b et CD15¹³⁹ (ces marqueurs étant caractéristiques

de la lignée granulocytaire polymorphonucléaire), ainsi que CD66b, marqueur des polynucléaires neutrophiles (PNN) activés, mais n'exprimant pas en revanche le marqueur monocyttaire CD14. Encore aujourd'hui, le meilleur marqueur des MDSC chez l'homme reste leur fonction suppressive, qui peut être soit directe soit indirecte par l'induction de cellules T régulatrices.

Cette abondance de marqueurs souligne en outre la complexité pour définir ces cellules, probablement en raison de la nature dynamique et plastique du compartiment myéloïde et sa capacité à répondre rapidement aux signaux délivrés par la tumeur. Des preuves récentes indiquent que l'accumulation de MDSC dans le sang périphérique (Lin-/low, HLA-DR, CD33 + CD11b +) est généralement en corrélation avec le stade tumoral chez les patients atteints de tumeurs solides.

2. Origine et devenir des MDSC

Ces différentes études suggèrent que chez l'homme comme chez la souris, différents types tumoraux sont susceptibles d'induire différentes populations de MDSC^{140, 141}, probablement en bloquant leur maturation à des niveaux différents.

Ce phénomène étant étroitement dépendant du contexte tumoral et des différentes combinaisons de facteurs solubles produits par la tumeur et par son microenvironnement, le phénotype des MDSC chez l'homme n'est donc pas fixe, et les MDSC doivent plutôt être définies par leur fonction biologique immunosuppressive commune que par un phénotype homogène. La question de savoir si les MDSC sont des cellules normales dont la différenciation est bloquée, ou si elles constituent une population ayant divergé de la différenciation myéloïde normale vers une différenciation anormale, reste encore sans réponse précise, même si les expériences de différenciation des MDSC provenant de souris porteuses de tumeur en DCs sous l'effet de l'acide tout transrétinoïque, plaident plutôt en faveur de la première hypothèse^{127, 142}.

Le mécanisme de la différenciation des MDSC et les signaux qui contrôlent cet engagement et leur fonction biologique ne sont pas bien compris. Une étude récente¹⁴³ montre que les MDSC, qui peuvent être des précurseurs des macrophages immatures, ont le potentiel de se différencier en deux phénotypes macrophagiques M1 et M2. De plus, les MDSC qui ont subi

l'ablation de PIR-B (Paired Immunoglobulin-like Receptor B) (Lilrb3-/-) acquièrent une transition spécifique vers des cellules de type M1 lors de leur entrée dans la périphérie de la moelle osseuse. Cette transition entraîne une diminution des fonctions suppressives, de l'activation des cellules régulatrices, de la croissance des tumeurs primaires et des métastases pulmonaires. L'activation de Toll-like receptor (TLR), des transducteurs de signal, de STAT1, et du facteur nucléaire-kappa B (NF-kB) dans les MDSC Lilrb3-/- permettent l'acquisition du phénotype M1. PIR-B3 semble jouer un rôle dans la différenciation des MDSC. De plus, l'activité suppressive des MDSC est dépendante du facteur de transcription C/EBP β ¹¹⁶.

3. Expansion des MDSC

Les MDSC s'accumulent et s'activent grâce à de nombreux facteurs souvent en lien avec une inflammation chronique. Les premières études ont démontré que le VEGF et le GM-CSF étaient associés à l'accumulation de MDSC^{144,120} et ont suggéré que l'inflammation pourrait faciliter la suppression immunitaire¹⁴⁵. Le rôle clé de l'inflammation dans l'expansion des MDSC a été apprécié lorsque des études ont montré que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β ^{146,147}, IL-6¹⁰⁷ et le lipide bioactif PGE2¹⁴⁸ induisaient l'expansion des MDSC.

a) GM-CSF

Beaucoup de tumeurs murines et humaines sécrètent le GM-CSF qui implique la génération et l'accumulation des MDSC dans les organes lymphoïdes secondaires et au niveau du site tumoral supprimant ainsi la réponse anti-tumorale des cellules T^{149,118}. Ce phénomène a également été observé chez les souris traitées avec la protéine recombinante GM-CSF¹⁵⁰. De plus, le GM-CSF agit différemment sur les deux sous-ensembles de MDSC. Il permet l'expansion des deux types de MDSC, CD11b+Gr1int et CD11b+ GR1low dans la rate des souris porteuses de tumeurs, mais n'augmente que les MDSC CD11b+Gr-1low dans la moelle osseuse¹²⁹.

b) VEGF

Le VEGF produit par de nombreuses tumeurs stimule l'angiogenèse¹⁵¹ et fournit des substances nutritives aux cellules tumorales. Dans la tumeur, le VEGF réduit la quantité de DC et interfère avec leur fonction *in vivo* et *in vitro*, alors que le nombre de précurseurs

immatures des DC augmentent^{152,153}. Récemment, il a été observé que le blocage du récepteur au VEGF entraîne des modifications des cytokines intra-tumorales. Cette inhibition de la liaison du VEGF à son récepteur est efficace pour contrôler la croissance tumorale et réduit l'infiltration de cellules de type MDSC, cellules T régulatrices et macrophages, tout en augmentant la fraction des DC¹⁵⁴.

c) IL-6 et IL-1 β

L'IL-1 β est une cytokine pléiotropique qui induit la production d'une cascade de molécules, y compris l'IL-6, des prostaglandines et des molécules d'adhésion par les cellules stromales et les cellules infiltrant les tumeurs^{155,156}.

Des souris inoculées avec des cellules tumorales produisant de l'IL-1 développent une expansion significative des cellules Gr1+ CD11b+ en comparaison à des souris inoculées avec des cellules tumorales qui ne sécrètent pas de l'IL-1^{146,147}. Le même phénomène est observé en utilisant des cellules de carcinome mammaire de souris transfectées sécrétant de l'IL-6¹⁰⁷. L'effet de l'IL-1 β a été confirmé par une autre étude dans lequel l'IL-1 β est sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'estomac. Les souris transgéniques développent des niveaux élevés de MDSC et des cancers de l'estomac¹⁵⁷. L'accumulation des MDSC induite par l'IL-1 β n'est pas dépendante des cellules T, des cellules B et des cellules NK. Dans ce contexte, les MDSC ont des niveaux de ROS augmentés et présentent une augmentation de l'activité suppressive contre les T CD4+ et les CD8+ par rapport à des MDSC induites dans des environnements moins inflammatoires.

Les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-1 ont une accumulation tardive de MDSC et ont une progression réduite de la tumeur primaire et métastatique. L'accumulation des MDSC et la progression tumorale sont en partie restaurées par l'IL-6, indiquant que l'IL-6 est un médiateur en aval de l'IL-1 β . L'IL-6 est donc impliquée dans l'expansion des MDSC. En revanche, l'inflammation excessive des souris déficientes pour l'IL1-RA favorise l'accumulation de MDSC et leur activité suppressive¹⁰⁷.

d) PGE2

La PGE2 et la COX-2, qui est requise pour la conversion de l'acide arachidonique en PGE2, sont de puissants médiateurs inflammatoires. Elles sont produites par de nombreuses

cellules tumorales et contribuent à l'inflammation dans la tumeur^{158, 159}. Les macrophages infiltrant les tumeurs produisent également la PGE2, ce qui permet l'amplification du milieu inflammatoire dans la tumeur¹⁶⁰. La PGE2 facilite la croissance tumorale au moyen de plusieurs mécanismes non dépendants du système immunitaire, elle favorise l'angiogenèse, la protection contre l'apoptose, et stimule la prolifération cellulaire et les métastases¹⁶¹.

Les MDSC expriment les quatre récepteurs à la PGE2 (EP-1 à EP-4). La signalisation via EP-4 dans les MDSC est capable d'activer l'expression et l'activité de l'arginase 1. Toutefois la croissance tumorale est plus réduite chez les souris déficientes pour EP-2 et leurs MDSC sont moins suppressives par rapport à des MDSC de souris sauvages. Le traitement des souris porteuses de tumeurs avec un inhibiteur de la COX-2 réduit la proportion des MDSC et la progression tumorale est retardée¹⁶². Par conséquent, des niveaux élevés de PGE2 peuvent promouvoir la progression tumorale notamment en limitant l'immunité anti-tumorale par l'induction des MDSC.

e) Protéines S100

Lorsque l'expression des protéines S100A8 et S100A9 dépendante de STAT3 est augmentée dans les progéniteurs des cellules myéloïdes, leur différenciation est empêchée ce qui induit une accumulation des MDSC dans la rate de souris porteuses de tumeurs et dans les souris naïves qui surexpriment S100A9. A l'inverse, il n'y a pas d'accumulation des MDSC dans la rate et le sang chez les souris déficientes pour cette protéine et le développement de tumeurs coliques est aboli¹⁶³. Dans une autre étude, les protéines S100A8 et S100A9 favorisent la migration des MDSC sur le site de la tumeur, en se liant aux récepteurs N-glycane carboxylés, qui sont exprimés à la surface des MDSC. Le blocage de la liaison de S100A8 et S100A9 à leurs récepteurs sur les MDSC *in vivo* réduit le nombre de MDSC dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires de souris porteuses de tumeurs¹¹⁹. Les hétérodimères S100A8/A9 exercent ces effets par deux mécanismes : ils bloquent la différenciation des précurseurs myéloïdes en DC et les macrophages de façon dépendante de STAT3¹⁶³ et ils attirent les MDSC dans les sites tumoraux par une voie dépendante de NF- κ B¹¹⁹. Les MDSC produisent également ces protéines S100A8/A9, impliquant donc une boucle autocrine qui soutient l'accumulation des MDSC.

f) Autres facteurs impliqués

Les cytokines induisant les MDSC agissent via une voie moléculaire commune et l'activité suppressive des MDSC est dépendante du facteur de transcription C/EBP β . Le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène tumoral a permis le traitement de tumeurs établies uniquement chez des souris dépourvues de C/EBP β dans le compartiment myéloïde, ce qui suggère que C/EBP β est un régulateur essentiel de l'environnement immunosuppresseur de la tumeur¹⁶⁴. Une autre étude montre que seuls les récepteurs à l'adénosine A2B peuvent promouvoir l'expansion préférentielle des MDSC granulocytaire CD11b⁺ Gr1^{high}. De plus, la production d'adénosine péricellulaire par l'ectonucléotidase CD73, qui est fortement exprimée sur ces cellules, peut contribuer à leurs propriétés immunosuppressives¹⁶⁵.

4. Activation des MDSC

L'activité immunosuppressive des MDSC ne nécessite pas seulement leur expansion, mais aussi leur activation. Un certain nombre de facteurs, dont la plupart sont produits par les cellules du stroma tumoral et par les lymphocytes T, comme l'INF γ , l'IL-4, l'IL-13, le TGF β , mais aussi certaines fractions du complément, sont ainsi capables d'activer différentes voies de signalisation dans les MDSC, s'appuyant en général sur les facteurs de transcription STAT1, STAT3 et STAT6, et NF- κ B (Figure 6).

a) Voie IFN γ STAT1

La suppression des cellules T par les MDSC est dépendante de la production d'IFN γ par les cellules T^{166,117}. STAT1 est le principal facteur de transcription impliqué dans la signalisation induite par l'IFN γ et joue un rôle dans la régulation de l'arginase 1 et dans l'expression d'iNOS dans les MDSC. L'arginase 1 et iNOS sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'arginine. En réponse à une production exogène ou autocrine d'IFN γ , les MDSC génèrent ces enzymes et de l'IL-13 ce qui va induire l'expression des récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-13 dans les MDSC¹³⁴. De plus, les MDSC de souris Stat1^{-/-} n'ont pas d'augmentation de l'expression de l'arginase 1 et de iNOS et donc n'inhibent plus la réponse de ces cellules¹¹⁷.

b) Voie IL-4 STAT6

L'activation de la voie de signalisation du récepteur à l'IL-4 et de STAT6 (activé par la liaison de l'IL-4 ou de l'IL-13) dans les MDSC induit l'expression de l'arginase et l'augmentation de son activité¹⁶⁷. Ce phénomène est bloqué lorsque les MDSC sont déficientes pour STAT6¹⁶⁸. Cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la production de TGF β via l'IL-13 chez les souris atteintes de sarcome réduisant ainsi l'immunosurveillance^{169,170}. Toutefois, dans un modèle de cancer du sein, les souris déficientes en IL-4R α conservent un nombre élevé de MDSC dans la rate après l'ablation chirurgicale de la tumeur mammaire¹⁶⁸. Collectivement, ces données indiquent que la voie IL4R α /STAT6 pourrait ne pas être impliquée dans la promotion de l'immunosuppression dans tous les modèles de tumeurs.

c) Les récepteurs Toll Like (TLR)

Les TLR ont un rôle central dans l'activation des réponses immunitaires innées. La septicémie polymicrobienne qui libère des produits microbiens dans la circulation systémique et dans le péritoine peut induire une expansion des MDSC dans la rate. Cette expansion des MDSC est dépendante de l'adaptateur des TLR, MyD88¹⁰⁹. Toutefois, les MDSC des souris de type sauvage et des souris dépourvues d'un TLR4 fonctionnel prolifèrent de façon comparable au cours de la septicémie polymicrobienne. Ceci suggère que la signalisation par le biais de TLR4 n'est pas nécessaire pour l'expansion des MDSC et que l'activation des MDSC par la voie de signalisation dépendante de MyD88 est déclenchée par les autres TLR dans des conditions de septicémie¹⁰⁹. Ces observations indiquent que l'activation des MDSC est la conséquence de la réponse immunitaire innée aux pathogènes qui expriment les ligands de TLR.

Il est important de noter que l'augmentation de la production et le recrutement de cellules myéloïdes immatures dans le contexte de maladies infectieuses aiguës ou après la vaccination ne reflètent pas nécessairement l'expansion d'une population immunosuppressive de MDSC. Il est probable que dans des conditions pathologiques, l'expansion de MDSC est régie par deux groupes de facteurs différents qui ont des activités qui se chevauchent partiellement: ceux qui induisent l'expansion des MDSC et ceux qui induisent leur activation. Ce système à deux vitesses peut permettre une certaine souplesse dans la régulation de ces cellules dans des conditions physiologiques et pathologiques.

d) Le complément

En plus de son rôle classique dans la lyse des cellules médiée par les anticorps, le système du complément est un acteur clé dans la lutte contre les infections et dans les réactions inflammatoires¹⁷¹. Dans les voies classiques, la C5 convertase (qui comprend C3a) génère C5a du C5. Le C5a, également connu sous le nom d'anaphylatoxine, et C3a ont une activité inflammatoire, ils sont chimiotactiques, et se localisent dans les cellules endothéliales dans les tumeurs solides^{171,172}. D'autres études utilisant des souris déficientes pour le récepteur au C5a indiquent que le C5a augmente la progression tumorale et que ces effets sont liés à la liaison du C5a aux récepteurs sur les MDSC. C5a augmente la migration des MDSC granulocytaires, mais pas celle des MDSC monocytaires dans les tumeurs solides et les organes lymphoïdes périphériques. L'expression des ROS et des espèces réactives d'azote est induite dans les MDSC monocytaires mais pas dans les MDSC granulocytaires¹⁷³. L'activation directe des MDSC par ces composants du complément identifie des médiateurs pro-inflammatoires supplémentaires qui pourraient être ciblés pour éliminer les MDSC.

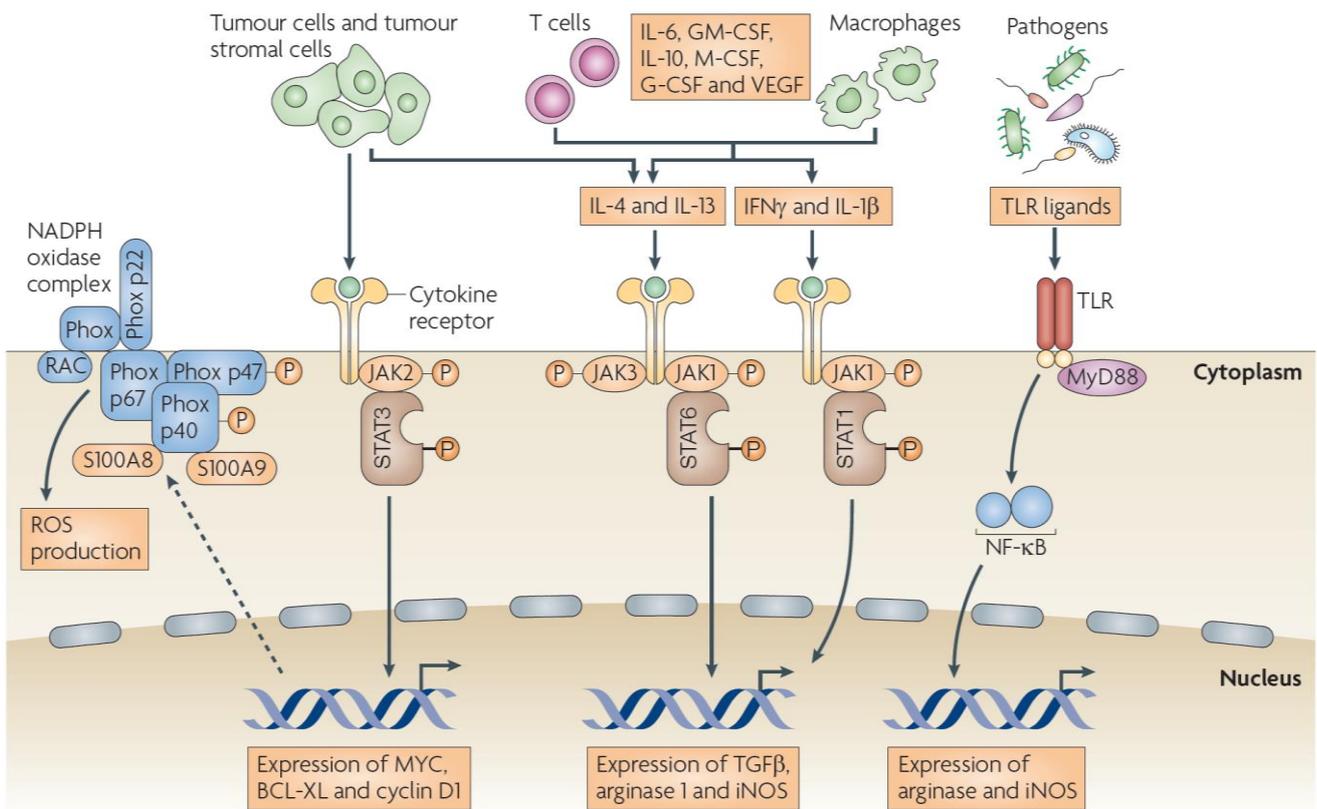


Figure 6 Voies de signalisations impliquées dans l'expansion des MDSC.

L'accumulation des MDSC est régie par plusieurs facteurs qui sont libérés par les cellules tumorales, les cellules tumorales du stroma, les lymphocytes T activés, les macrophages, les cellules tumorales apoptotiques, des agents bactériens et viraux,

et par les cellules infectées par des agents pathogènes. Ces facteurs déclenchent plusieurs voies de signalisation différentes dans les MDSC et la famille des facteurs de transcription STAT. D'après ¹¹⁵

5. Mécanismes impliqués dans l'immunosuppression des MDSC

La caractéristique des MDSC est leur capacité à supprimer les réponses des lymphocytes T. De nombreux mécanismes différents sont impliqués dans ce processus (Figure7).

a) Métabolisme de la L-arginine

Historiquement, le métabolisme de la L-arginine a été le premier mécanisme décrit pour expliquer le potentiel immunosuppresseur majeur des MDSC. La L-arginine sert de substrat pour deux enzymes: l'oxyde nitrique synthase, qui génère le NO, et la citrulline, et l'arginase, qui convertit la L-arginine (L-Arg) en urée et en L-ornithine. Plusieurs études ont suggéré une corrélation étroite entre la disponibilité de l'arginine et la régulation de la prolifération des lymphocytes T^{174,175}. Elles ont démontré que l'augmentation de l'activité de l'arginase 1 dans les MDSC amplifiait le catabolisme de l'arginine.

Un manque de L-arginine régule les fonctions des lymphocytes T en modulant l'expression de CD3 ζ ¹⁷⁶. La croissance tumorale est associée à l'expression et à l'activité accrue de l'arginase1 dans la rate des cellules myéloïdes¹⁷⁷, ce qui est très efficace dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T^{169,178}. Simultanément, les lymphocytes T sont dépendants de l'arginine pour leur prolifération et l'expression de la chaîne peptidique ζ du récepteur des cellules T. L'inhibition de la prolifération des cellules T, causée par le manque de la L-arginine, a été associée à un blocage de l'expression de la cycline D3 et de CDK4 laissant les cellules en phase G0-G1 du cycle¹⁷⁴. Le cancer de la prostate¹⁷⁹ chez l'homme et diverses tumeurs murines¹¹⁷ utilisent ce mécanisme pour échapper à l'immunosurveillance. Chez des patients atteints d'un carcinome du rein, les MDSC ont des niveaux plus faibles d'arginine. Chez la souris, la déplétion en MDSC rétablit la prolifération des cellules T et l'expression de la chaîne CD3 ζ ¹²². La suppression des cellules T dans le site tumoral est dépendante de la signalisation STAT1, qui commande l'activité de la NO synthase inducible (iNOS) et de l'arginase 1¹¹⁷.

La L-arginine est le substrat commun pour l'arginase et l'enzyme iNOS. Comme l'arginase 1, l'enzyme iNOS est induite par l'IFN γ . Il est possible que l'activité élevée de l'arginase dans les

MDSC abaisse le niveau de la L-arginine, ce qui pourrait augmenter la production de radicaux oxygénés comme le radical super oxyde¹⁶². Le radical super oxyde, lui-même, est très instable et est converti en H₂O₂ et en oxygène. Ceci est cohérent avec les données montrant que, dans les MDSC, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'accumulent principalement sous forme de H₂O₂¹⁶².

b) Les espèces réactives de l'oxygène

Les cellules myéloïdes sont les principales productrices de ROS et c'est une des caractéristiques majeures des MDSC. Des études ont montré que le stress oxydatif induit par les MDSC inhibe l'expression de la chaîne ζ dans les cellules T et la prolifération cellulaire induite par l'antigène¹⁸⁰. Les MDSC, isolées de souris porteuses de tumeurs, produisent des niveaux plus élevés de ROS que leurs homologues. L'inhibition des ROS dans les MDSC supprime l'effet négatif de ces cellules chez les souris et les patients atteints de cancers^{117,139}. La production de ROS par les neutrophiles isolés du sang de 16 patients atteints d'un carcinome du larynx, a été comparée à celle des neutrophiles obtenus à partir de 15 personnes en bonne santé. Les niveaux de ROS sont sensiblement plus élevés chez les patients cancéreux que chez les volontaires sains. Après une laryngectomie partielle ou totale, une diminution significative de la production de ROS et de l'activité sérique de la peroxydase catalase ont été observées¹⁸¹. Les intégrines, CD11b, ainsi que CD18 et CD29, permettent l'interaction entre les MDSC et les cellules T spécifiques de l'antigène¹⁶². Le blocage de ces intégrines inhibe la production de ROS et la suppression par les MDSC de la réponse T CD8+. Un certain nombre de cytokines et de facteurs de croissance produits par la tumeur peuvent induire la production de ROS, y compris le TGFβ, l'IL-10, l'IL-6, l'IL-3, le PDGF, le GM-CSF¹⁸². Des niveaux élevés de ROS ont été observés dans de nombreuses cellules cancéreuses et contribuent à la tumorigénèse, la formation de métastases et l'angiogénèse^{183,184,185}.

c) Le peroxyinitrite

Le peroxyinitrite est un produit de l'interaction entre le NO et le super oxyde. Il est l'un des oxydants les plus puissants. Le peroxyinitrite est présent sur les sites caractérisés par l'accumulation de MDSC et de cellules inflammatoires. Il induit la nitration de plusieurs acides aminés: la cystéine, la méthionine, le tryptophane et, aussi, la tyrosine. Le

péroxynitrite, produit pendant l'inflammation, est directement impliqué dans la promotion de la tumeur par la modification post-traductionnelle des différentes protéines. L'association du taux élevé de péroxynitrite avec la progression tumorale est retrouvée dans le cancer du pancréas, les gliomes malins, le cancer de la tête et du cou, le cancer du sein, le mélanome et le mésothéliome. Le NO bloque les cellules T par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Ces mécanismes impliquent l'inhibition de l'activation de la kinase Janus 3 (Jak3) et des facteurs de transcription STAT5¹⁸⁶, l'inhibition de la transcription du gène du CMH de classe II¹⁸⁷ et l'induction de l'apoptose dans les cellules T¹⁸⁸. Le péroxynitrite peut inhiber l'activation des cellules T et la prolifération en altérant la phosphorylation de la tyrosine et la mort par apoptose. *In vitro* et *in vivo*, les MDSC provoquent une augmentation du niveau de la nitrotyrosine (NT) dans les cellules T CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux¹⁸⁹. En bloquant la génération de la NT, la suppression des lymphocytes T CD8 par les MDSC est réversée. La nitration des résidus tyrosine du TCR et du CD8 peut entraîner la rigidité du TCR, ce qui perturbe la liaison du peptide/CMH des cellules T CD8. La neutralisation des péroxynitrites permet d'éliminer la tolérance induite par les MDSC¹⁸⁹. Le péroxynitrite, produit dans des conditions inflammatoires, peut modifier et inactiver les protéines ce qui peut avoir des conséquences importantes sur la capacité du système immunitaire à reconnaître les tumeurs. Récemment, il a été montré que les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs, notamment les MDSC, induisent la nitration des molécules du CMH de classe I sur les cellules tumorales, les rendant incapables de lier efficacement des peptides et, par conséquent, de rendre les cellules tumorales résistantes aux CTLs spécifiques de l'antigène¹³. Ce concept a suggéré que les tumeurs peuvent échapper au contrôle immunitaire même s'il existe des réponses des CTLs. L'échappement se produit car les cellules tumorales ne peuvent pas exprimer des peptides spécifiques sur le CMH1 qui ont permis de générer des CTLs. Il a été aussi montré que cette évasion pourrait être diminuée en bloquant la production de péroxynitrite, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de ROS ou de RNS (Reactive Nitrogen Species). Un autre exemple de ce type d'immunosuppression est la nitration de la chemokine CCL2 par les MDSC, un processus empêchant la migration des cellules lymphocytes T CD8 + effecteurs dans la tumeur¹⁹⁰.

d) Autres mécanismes

Les MDSC expriment la galactine 9 qui se lie à TIM3 sur les lymphocytes et induit l'apoptose des lymphocytes T¹⁹¹. L'expression de la protéine ADAM17 au niveau de la membrane plasmique des MDSC diminue l'expression de L-sélectine à la surface de CD4+ naïves et CD8+, limitant ainsi la recirculation des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques¹⁹². Les MDSC sont liées au dysfonctionnement de l'activation des cellules T dans le cancer, grâce à la production de TGFβ, d'IL-10 et de l'appauvrissement de la cystéine^{193,194,170,195}. Les MDSC permettent la baisse de la production d'IL-12 par les macrophages, et l'augmentation de leur propre production d'IL-10 en réponse à des signaux provenant des macrophages. Ce couplage réciproque entre les MDSC et les macrophages est susceptible de dévier l'immunité cellulaire T CD4 + et CD8 + vers une réponse de type 2 impliquant la promotion tumorale¹⁹⁶.

Les MDSC peuvent supprimer l'activation des cellules T en privant l'environnement de la cystéine, un acide aminé qui est essentiel à l'activation des cellules T. Les MDSC expriment le transporteur Xc, qui capture la cystéine, mais elles n'expriment pas le transporteur requis pour exporter la cystéine. Ainsi, elles privent les cellules T de la cystéine, un acide aminé essentiel nécessaire à leur activation¹⁹⁵. De plus, les MDSC inhibent la L-sélectine (CD62L), une molécule de la membrane plasmique nécessaire à la domiciliation des cellules T naïfs vers les ganglions lymphatiques¹⁹².

Un membre de la famille des récepteurs de surface B7(CD80) semblerait impliqué dans les fonctions suppressives des MDSC dans les cancers de l'ovaire¹³⁶. D'autres membres de molécules inhibitrices de la famille B7, comme les récepteurs PD-L1 et PD- L2 sont exprimés sur une variété de cellules myéloïdes et se sont révélés être directement impliqués dans la suppression des réponses immunes¹⁹⁷.

6. Effets suppresseurs sur les différents effecteurs de la réponse immunitaire (Figure 7)

a) Les lymphocytes CD8

Dans les organes lymphoïdes périphériques, la suppression des lymphocytes T CD8+ par les MDSC exige la présence de trois facteurs: les MDSC, les cellules T CD8+ activées spécifiques

de l'antigène et les antigènes associés aux tumeurs. Les MDSC bloquent la production de l'IFN γ par les cellules T CD8+, en réponse à des épitopes peptidiques présentés par le CMH de classe I *in vitro* et *in vivo*¹⁹⁸. Cette tolérance des lymphocytes T spécifiques de l'antigène dépend du CMH de classe I et n'est pas induite par des facteurs solubles. Elle nécessite un contact direct cellule-cellule et la production des espèces réactives de l'oxygène^{117, 199}.

b) Les lymphocytes CD4

Un certain nombre d'études ont démontré que les MDSC permettaient une tolérance des cellules T CD8+ de façon spécifique de l'antigène mais pas des cellules T CD4+¹¹⁷. Toutefois, dans différents systèmes expérimentaux, les MDSC inhibent la production de l'IFN γ par les cellules T CD4+^{195,200}.

Dans la plupart des modèles de tumeurs, les molécules du CMH de classe II sont exprimées de manière plus faible dans les MDSC de même phénotype que chez les souris sans tumeur. Le mécanisme exact impliquant la régulation du CMH de classe II dans les MDSC n'est pas encore clair. Il est possible que STAT3 puisse jouer un rôle majeur dans cet effet^{201,90, 202}. D'autre part, il est connu que l'activation de STAT3 entraîne la réduction du CMH de classe II dans les DC²⁰³. Une variabilité similaire de l'expression du CMH de classe II a été décrite chez l'homme^{204,205}. Cela peut expliquer certaines données contradictoires concernant l'effet des MDSC sur la fonction des cellules T CD4+. Une étude récente montre que la tolérance *in vivo* des lymphocytes T CD4+ via les MDSC est dépendante de l'expression du CMH de classe II²⁰⁶. Ces données suggèrent que les lymphocytes T CD4+ activés se lient au CMH de classe II sur les MDSC. Ce processus conduit à une régulation positive du facteur de transcription Ets-1, qui se traduit par une augmentation de l'expression de la cox2 et par la suite, la production de PGE2. La PGE2 permet alors les fonctions suppressives des MDSC.

c) Les lymphocytes T régulateurs

Les MDSC peuvent favoriser l'activation et l'expansion des Treg. Les MDSC induisent l'expansion des Treg naturels (nTreg) et favorisent également la conversion des cellules T CD4+ naïves en Treg induits (iTreg). Les mécanismes impliqués ne sont pas complètement compris, mais nécessitent un contact cellule-cellule, des interactions CD40-CD40L²⁰⁷, la production de facteurs solubles par les MDSC, comme l'IFN γ , l'IL-10, et TGF β ¹³⁵, et, éventuellement, l'expression de l'arginase par les MDSC²⁰⁸.

Chez les souris porteuses de tumeurs ovariennes 1d8, l'activation des Treg par les MDSC nécessite l'expression de CD80 par les MDSC¹³⁶. Dans un modèle murin de lymphome, les MDSC permettent l'expansion des Treg par le biais d'un mécanisme qui implique l'arginase1 et la présentation des antigènes par les MDSC indépendamment du TGFβ²⁰⁸. En revanche, un autre groupe¹⁶⁶ a constaté que le pourcentage de Treg est invariablement élevé tout au long de la croissance tumorale et ne se rapporte pas à la cinétique de l'expansion de la population des MDSC, suggérant que les MDSC ne seraient pas impliquées dans l'induction des Treg. En outre, dans un modèle de la tolérance d'allogreffe rénale chez le rat, les MDSC, qui co-expriment CD80 et CD86, ont un effet limité sur l'expansion des Treg²⁰⁹. Bien que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour résoudre ces divergences afin de déterminer la pertinence physiologique de ces études, il semble possible que les MDSC soient impliquées dans la différenciation des Treg à travers la production de cytokines ou par des interactions directes cellule-cellule. En outre, les MDSC et les cellules Treg pourraient être liées à un réseau commun immunorégulateur.

d) Les macrophages

De façon comparable à la suppression de l'activation des lymphocytes^{210, 211,162}, l'inhibition de la production de l'IL-12 par les MDSC nécessite un contact cellulaire entre les MDSC et les macrophages. En produisant de l'IL-10, les MDSC régulent la transcription de l'IL-12²¹². Ce phénomène polarise les macrophages vers un phénotype M2. Cette polarisation est entretenue par les macrophages eux même qui vont stimuler la production d'IL-10 par les MDSC²¹³. L'augmentation de l'IL-10 et la diminution de l'IL-12 favorisent la polarisation des lymphocytes vers un phénotype Th2 et la diminution des fonctions des cellules NK.

L'interaction entre les MDSC et les macrophages altère l'expression des molécules du CMH de classe II au niveau des macrophages. Cette altération serait dépendante de l'IL-10²¹⁴. Ainsi les macrophages seraient moins efficaces dans l'activation des cellules T et favoriseraient la tolérance. L'interaction entre les MDSC et les macrophages permet à la fois de promouvoir et de réduire l'inflammation, ce qui peut sembler contradictoire. Toutefois, ces deux fonctions peuvent exister afin d'équilibrer l'homéostasie du microenvironnement tumoral. L'inflammation chronique est nécessaire pour promouvoir le développement des MDSC et des TAM, mais une inflammation aiguë active l'immunité adaptative et les

lymphocytes T. En modulant l'inflammation du microenvironnement tumoral, cette interaction réduit la possibilité d'activer les cellules T réactives contre la tumeur et fournit ainsi un environnement tolérogène permettant la progression tumorale.

e) Les NK

Les MDSC ont également un impact sur les cellules NK et réduisent leur fonction tueuse²¹⁵. L'inflammation diminue l'expression du récepteur d'activation NKG2D sur les cellules NK, ce qui bloque l'activation des NK et réduit leur activité cytotoxique. Ces effets sont médiés par une sous-population de MDSC granulocytaire Ly6Clow qui sont préférentiellement induites par l'IL-1 β ²¹⁶.

Contrairement à la population granulocytaire de MDSC, les MDSC monocytaires expriment le ligand activateur des NK Rae1 et activent les cellules NK par l'intermédiaire du récepteur NKG2D. Les cellules NK activées vont ainsi tuer les MDSC²¹⁷. Il manque des données utilisant plusieurs modèles tumoraux pour déterminer si la suppression ou l'activation de cellules NK sont caractéristiques des MDSC granulocytaires et monocytaires, respectivement, ou si ces résultats sont restreints aux modèles de tumeurs utilisés dans ces études.

f) Les cellules dendritiques

Chez les patients atteints de cancer, le nombre de DC matures est réduit et leurs fonctions sont déficientes. Des études *in vitro*, dans lesquelles les MDSC ont été différenciées à partir de cellules souches médullaires c-kit+ en présence d'IL-4, de GM-CSF, et de PGE2, ont montré que le nombre de DC matures diminue proportionnellement à l'augmentation du nombre de MDSC¹⁴⁸. De plus, l'IL-10, produite par les MDSC induites dans un modèle de carcinome hépatocellulaire, bloque la production de l'IL-12 par les DC²¹⁸. Des études chez des patients atteints de mélanome montrent que les MDSC bloquent la maturation des DC en réduisant la capture de l'antigène, leur migration et leur capacité à induire des cellules productrices d'IFN γ ²¹⁹.

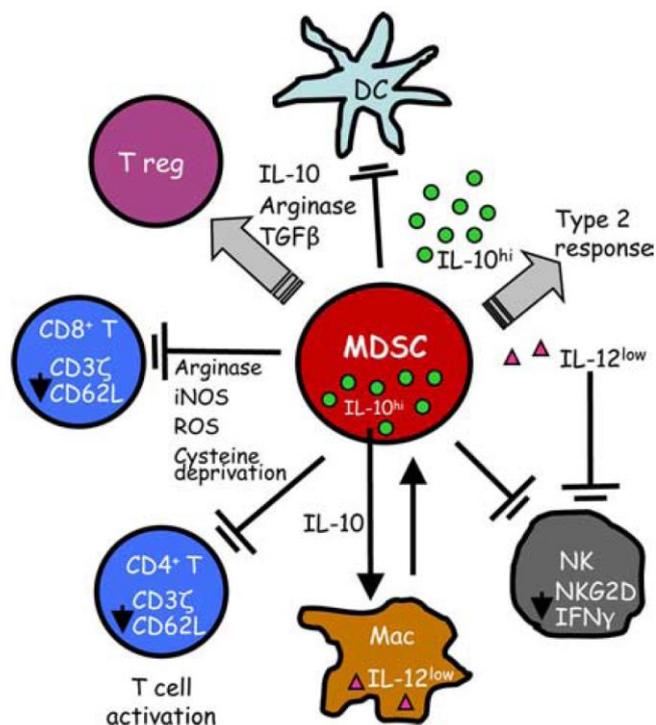


Figure 7 Mécanismes d’immunosuppression des MDSC touchant les différents effecteurs de la réponse immunitaire.

L’activation des cellules T est inhibée par la production d’arginase et de ROS, par la nitration du TCR, par la privation de la cystéine et par l’induction des lymphocytes T régulateurs. L’immunité innée est bloquée par la diminution de l’IL-12 produite par les macrophages, la production d’IL-10 par les MDSC et la suppression de la cytotoxicité des NK. D’après ²²⁰.

Comme les MDSC sont l’un des principaux facteurs immunosuppresseurs dans le cancer et dans d’autres pathologies, plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant ces cellules sont actuellement explorées.

7. STAT3

a) La famille des STATs

Les facteurs qui induisent l’expansion des MDSC et leur activation incluent la cyclooxygénase 2, les prostaglandines, le SCF, le MCSF, l’IL-6, le GM-CSF et le VEGF. La plupart de ces facteurs déclenchent des voies de signalisation dans les MDSC qui convergent vers les Janus kinases (JAK) et vers STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et l’apoptose²²¹.

La famille de protéines STATs se compose de sept membres qui sont codés par des gènes distincts: STAT1, STAT3, STAT2, les STAT4, les STAT6, STAT5a et STAT5B²²². Une des

caractéristiques distinctives des protéines codées par ces gènes est leur double rôle : elles transduisent les signaux dans le cytoplasme et fonctionnent en tant que facteurs de transcription dans le noyau. Les récepteurs aux cytokines ne disposent généralement pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, leur engagement active donc des tyrosines kinases associées au récepteur, les principales étant les kinases de la famille des Janus kinase (JAK) (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2). Après la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques des protéines STATs, elles forment des homodimères stables ou des hétérodimères avec des protéines STATs. Chaque protéine de la famille STAT répond à un ensemble défini de cytokines, et chacune régule également un groupe de gènes spécifiques. La plupart des gènes cibles en aval des STATs codent pour des cytokines et des facteurs de croissance. Il en résulte des boucles d'amplification. Par exemple, en réponse à l'IL-6 par le biais de signalisation via gp130 JAK, STAT3 forme des homodimères qui migrent dans le noyau. Dans le noyau, ces homodimères STAT3-STAT3 modulent l'expression des gènes, notamment le gène de l'IL-6, et d'autres médiateurs cruciaux dans l'inflammation.

b) Signalisation STAT3

La signalisation de STAT3 est une voie importante dans l'inflammation du cancer en raison de son activation fréquente dans les cellules malignes et a un rôle clé dans la régulation de nombreux gènes cruciaux pour l'inflammation du cancer dans le microenvironnement tumoral^{223 224 225}.

Comme les oncoprotéines SRC et ABL sont des activateurs de STAT3, STAT3 est constitutivement activé dans divers cancers. L'activation persistante de STAT3, dans diverses tumeurs humaines, augmente la prolifération, la survie, l'angiogenèse et la survenue de métastases, tout en inhibant l'immunité anti-tumorale²⁰². De nombreux gènes régulés par STAT3 codent des cytokines et des facteurs de croissance dont les récepteurs activent la voie STAT3, induisant ainsi une boucle stable d'auto activation entre les cellules tumorales et les cellules stromales non transformées, y compris des cellules myéloïdes et des cellules T, et donc la promotion des réponses inflammatoires²²⁶. Les récepteurs de facteurs de croissance qui sont connus pour activer STAT3 sont les récepteurs EGFR, HER2, FGFR, IGFR, HGFR, PDGFR et VEGFR. En outre, un grand nombre de facteurs produits par les tumeurs, comme l'IL-10, l'IL-6 et le VEGF, qui sont cruciaux pour la croissance des tumeurs et

l'immunosuppression, activent STAT3 dans les cellules tumorales et dans les cellules immunitaires associées à la tumeur²²⁷. Les cytokines OSM (oncostatine M) LIF et l'IL-11 (leukemia inhibitory factor) qui appartiennent à la famille des cytokines de l'IL-6, induisent aussi l'activation de STAT3 et ont une voie de signalisation passant par gp130. Dans les cellules normales, et dans des conditions physiologiques, l'activation des STAT est rapide et transitoire, car ils sont régulés négativement par des protéines telles que SOCS et PIAS²²⁷.

La signalisation interleukine 6 (IL-6)-Janus kinase (JAK)-STAT3 est importante pour les cancers et résulte de l'activation de la voie inflammatoire en raison des modifications génétiques ou épigénétiques des cellules tumorales²²⁸. Des facteurs environnementaux inflammatoires comme le soleil²²⁹, le tabac, les agents pathogènes^{230,231} peuvent également activer STAT3 à travers différents mécanismes. La signalisation par les STATs, en particulier STAT3, est en lien avec la signalisation de NF-κB. Par exemple, plusieurs facteurs inflammatoires codés par des gènes cibles de NF-κB, notamment l'IL-6, sont des activateurs importants de STAT3^{232,233} (Figure 8).

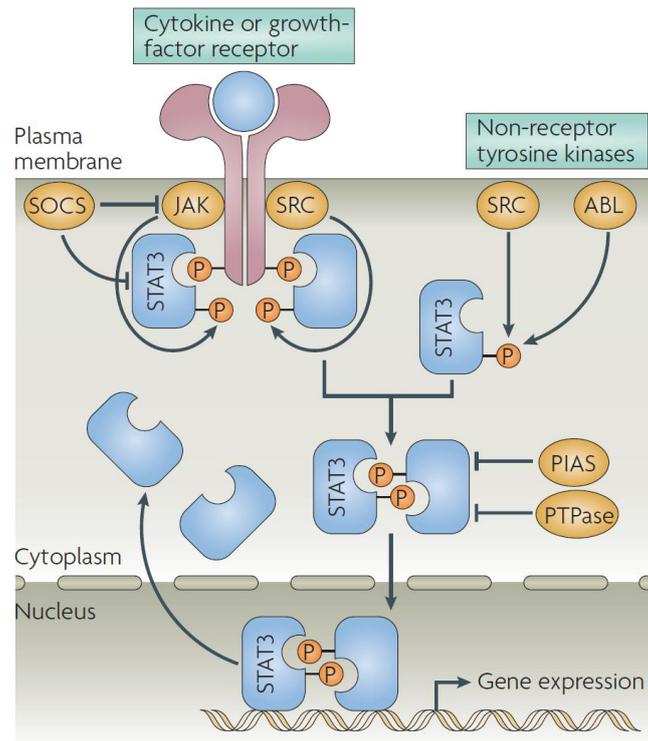


Figure 8 Signalisation STAT3.

Des signaux autocrines ou paracrines activent des tyrosine kinases intrinsèques associées à des récepteurs de facteur de croissance, et des JAKs associées aux récepteurs aux cytokines et des tyrosine kinases Src, qui, à leur tour, phosphorylent le facteur de transcription STAT3. Dans les cellules transformées, STAT3 peut être activé par des tyrosine kinases constitutivement actives telles que la SRC et ABL. Après phosphorylation sur la tyrosine, STAT3 se dimérise et est transloqué vers le noyau, où il régule directement l'expression des gènes. La signalisation STAT3 est normalement régulée par plusieurs molécules inhibitrices, dont les protéines SOCS, PIAS et des protéines tyrosine phosphatases (PTPases). Dans les cellules cancéreuses, la suractivation des tyrosine kinases associées ou non à des récepteurs provoquent la phosphorylation et l'activation de STAT3 de façon constante. D'après ²²⁷.

c) Rôle de STAT3 dans les MDSC

Les MDSC de souris porteuses de tumeurs ont des niveaux de STAT3 phosphorylé nettement augmentés par rapport à des MDSC de souris naïves²³⁴. L'exposition de cellules souches hématopoïétiques à du surnageant des cultures de cellules tumorales conduit à l'activation de JAK2 et STAT3, et a été associée à une expansion des MDSC *in vitro*. Toutefois, cette expansion est bloquée lorsque l'expression de STAT3 dans les cellules progénitrices hématopoïétiques est inhibée²⁰¹. En outre, l'ablation de l'expression de STAT3 à travers l'utilisation de souris knock-out conditionnelles dans les cellules hématopoïétiques s'accompagne d'une amélioration significative des fonctions des cellules dendritiques, des lymphocytes T, et des cellules NK dans un contexte tumoral. Cependant, dans ce modèle, il

existe une augmentation de l'accumulation de cellules Gr1+ CD11b+ infiltrant les tumeurs, allant donc à l'encontre d'un rôle important de STAT3 dans l'expansion des MDSC^{234,90}. L'activation de STAT3 est associée à une survie accrue et à la prolifération des cellules progénitrices myéloïdes, probablement par la régulation positive de l'expression de Bcl XL, de la cycline D1, de MYC et de la survivine. Ainsi, une activation anormale et persistante de STAT3 dans les cellules progénitrices myéloïdes empêche leur différenciation en cellules myéloïdes matures et favorise ainsi l'expansion des MDSC. De plus STAT3 est impliqué dans l'expression des protéines S100. Ces protéines sont importantes dans l'expansion des MDSC. Des travaux récents montrent un rôle de STAT3 dans les propriétés favorisant le cancer comme l'angiogénèse, les MDSC et les macrophages associés aux tumeurs^{235,90,236,237}.

STAT3 joue également un rôle important dans l'expansion des Tregs^{238,239}, qui favorise la progression tumorale en inhibant les réponses immunitaires anti-tumorales qui sont médiées par les lymphocytes T CD4 + de type TH1 et les lymphocytes T CD8 +²⁴⁰.

De nouvelles perspectives sur la régulation, dépendante de STAT3, du système immunitaire proviennent de la découverte récente d'un sous-ensemble distinct de lymphocytes T auxiliaires, Th17. L'activation de STAT3 est au centre du développement des Th17²⁴¹ et fonctionne à la fois comme le facteur de transcription dépendant de IL-6 dans la cellule T et comme un activateur transcriptionnel de l'IL-23a (également connu comme p19) qui code pour une partie de l'IL-23²³⁸. L'IL-21 et l'IL-17, cytokines clés dans les fonctions et la différenciation des lymphocytes Th17, sont aussi des activateurs de STAT3^{242,243}.

8. Les thérapeutiques ciblant les MDSC

a) Promotion de la différenciation des MDSC

L'une des approches les plus prometteuses qui cible les MDSC est la promotion de leur différenciation en cellules myéloïdes matures sans fonctions suppressives.

Des métabolites de la vitamine A, tels que l'acide rétinoïque, ont montré leur capacité à stimuler la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes en DC et macrophages^{198,244}. Les souris qui sont déficientes en vitamine A²⁴⁵ ou qui ont été traitées avec un antagoniste au récepteur à l'acide rétinoïque²⁴⁵, ont une expansion des MDSC dans la moelle osseuse et

la rate. A l'inverse, l'administration de concentrations thérapeutiques d'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) permet une diminution substantielle du nombre de MDSC chez les patients atteints de cancers et chez les souris porteuses de tumeurs. L'ATRA est capable d'induire la différenciation des MDSC en DC et en macrophages *in vitro* et *in vivo*¹⁹⁸. La combinaison de l'ATRA à différents types de vaccin contre le cancer prolonge l'effet anti-tumoral du vaccin dans deux modèles de tumeurs¹²⁵. En outre, l'administration de l'ATRA à des patients atteints de carcinomes métastatiques du rein a entraîné une diminution substantielle du nombre de MDSC dans le sang périphérique et a amélioré la réponse des cellules T spécifiques de l'antigène¹⁴². Des expérimentations suggèrent que la vitamine D3 peut diminuer le nombre des MDSC chez les patients atteints de cancer et favoriser la différenciation des cellules myéloïdes²⁴⁶. De plus, l'utilisation à faible dose du paclitaxel permet la différenciation des MDSC en DC de manière indépendante du TLR4 chez la souris²⁴⁷.

b) Inhibition de l'expansion des MDSC

Puisque l'expansion des MDSC est connue pour être régulée par des facteurs d'origine tumorale, plusieurs études ont porté sur la neutralisation des effets de ces facteurs.

Le SCF (Stem Cell Factor) est impliqué dans l'expansion des MDSC chez les souris porteuses de tumeurs²⁴⁸. En bloquant son interaction avec son récepteur Kit, l'expansion des MDSC et l'angiogenèse sont diminuées. Le VEGF, un autre facteur dérivé de la tumeur impliqué dans la promotion des MDSC, pourrait également être une cible utile pour bloquer les MDSC. Toutefois, différentes études réalisées chez l'homme, utilisant le VEGF-trap ou un récepteur soluble ou encore le bevacizumab, donnent des résultats contradictoires^{249,250}. Enfin, l'inhibition des fonctions de l'enzyme métalloprotéinase 9 (MMP9) chez des souris porteuses de tumeurs diminue le nombre de MDSC dans la rate et la tumeur et entraîne un retard de croissance des tumeurs spontanées²⁵¹.

c) Inhibition des fonctions des MDSC

Une autre approche permettant d'inhiber les MDSC est de bloquer les voies de signalisation qui régulent la production de facteurs suppressifs des MDSC. La Cyclo-oxygénase 2 est nécessaire pour la production de la prostaglandine E2 et induit l'expression de l'arginase 1

par les MDSC¹⁷⁵. Par conséquent, les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase2 régulent négativement l'expression de l'arginase1 par les MDSC et améliorent la réponse immunitaire contre la tumeur et l'efficacité thérapeutique de l'immunothérapie^{122, 252}. De même, les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5, tels que le sildénafil, inhibent l'expression de l'arginase1 et de iNOS par les MDSC, bloquant ainsi leurs fonctions suppressives²⁵³.

Les inhibiteurs de ROS sont efficaces pour cibler la tolérance immunitaire des MDSC dans la tumeur chez la souris. La nitro-aspirine limite l'activité de l'arginase1 et d'iNOS dans les MDSC de la rate⁹³.

d) Élimination des MDSC

Les MDSC peuvent être directement éliminées par certains médicaments utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse. L'administration de la gemcitabine à des souris porteuses de tumeurs entraîne une réduction spectaculaire du nombre de MDSC dans la rate et une nette amélioration de la réponse anti-tumorale induite par immunothérapie^{254,255}. En revanche, une augmentation du nombre de MDSC dans le sang périphérique a été observée dans une étude portant sur 17 patients atteints de cancer du sein au stade précoce, traités avec la doxorubicine et le cyclophosphamide¹²¹.

Les preuves suggèrent qu'il existe un large éventail de méthodes qui pourraient être efficaces pour cibler le nombre et la fonction de MDSC *in vivo*. Ces stratégies pourraient être utilisées pour optimiser les immunothérapies anticancéreuses en éliminant une population immunosuppressive majeure.

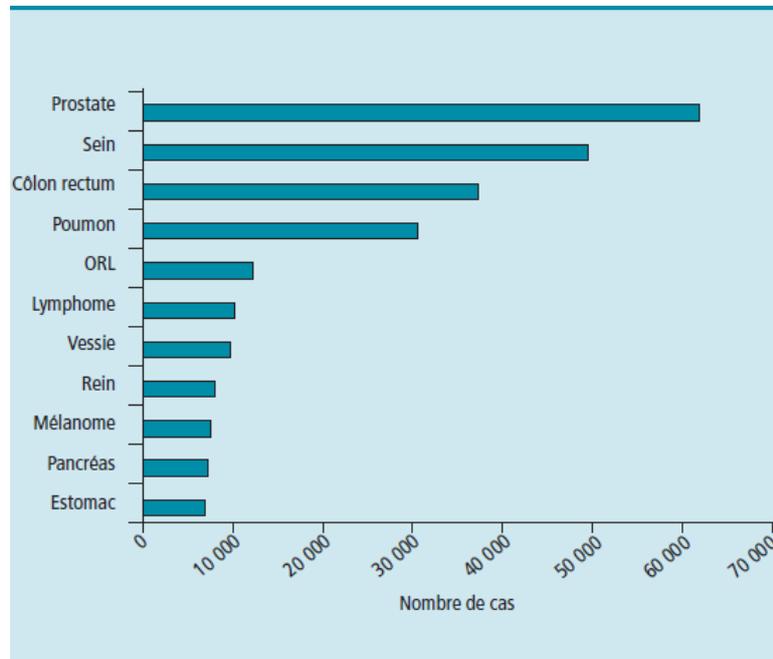
C. Le cas du cancer colique

1. Epidémiologie du cancer colorectal

Le cancer colorectal est l'une des tumeurs malignes la plus fréquente à travers le monde, que ce soit chez l'homme ou la femme. Son incidence annuelle est de plus de un million de cas et il est responsable approximativement, de plus d'un demi-million de décès chaque année²⁵⁶.

En France, le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique. Le nombre estimé de nouveau cas en 2005 était de 37 413, dont 19 913 cas chez l'homme et

17 500 chez la femme. Ces chiffres le placent comme étant le premier cancer digestif en fréquence ; le premier cancer, tous sexes confondus (15 à 20% des cancers) ; le troisième cancer chez l'homme après le cancer bronchique et celui de la prostate ; et le deuxième cancer chez la femme après le cancer du sein (*Épidémiologie descriptive du cancer colorectal en France INVS, Anne Marie Bouvier, janvier 2009*).



Place du cancer colorectal parmi les 10 cancers les plus fréquents en France en 2005

Responsable de 16 000 décès par an en France, le cancer colorectal se situe au 2^{ème} rang des décès par cancers tous sexes confondus, représentant 11,6% de l'ensemble des décès par cancer.

La survie est liée en grande partie au stade de la maladie lors de son diagnostic, défini par la classification TNM et UICC 2002-AJCC (*TNM classification of malignant tumour*^{257, 258}). **Annexe 1.**

Dans la classification TNM, T renseigne le degré d'envahissement local de la tumeur, N l'existence d'un envahissement ganglionnaire et son importance (\leq ou > 3) et M l'existence de localisations secondaires à distance, ou d'une adénopathie sus claviculaire.

Le taux de survie à 5 ans est de 77% pour les stades localisés, mais uniquement de 5% lorsqu'il existe des métastases viscérales au moment du diagnostic.

2. Localisations secondaires hépatiques

Des métastases hépatiques surviennent chez 40 à 50% des patients atteints de cancers colorectaux, de façon synchrone ou métachrone.

La résection chirurgicale des métastases hépatiques, lorsqu'elle est possible, apparaît à l'heure actuelle comme la modalité de traitement la mieux validée à visée curative des cancers colorectaux métastatiques, et ce même si des techniques alternatives telle que la radiofréquence montrent des résultats prometteurs²⁵⁹. Lorsque la résection chirurgicale est possible, la survie des patients à 5 ans peut atteindre 50%²⁶⁰, et une méta analyse récente a rapporté une survie à 10 ans de 17 à 33%²⁶¹.

Les critères de résécabilité des métastases hépatiques ont évolué durant les dernières années. En 1986, Ekberg et al concluaient que la résection n'était indiquée que chez les patients présentant moins de 4 lésions hépatiques contenues dans le même lobe hépatique, sans autres localisations métastatiques, et avec des marges de résection $\geq 10\text{mm}$ ²⁶².

L'amélioration de la compréhension de la segmentation hépatique, des techniques d'hémostase et l'utilisation de la chimiothérapie péri-opératoire ont permis d'augmenter le nombre de patient éligible à une telle chirurgie.

Les critères actuels de chirurgie des lésions secondaires hépatiques sont de réaliser une résection macroscopiquement R0, avec des marges saines, tout en laissant un volume de foie suffisant pour ne pas entraîner d'insuffisance hépatocellulaire. Ces critères sont applicables à des patients présentant un nodule unique, comme à ceux présentant de plus nombreuses métastases, parfois dans les 2 lobes hépatiques. Une chirurgie peut également être proposée à des patients ayant des métastases extra-hépatiques, lorsque ces dernières sont confinées aux poumons, à la rate ou aux surrénales et qu'elles sont accessibles à un traitement curatif comme la chirurgie ou la radiofréquence²⁶³.

Dans l'optique d'une chirurgie d'exérèse, la chimiothérapie post-opératoire permet d'augmenter le nombre de patients éligible. De plus, l'association de la chirurgie avec une exérèse macroscopiquement complète, à la chimiothérapie post-opératoire permet d'améliorer la survie des patients^{264, 265}.

Mais là encore les récives métastatiques sont fréquentes, survenant dans environ 75% des cas. Toutefois, des études ont rapportées une survie à 5 ans de 35% chez des patients

présentant une récurrence métastatique hépatique ayant été réopérée, et ce avec des taux de mortalité et morbidité acceptables^{266, 267}.

3. Facteurs pronostiques et place de la chimiothérapie adjuvante

a) Données cliniques et anatomopathologiques

Environ 40% des cancers sont diagnostiqués à un stade localisé. Dans ces conditions, le traitement de référence reste la chirurgie d'exérèse, suivie ou non d'une chimiothérapie adjuvante en fonction de l'existence de facteurs de risque de récurrence.

Ce sont essentiellement des données cliniques et anatomo-pathologiques propres à la tumeur qui permettent d'individualiser les patients considérés à haut risque de récurrence.

L'analyse histopathologique permet de typer la tumeur colorectale, en précisant le grade OMS de différenciation, c'est-à-dire les tumeurs bien, moyennement ou peu différenciées.

Sur la pièce opératoire, le degré d'envahissement tumoral est précisé en utilisant le système TNM proposé par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et l'American joint committee on cancer (AJCC).

Les signes précoces d'invasion métastatique (emboles veineux (VE) et lymphatiques (LI), engainements péri nerveux (PI)) doivent également être recherchés par l'anatomopathologiste. En effet, leur présence est corrélée à un mauvais pronostic de la maladie⁵².

Le nombre de ganglions prélevés et analysés lors de la chirurgie a une importance majeure. Selon les analyses du National Cancer Data Base (NCDB), la probabilité qu'un patient ait une maladie résiduelle après exérèse chirurgicale complète est plus faible quant au moins 13 ganglions ont été analysés et sont indemnes de maladie cancéreuse²⁶⁸. Dans une série du NCDB de 35 787 côlon stade II, le taux de survie à 5 ans passait de 64% si seulement 1 ou 2 ganglions avaient été analysés, à 86% si plus de 25 ganglions avaient été étudiés²⁶⁹.

Les patients ayant un nombre de ganglions analysés inférieur à 13 sont à risque d'être mal évalués et considérés à tort comme des stades II. Cela modifie la stratégie thérapeutique, puisqu'ils sont en fait à plus haut risque de persistance de maladie résiduelle microscopique²⁷⁰.

Pour les patients ayant une maladie stade III, c'est-à-dire avec un envahissement ganglionnaire, la chimiothérapie adjuvante est clairement indiquée. En effet, le risque de récurrence de la maladie est dans ces conditions très élevé, estimé entre 50 et 60%. Une chimiothérapie à base de 5FU permet de diminuer le risque de décès d'environ 30%²⁷¹.

Pour les patients présentant d'autres facteurs de mauvais pronostic comme une tumeur T4 perforant le péritoine viscéral ou infiltrant un organe de voisinage, une tumeur indifférenciée, une perforation au diagnostic ou une occlusion, la chimiothérapie adjuvante est également indiquée.

Il est toutefois intéressant de noter que ces caractéristiques tumorales sont des marqueurs pronostics mais qu'aucune donnée ne suggère qu'ils puissent être des marqueurs prédictifs de réponse à une chimiothérapie adjuvante.

La conduite à tenir n'est pas aussi claire pour les patients présentant un stade II, c'est-à-dire pas d'envahissement ganglionnaire. En effet, dans ces conditions, la chimiothérapie adjuvante n'a pas démontré de bénéfice significatif en terme de survie globale par rapport à la chirurgie seule²⁷², et n'augmente la survie à 5 ans que de 5%. Elle ne peut donc pas être délivrée de façon systématique.

Toutefois, même pour ces patients considérés comme ayant un bon pronostic, environ 25% d'entre eux présenteront des récurrences à 5 ans.

Toute la problématique est donc de définir des marqueurs pronostiques fiables, nous permettant de cibler la population de patients pouvant tirer un bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante, que ce soit après excision de la tumeur principale ou excision de localisations secondaires hépatiques.

b) Données moléculaires

A côté des données cliniques et anatomo-pathologiques propres à la tumeur, tels que le stade TNM et l'existence de signes précoces d'invasion métastatique (VELIPI), des équipes ont cherché à développer des marqueurs moléculaires.

En effet, l'analyse moléculaire des cancers colorectaux a démontré que l'histoire naturelle de ces cancers n'est pas la même²⁷³. Les cancers appartenant au même stade de maladie

sont en fait très hétérogènes d'un point de vue clinique, reflétant une grande hétérogénéité moléculaire.

Un certain nombre de marqueurs moléculaires pronostics dans le cancer colorectal ont été proposés²⁷⁴, sans qu'il ait pu être défini un consensus quant à leur rôle, et avec des études montrant des résultats contradictoires quant à leur valeur pronostique respective^{275, 276, 277}.

Toutefois, deux grandes voies de carcinogénèse sont décrites : la voie de l'instabilité chromosomiques (microsatellite stable) associée à des pertes d'hétérozygoties (mécanisme de type LOH, Loss of heterozygosity) qui représente 85% des cancers colorectaux, et la voie de l'instabilité génétique (instabilité des microsatellites) représentant 15% des cancers colorectaux sporadiques et 100% des cancers du spectre HNPCC.

Les tumeurs développées selon la voie LOH sont caractérisées par une aneuploïdie, une perte allélique, des amplifications et des translocations²⁷⁸.

Les tumeurs avec instabilité microsatellitaire dite MicroSatellite Instability (MSI+) ou déficient of the Mismatch Repair System (dMMR) sont liées à une inactivation ou à une perte d'expression des gènes de réparation MLH1, MSH2 et MSH6 secondairement à une méthylation de leur promoteur²⁷⁹.

Les cancers développés selon ces 2 voies montrent un certain nombre de différences. Les tumeurs MSI+ ont plutôt tendance à être proximales, faiblement différenciées, mucineuses, et présentent une forte infiltration lymphocytaire. De plus, elles ont plutôt tendance à conserver le stade de diploïdie initiale²⁸⁰. A l'opposé, les tumeurs MSI- ont plutôt tendance à l'aneuploïdie et n'ont pas de site de prédilection.

Les données de la littérature suggèrent que les tumeurs colorectales MSI+ ont un pronostic significativement meilleur que les tumeurs MSI-. De plus, ces tumeurs seraient moins sensibles au 5FU²⁸¹. Ces données permettraient donc d'identifier des patients au pronostic plus favorable, chez qui un traitement par chimiothérapie ne s'avérerait pas forcément bénéfique.

Ainsi, la détection de l'instabilité microsatellitaire (MSI) dans les cellules par des techniques de biologie moléculaire, constitue un outil intéressant de stratification pronostique.

c) Facteurs pronostiques après métastasectomie hépatique

Plusieurs scores pronostiques de survie chez des patients porteurs de métastases hépatiques de cancers colorectaux opérées ont été proposés par différentes équipes. Gomez et Cameron en ont réalisé une revue de la littérature parue en 2010²⁸². Ils ont inclus 12 études basées sur des données rétrospectives, et dont la plupart ont inclus des patients opérés de 1970 à 1980. Aucun score « idéal » n'a pu être défini. Toutefois, certains facteurs ont été constamment associés à un mauvais pronostic: le nombre et la taille des métastases (> 5cm et plus de 4 lésions), la présence de localisations extra hépatique notamment pulmonaires, le caractère synchrone des métastases hépatiques, la présence d'un envahissement ganglionnaire lors de l'exérèse de la tumeur primitive, un taux élevé d'ACE, des marges de résection insuffisantes, et la présence d'une réponse inflammatoire à la tumeur. Cette dernière était définie par un taux de CRP supérieur à 10 mg/l ou par une augmentation du ratio polynucléaires neutrophiles/lymphocytes (≥ 5).

Toutefois, l'impact des caractéristiques biologiques du patient lui-même, notamment concernant son système immunitaire et sa capacité à générer une réponse anti-tumorale efficace, n'est pas couramment utilisé pour la stratification pronostique des patients. Cependant, de plus en plus de données suggèrent que le profil immunologique exprimé sur le site tumoral représente un facteur pronostique indépendant.

4. Immunité, inflammation et cancer

a) Inflammation et cancer

L'inflammation aigue est un mode de défense de l'organisme contre les agressions et peut, dans certains cas, avoir un effet anti-tumoral. Ainsi, des tumeurs superficielles de vessie sont traitées en créant une inflammation locale par inoculation, directement dans la vessie, de BCG^{283 283}.

L'inflammation chronique peut, quant à elle, jouer un rôle néfaste et aboutir à des situations pathologiques. L'inflammation chronique est impliquée dans un nombre important de pathologies, que ce soit les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'arthrite, la maladie d'Alzheimer, les maladies auto-immunes ou le cancer.

La notion d'un lien entre inflammation et cancer est née dès le 19^{ème} siècle ; en effet, les tumeurs survenaient préférentiellement sur des sites où il existait un état inflammatoire chronique. De plus, les cellules de l'inflammation étaient présentes au sein des biopsies tumorales. Depuis, plusieurs éléments en faveur de cette théorie ont été démontrés, basés aussi bien sur des observations que des études épidémiologiques de patients ou des études moléculaires sur des souris génétiquement modifiées. Par exemple, le transfert adoptif de cellules inflammatoires ou la surexpression de cytokines inflammatoires dans des modèles animaux favorisent l'émergence de cancers.

Il est ainsi devenu évident que l'inflammation du microenvironnement tumoral est un composant essentiel de la tumorigénèse⁵⁵. Ainsi, l'existence d'un état inflammatoire chronique, quel que soit son origine, augmente le risque de développer un cancer. C'est le cas des infections bactériennes, telle que l'infection à *Helicobacter pylori* qui est associée au cancer de l'estomac, des infections virales comme l'hépatite B ou C qui augmentent le risque de survenue d'un carcinome hépatocellulaire, des maladies auto-immunes dont les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) qui augmentent le risque de cancer du côlon, mais aussi de toute inflammation d'étiologie indéterminée comme la prostatite, associée à une augmentation des cancers de la prostate. On retrouve donc dans le tissu tumoral les marqueurs de l'inflammation incluant les cellules inflammatoires et les médiateurs de l'inflammation (cytokines, chemokines et prostaglandines).

L'association entre inflammation et cancer peut être schématisée selon 2 voies : la voie extrinsèque où l'inflammation favorise la survenue de cancer et en augmente donc le risque (par exemple les MICI) ; et la voie intrinsèque où des altérations génétiques favorisent l'émergence de cancers (tels que les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur) et sont à l'origine d'un microenvironnement inflammatoire.

Les oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains sont les membres de la famille RAS. Les composés oncogéniques activés de la voie RAS-RAF induisent la production de cytokines et de chemokines inflammatoires favorisant les tumeurs.

Un autre oncogène, MYC, code pour un facteur de transcription qui est surexprimé dans de nombreux types de tumeurs. En plus de promouvoir la prolifération des cellules tumorales, MYC entraîne un remodelage du microenvironnement extra cellulaire, avec présence de cellules inflammatoires et de médiateurs qui ont un rôle important dans le processus

tumoral. Dans des modèles murins de tumeurs dépendantes de MYC, la première vague de néoangiogénèse apparaît suite à une production d'IL1 β dépendante de MYC. MYC permet également la production de cytokines recrutant les mastocytes, qui favorisent aussi la néoangiogénèse.

Les protéines suppressives de tumeurs peuvent également réguler la production de médiateurs de l'inflammation. C'est le cas pour la protéine VHL (Von Hippel Lindau), composant d'un complexe moléculaire permettant la dégradation du facteur de transcription HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α). HIF1 α permet de stimuler l'angiogénèse dans un tissu en réponse à une diminution de l'oxygène. Il interagit également avec le facteur de transcription NF κ B, entraînant la production d'une cytokine majeure de l'inflammation : TNF α . NF κ B est un facteur de transcription nucléaire, se trouvant dans le cytoplasme des cellules sous forme inactive, lié à un inhibiteur (I κ B). La phosphorylation de l'inhibiteur entraîne sa dissociation de NF κ B qui peut migrer vers le noyau et activer la transcription de plusieurs gènes, permettant la survie et la prolifération cellulaire (**Figure 1**).

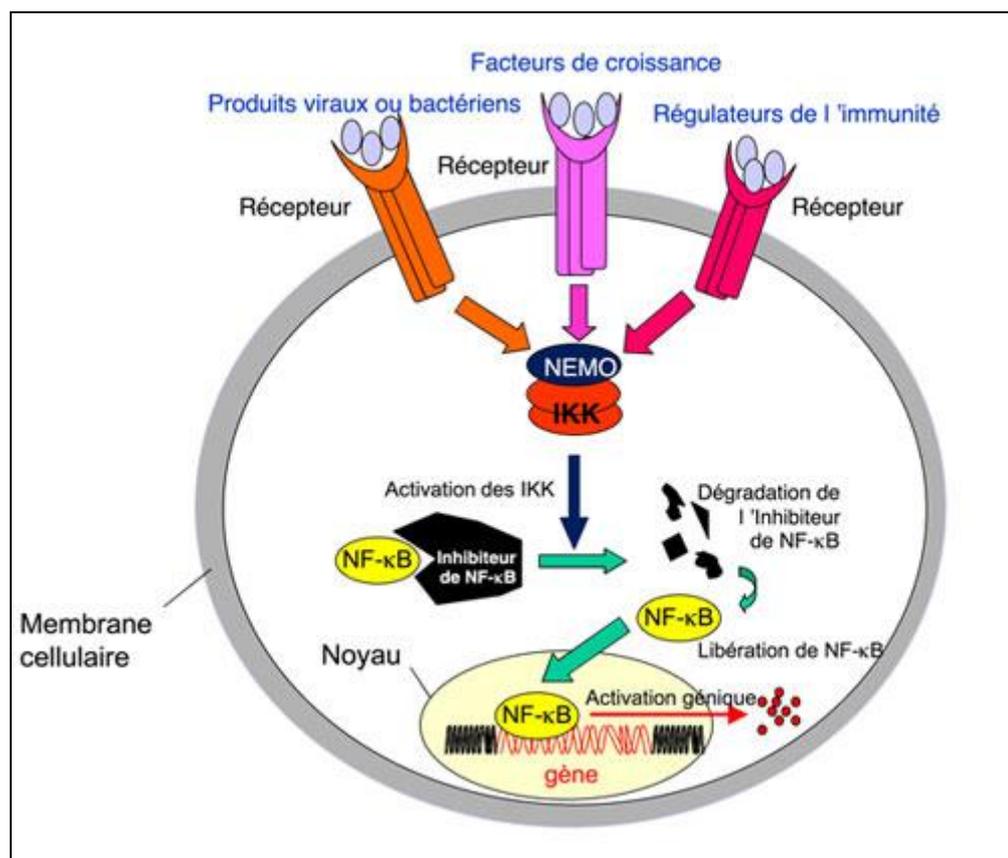


Figure 1 : voie de signalisation intracellulaire NF κ B et activation de gènes de survie et de prolifération cellulaire.

Le TNF α est une cytokine de l'inflammation, pouvant jouer un rôle autocrine et paracrine sur la croissance cellulaire. Il est impliqué dans toutes les étapes cellulaires de la tumorigénèse incluant la transformation, la prolifération, la survie, l'invasion, l'angiogénèse et la dissémination métastatique. Si initialement il avait été décrit que seuls les macrophages sécrétaient du TNF α , il est maintenant clairement démontré qu'il est produit par un grand nombre de variétés cellulaires dont les cellules tumorales. Ainsi le TNF α est fréquemment retrouvé élevé en cancérologie, et est associé à un mauvais pronostic.

D'autres interleukines de l'inflammation sont associées à la tumorigénèse, comme l'IL-1, IL-6, IL-10 et IL-18.

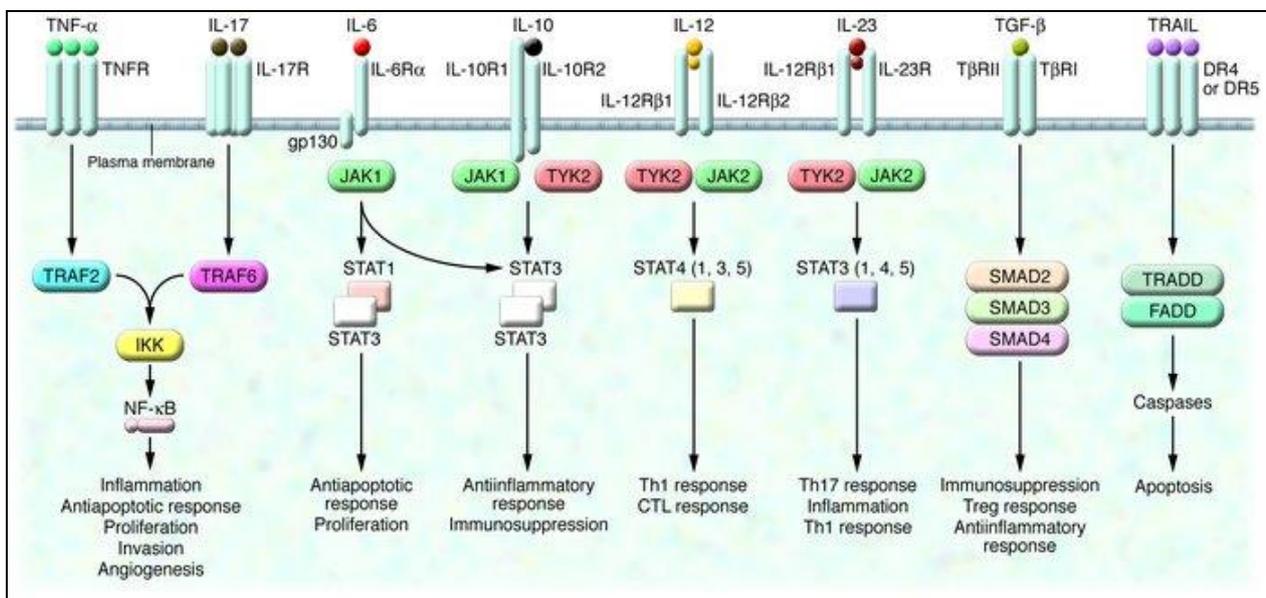


Figure 2 : Différentes voies de signalisation activées par les cytokines de l'inflammation et jouant un rôle dans la tumorigénèse²⁸⁴.

La production autocrine d'IL-1 β favorise la croissance cellulaire et confère une chimiorésistance à des lignées cellulaires de cancer pancréatique. L'IL-1 β induit également des facteurs de l'angiogénèse favorisant la croissance tumorale dans des modèles animaux de cancer du poumon.

Une autre cytokine pro-inflammatoire importante, l'IL-8 a été rapportée comme favorisant la croissance cellulaire et les métastases d'une large variété de cancers. L'IL-8 est une cible de transcription de la voie RAS, la sécrétion d'IL-8 dépendante de RAS étant indispensable à l'inflammation présente lors de l'initiation tumorale et à la néovascularisation.

Les chemokines, via l'inflammation, jouent également un rôle dans la progression tumorale, le recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires et la migration à distance. Les chemokines sont regroupées en 4 groupes, selon la position de résidu cystéines : C, CC, CXC et CX3C. Elles permettent la stimulation de l'angiogénèse et de la croissance tumorale, directement ou indirectement par le recrutement de macrophages associés aux tumeurs. Les chemokines CC sont des déterminants majeurs de l'infiltration lymphocytaire dans le mélanome, les cancers de l'ovaire, du sein et du col, ainsi que dans les sarcomes et les gliomes. Les récepteurs aux chemokines CXCR4 et CCR7 sont fortement exprimés dans les cancers du sein et leurs métastases.

D'un autre côté, les chémokines peuvent jouer un rôle bénéfique anti-tumoral par le recrutement de cellules dendritiques. Cependant, le recrutement de cellules dendritiques immatures au pourtour de la tumeur (induit par des facteurs produits par le microenvironnement tumoral) peut aboutir à l'apparition d'une tolérance immunitaire.

HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) est un complexe de transcription hétérodimérique composé d'une sous unité α et d'une sous unité β . La sous unité HIF-1 α est généralement instable et subit une dégradation protéosomale en situation de normoxie, alors que la sous unité β est présente de façon permanente dans le noyau, quel que soit le niveau d'oxygénation. Plusieurs études ont mis en évidence que des médiateurs de l'inflammation tels que des cytokines, des hormones (IGF-1 et IGF-2) pouvaient activer HIF-1, même dans des conditions de normoxie. Ainsi, IL-1 β et TNF α augmentent l'activité de HIF-1 α in vitro dans des lignées cellulaires de cancer du foie. HIF-1 α active alors différents gènes codant pour des protéines de l'inflammation, incluant VEGF et COX-2. L'accumulation d'HIF-1 α en l'absence de stimulation hypoxique a été retrouvée dans un grand nombre de cancers.

A côté de ses capacités propres pro-tumorigènes, l'inflammation peut également influencer la réponse immunitaire de l'hôte et peut être utilisée pour augmenter la réponse à la chimiothérapie²⁸⁵. En effet, les traitements de chimiothérapies utilisés dans la prise en charge des cancers semblent bénéficier de la participation du système immunitaire. Lorsqu'un patient reçoit un traitement par chimiothérapie, ce dernier va entraîner des modifications au niveau de son système immunitaire, empruntant des voies différentes selon chaque molécule. Certaines chimiothérapies, en créant une mort cellulaire immunogène distincte et différente de l'apoptose, vont entraîner une réponse cellulaire

spécifique. Ces modifications immunologiques comprennent la translocation membranaire de la calréticuline en réponse aux anthracyclines, l'induction et l'expression des molécules du CMH, la création d'antigènes tumoraux spécifiques ou de récepteurs de mort en réponse à des modifications épigénétiques, la sécrétion d'HMGB1 en réponse aux anthracyclines et à l'oxaliplatine. D'autres drogues vont moduler l'immunité, à travers une déplétion transitoire des lymphocytes, par la subversion de mécanismes immunosuppresseurs ou par une stimulation directe ou indirecte des effecteurs de l'immunité.

Il existe donc clairement une interaction entre les chimiothérapies et la nature de l'infiltrat inflammatoire et immunologique du microenvironnement tumoral.

b) Infiltrat lymphocytaire tumoral et pronostic

L'existence d'un infiltrat lymphocytaire T au sein de la tumeur primitive est associée chez l'homme à un meilleur pronostic, que ce soit dans les cancers du sein, de l'ovaire, du poumon, de l'œsophage, ou du mélanome. Il en est de même dans le cancer colorectal.

Ainsi, l'étude génomique, cytométrique et immunohistochimique du microenvironnement tumoral des cancers colorectaux localisés a clairement démontré que l'existence d'un profil d'infiltrats lymphocytaires polarisés vers une réponse de type helper 1 (Th1), caractérisée par une forte expression de marqueurs comme CD8, granzyme B, T-bet, interféron γ , normalement favorables à la réponse immunitaire anti-tumorale, était significativement associé à un moindre envahissement micrométastatique sur la pièce opératoire (tumeur VELIPI négative : vascular emboli (VE), lymphatic invasion (LI), perineuronal infiltration PI)⁵².

Il est maintenant clairement établi que les cancers colorectaux MSI+ sont associés à une très forte infiltration lymphocytaire, notamment en lymphocytes T CD8+, et que l'importance de cette infiltration est un facteur de meilleur pronostic²⁸¹.

Une forte densité de lymphocytes T CD8+ et de lymphocytes mémoires CD45RO+ infiltrant les tumeurs colorectales est associée à une meilleure survie sans récurrence et globale, indépendamment des facteurs pronostics classiquement utilisés pour la stratification du risque de récurrence, comme le stade tumoral ou l'existence d'un envahissement ganglionnaire métastatique⁵².

Dans ces études, la densité et le type d'infiltrats immunologiques apparaissent comme les facteurs pronostics les plus puissants pour expliquer le pronostic à long terme des patients en terme de survie, justifiant son utilité potentielle pour la sélection des patients susceptibles de tirer le plus de bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante, y compris pour les patients sans envahissements ganglionnaires²⁸⁶.

c) Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg ont été initialement identifiés chez la souris²⁸⁷ et chez l'humain, comme des lymphocytes T CD4+ exprimant le récepteur α à l'IL 2 (CD25) et inhibant la réponse immunitaire des lymphocytes T effecteurs, et notamment en inhibant leur production d'interferon γ . Ces cellules permettent le maintien d'une tolérance immunitaire, prévenant l'apparition de maladies auto-immunes spécifiques d'organe.

Cependant, que ce soit dans les modèles animaux de cancer ou chez les patients, les Tregs se développent, migrent jusqu'au site tumoral et inhibent la réponse immune anti tumorale médiée par les cellules NK, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ et les cellules myéloïdes, et ce à travers différents mécanismes^{288, 289, 290}.

La découverte du facteur de transcription FOXP3 (forkhead box P3) comme étant un marqueur spécifique permettant de les différencier des autres populations de lymphocytes T a renforcé leur identité. Ainsi, les Treg sont mis en évidence dans les tissus, notamment dans les tumeurs humaines en utilisant un marquage nucléaire par des anticorps anti-FOXP3.

L'accumulation de Treg a tout d'abord été décrite au sein des leucocytes du sang circulants de patients porteurs de tumeur, puis dans la rate de souris porteuses de tumeurs, et enfin au sein de la tumeur elle-même. Que ce soit dans des modèles tumoraux animaux ou chez les patients porteurs de tumeurs, le nombre des Treg est significativement plus important dans le sang, les ganglions et l'ascite par rapport aux patients non-porteurs de tumeurs^{290, 291, 292, 293, 294, 295}.

Les Treg infiltrent de nombreuses variétés de tumeurs humaines^{291, 292, 296}.

Ils ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T effecteurs et dirigée contre les cellules cancéreuses humaines, dont le cancer colorectal.

Les Treg sont considérés comme une population cellulaire majeure engagée dans la tolérance immune qui protège les cellules cancéreuses de l'immunité anti tumorale.

- **Treg infiltrant les tumeurs et pronostic**

Dans la plupart des cancers humains, une forte densité en Foxp3+ infiltrant la tumeur est associée à un pronostic clinique défavorable. En effet, considérant leur rôle suppresseur de la réponse immunitaire anti-tumorale, il n'est pas surprenant qu'une forte densité en Treg infiltrant la tumeur, identifiée après immunomarquage par Foxp3+, soit associée à une évolution clinique défavorable.

Cette corrélation a été rapportée dans un grand nombre de carcinomes humains localisés ou métastatiques, incluant le cancer du sein, de l'ovaire, des poumons, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du rein, du pancréas, de l'estomac et le cancer du col.

Ces découvertes sont d'un intérêt considérable puisqu'elles soutiennent l'hypothèse que la présence de Treg dans le lit tumoral puisse être un mécanisme majeur d'échappement des cancers à la réponse immunitaire, et de plus, qu'elle puisse représenter un nouveau marqueur pronostique, et potentiellement une nouvelle cible de l'immunothérapie.

Cependant, des données contradictoires suggèrent qu'une accumulation de Treg Foxp3+ n'est pas toujours associée à un mauvais pronostic, mais peut signer, au contraire, une amélioration du pronostic dans certains types de cancer, et notamment dans le cancer colorectal.

- **Le cas du cancer colorectal**

Les résultats de trois études récentes concernant les infiltrats en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ dans de larges populations de patients viennent à l'encontre de ce qui était attendu compte tenu des résultats obtenus dans d'autre type de tumeur.

Salama et al ont étudié la densité de Treg FOXP3+ infiltrant la tumeur ainsi que celle des CD45RO+ (lymphocytes T mémoires) et des CD8+ chez 967 patients porteurs d'un cancer colorectal stade II ou III²⁹⁷. Les lames ont été étudiées au microscope haute résolution pour évaluer la densité en cellules marquées. La densité de cellules portant chaque marqueur, confirmée quantitativement en utilisant des images hautes résolutions numérisées, est significativement augmentée dans les tumeurs comparée au tissu normal adjacent. Les

analyses univariées ont confirmé qu'une forte densité de lymphocytes T CD8+ et CD45RO+ au sein de la tumeur était associée à un pronostic plus favorable, ce qui concorde avec les résultats d'une précédente étude⁵².

De façon beaucoup plus intéressante, il a été montré qu'une forte infiltration tumorale en Treg Foxp3+ était également associée à une meilleure survie. De plus, en analyse multivariée, seule l'infiltration tumorale par un nombre élevé de Treg Foxp3+ était indépendamment associée à une amélioration de la survie ($p=0,001$)²⁹⁷.

Ces résultats inattendus ont été récemment confirmés par Frey et al²⁹⁸, dans une étude incluant 1420 patients porteurs de cancer colorectal non métastatique. Compte tenu du lien établi entre le pronostic favorable du cancer colorectal et l'instabilité des microstallites (MSI), reflétant l'inactivation ou la perte de fonction des gènes de réparation mismatch (MMR), cette population a été divisée en 2 groupes en fonction de leur statut MMR. Dans le groupe MMR déficient, il existe un taux de survie à 5 ans significativement plus élevé comparé au groupe MMR non déficient (71% vs 54%). En analyse univariée, le taux de survie à 5 ans est significativement plus élevé chez les patients ayant une forte infiltration tumorale en Foxp3+ par rapport à ceux avec une faible infiltration en Foxp3+ et ce quel que soit le statut MMR. Ceci permet d'affirmer que la relation significative entre la forte présence de Foxp3+ et l'amélioration du taux de survie à 5 ans n'était pas liée au statut MMR. En analyse multivariée, la valeur pronostique favorable d'une forte infiltration tumorale en Foxp3+ reste significative chez les patients MMR proficients, mais pas chez les MMR déficients, cette absence de significativité pouvant peut-être s'expliquer par un manque de puissance.

Nosho et al ont étudié l'association entre la densité de différentes variétés de lymphocytes T infiltrant la tumeur (CD3+, CD8+, CD45RO+ et Foxp3+) et le pronostic chez 768 patients porteurs de cancer colorectaux appartenant à 2 études de cohortes prospectives²⁹⁹. La densité de lymphocytes T infiltrant la tumeur a été déterminée par tissu-microarrays. En analyse univariée, de fortes densités de CD8+, CD45RO+ et Foxp3+ étaient associées à une meilleure survie globale. En analyse multi variée, la densité de Foxp3+ n'était pas significativement associée à la survie. Seule la densité de cellules T mémoires CD45RO+ était associée à la survie globale.

L'étude plus large de la bibliographie référant aux Treg et au pronostic chez des patients présentant un cancer colorectal n'a pas permis de retrouver une seule étude concluant qu'une forte infiltration en Foxp3 était associée à un mauvais pronostic.

Tous ces résultats suggèrent donc fortement qu'une forte densité en lymphocytes T régulateur Foxp3+ infiltrant la tumeur est associée à un pronostic favorable des patients porteurs d'un cancer colorectal, et ce contrairement à ce qui est observé dans d'autres carcinomes humains.

Ainsi, si le rôle pronostic de la réponse immunitaire au sein de la tumeur primitive colique est de mieux en mieux décrit et mis en lumière chez des patients traités à visée curative pour des tumeurs localisées, l'étude du rôle pronostic de ces mêmes populations lymphocytaires au sein des sites métastatiques, notamment hépatiques chez des patients opérés à visée curative d'un cancer colorectal, n'a encore jamais été rapporté.

D. Objectifs du travail de thèse

Le but de mon travail, au cours de cette thèse, était de développer une nouvelle stratégie pour éliminer les MDSC et si possible de développer une stratégie applicable au cancer du côlon. En effet la plupart des médicaments décrits comme ayant un effet inhibiteur sur la fonction des MDSC comme le sunitinib ou l'imatinib ou sur le nombre des MDSC, comme la gemcitabine, sont des agents anticancéreux qui n'ont pas de place dans la stratégie thérapeutique du cancer colique. Il paraît donc difficile de proposer d'associer ces agents, ayant une toxicité importante, à la chimiothérapie conventionnelle des cancers colorectaux

Le second objectif de ma thèse concerne l'étude des infiltrats immunitaires dans les cancers coliques. Il est clairement établi que les infiltrats au niveau du site tumoral ont un effet pronostique notamment les infiltrats en cellules CD45RO et CD8. Nous avons voulu savoir s'il en était de même dans les infiltrats au niveau des métastases hépatiques et donc dans une population homogène de stade IV.

RESULTATS

II. RESULTATS

A. Article sur le projet 1

« 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. »

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. Cancer Research. Février 2010.

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) s'accumulent dans la rate et le lit tumoral au cours de la croissance tumorale dans de nombreux modèles murins de cancer. Ils contribuent à la tolérance immunitaire du cancer, notamment par l'inhibition de la fonction des cellules T CD8 (+).

Ainsi, leur élimination peut freiner la croissance tumorale en induisant une amélioration des fonctions des lymphocytes T cytotoxiques antitumoraux. Nous avons précédemment rapporté que certains agents anticancéreux augmentent les réponses effectrices des T antitumoraux et que cet effet résulte de leur action sur les cellules cancéreuses en induisant une mort immunogène. Cependant, l'effet des agents anticancéreux sur les MDSC reste encore mal exploré. Dans cette étude, nous avons observé que la gemcitabine et le 5-fluorouracil (5-FU) ont la capacité sélective de tuer les MDSC. *In vivo*, le traitement des souris porteuses de tumeurs avec du 5-FU conduit à une diminution importante du nombre de MDSC dans la rate et dans le lit tumoral des animaux porteurs de cancer alors que nous n'avons observé aucun effet significatif sur les lymphocytes T, les cellules tueuses naturelles (NK), les cellules dendritiques ou les cellules B. Fait intéressant, le 5FU a montré une efficacité plus forte que la gemcitabine à induire la mort cellulaire par apoptose des MDSC aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'élimination des MDSC par le 5FU induit une augmentation de la production d'IFN-gamma par les cellules T CD8 (+) infiltrant la tumeur et les réponses anti-tumorales dépendantes des cellules T. Au total, ces résultats suggèrent que l'effet antitumoral du 5-FU est dû, au moins en partie, à son action cytotoxique sélective sur les MDSC.

5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity

Julie Vincent^{1,2}, Grégoire Mignot¹, Fanny Chalmin^{1,2}, Sylvain Ladoire^{1,2,3},
Mélanie Bruchard^{1,2}, Angélique Chevriaux^{1,3}, François Martin¹,
Lionel Apetoh⁴, Cédric Rébé^{1,3}, and François Ghiringhelli^{1,2,3}

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) accumulate in the spleen and tumor bed during tumor growth. They contribute to the immune tolerance of cancer notably by inhibiting the function of CD8 (+) T cells. Thus, their elimination may hamper tumor growth by enhancing antitumor T-cell functions. We have previously reported that some anticancer agents relied on T cell-dependent anticancer responses to achieve maximal efficacy. However, the effect of anticancer agents on MDSC has remained largely unexplored. In this study, we observed that gemcitabine and 5-fluorouracil (5FU) were selectively cytotoxic on MDSC. *In vivo*, the treatment of tumor-bearing mice with 5FU led to a major decrease in the number of MDSC in the spleens and tumor beds of animals whereas no significant effect on T cells, natural killer cells, dendritic cells, or B cells was noted. Interestingly, 5FU showed a stronger efficacy over gemcitabine to deplete MDSC and selectively induced MDSC apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*. The elimination of MDSC by 5FU increased IFN- γ production by tumor-specific CD8(+) T cells infiltrating the tumor and promoted T cell-dependent antitumor responses *in vivo*. Altogether, these findings suggest that the antitumor effect of 5FU is mediated, at least in part, by its selective cytotoxic action on MDSC. *Cancer Res* 70(8): 3052–61. ©2010 AACR.

Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) have been identified as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T-cell activation in humans and mice (1–3). These cells accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow, and at tumor sites in many human cancers and animal tumor models, and inhibit both adaptive and innate immunity (4). They notably have the capacity to inhibit CD8⁺ T cell antigen-specific reactivity by different mechanisms, mainly through their capacities to produce nitric oxide and radical oxygen species (5–7). MDSC are phenotypically characterized in mice by the expression of the cell surface antigens Ly-6C/G (both recog-

nized by the Gr-1 antibody) and CD11b (2). A human counterpart of MDSC was proposed to lie in the CD11b⁺CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ subset (8–11). Elimination of MDSC in mouse tumor models was shown to enhance antitumor responses, resulting in tumor regression. In this regard, strategies aimed at depleting MDSC *in vivo* using agents that target MDSC such as antibodies (12) or cytotoxic agents as gemcitabine have been shown to be the most promising (13–15). Gemcitabine is an antimetabolite chemotherapeutic agent implemented in the clinic since the 1990s and was previously reported to be capable of depleting MDSC in tumor-bearing mice (14).

We and others have previously reported that some anticancer agents, in addition to their direct cytotoxic effects on tumor cells, feature the ability to promote the activation of the immune system of the host, resulting in enhanced antitumor responses (16, 17). To investigate whether conventional anticancer agents were also able to affect the biology of MDSC, we designed an *in vivo* drug screening assay in which we tested the effect of anticancer agents on the proportion of MDSC within tumor-bearing mice. Our results show for the first time that 5FU was able to reduce the number of MDSC in tumor beds by triggering their apoptotic cell death. We also observed that 5FU-mediated MDSC depletion triggered an increase in IFN- γ production by tumor-specific CD8⁺ T cells infiltrating the tumor bed and promoted a T-dependent antitumor effect. These results suggest that, beyond its direct cytotoxic effect

Authors' Affiliations: ¹INSERM Research Center 866, AVENIR Team; ²Faculty of Medicine, University of Burgundy, ³Anti-Cancer Center, Georges François Leclerc, Dijon, France; and ⁴Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

J. Vincent and G. Mignot contributed equally to this work.

Corresponding Author: François Ghiringhelli, INSERM 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21000 France. Phone: 333-803-93353; Fax: 333-803-93434; E-mail: fghiringhelli@dijon.fnclcc.fr.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

©2010 American Association for Cancer Research.

on tumor cells, 5FU possesses immunogenic properties that rely on the *in vivo* elimination of MDSC.

Materials and Methods

Mice and cell lines. EL4, a thymoma cell line syngeneic of C57BL/6, were obtained from the American Type Culture Collection. MSC-1 and MSC-2 are immortalized MDSC cell lines obtained from BALB/c Gr-1⁺ splenocytes and were given by V. Bronte (University of Padua, Padua, Italy). All cells were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum enriched with 0.4 mmol/L of sodium pyruvate, 4 mmol/L of HEPES, and antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin B). BALB/c, C57BL/6, and Nude mice were purchased from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest St. Isle, France), and used at 6 to 10 wk of age. TLR4^{-/-} C57BL/6 mice were provided by Bernhard Ryffel (UMR 6218 CNRS, Orleans, France). Animals were all maintained according to Animal Experimental Ethics Committee Guidelines.

Tumor model. EL4 cells ($2 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ PBS) were s.c. injected into the flank of mice. Mice were treated when tumor surface was $\sim 100 \text{ mm}^2$. EL4 cancer cells were injected s.c. to C57BL/6 mice, nude mice, and TLR4^{-/-} C57BL/6 mice. Tumor surfaces were measured thrice a week.

In vivo chemotherapeutic treatments. For *in vivo* experiments, mice received a unique injection of cyclophosphamide at 80 mg/kg of body weight, paclitaxel (36 mg/kg), raltitrexed (100 mg/kg), gemcitabine (120 mg/kg), doxorubicin (5 mg/kg), 5FU (50 mg/kg), or oxaliplatin (5 mg/kg). All drugs were administered by i.p. injection, except for doxorubicin, which was injected i.v.

Isolation of MDSC from spleens and tumors. Spleens were mechanically dissociated and individual spleen cells obtained through a 70- μm cellular sieve, then centrifuged, counted and washed once with PBS. To maximize the presence of MDSC, single-cell suspensions prepared from the spleen of tumor-bearing mice were purified by magnetic selection of MDSC, using Gr1-phycoerythrin-cyanine 7 staining followed by anti-phycoerythrin-cyanine 7 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Tumors were cut with scalpels in millimetric fragments that were then mechanically dissociated and passed through a 70- μm cellular sieve. Tumor cells were laid down on a leukocyte-separating cushion and centrifuged ($1,000 \times g$, 20 min). Floating cells were collected, centrifuged, counted, and washed once with PBS.

Fluorescence-activated cell sorting analyses of Treg and MDSC. Five days after treatment with 5FU, cyclophosphamide, gemcitabine, oxaliplatin, or doxorubicin, tumor-bearing mice were sacrificed. Tumors and spleens were harvested and single cell suspensions were prepared. MDSC were stained with antibodies anti-CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were analyzed by flow cytometry. Tregs were stained with anti-CD4, anti-CD25, and anti-CD3 monoclonal antibodies for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were permeabilized according to the manufacturer's protocol (Fix/Perm eBioscience), and stained with an anti-Foxp3 antibody

(eBiosciences) for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, cells were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analyses. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses were performed using phycoerythrin (PE) cyanine 7 (Cy7)-conjugated anti-Gr1, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD11b, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-Ly6C, PE-conjugated anti-Ly6G, peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)-conjugated anti-CD4, APC-conjugated anti-CD3, PE-Cy7-conjugated anti-CD25, Efluor 450-conjugated anti-Foxp3, FITC-conjugated Annexin V, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), APC-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-CD11c, Alexa 700-conjugated anti-CMH2, PerCP-conjugated anti-CD8, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), or Alexa 488-conjugated immunized rabbit serum. All antibodies were purchased from BD Pharmingen or eBioscience. FITC-Flica caspase-3/7 apoptosis detection kits were purchased from Immunochemistry Technologies. FACS analyses were performed on a LSRII (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (TreeStar).

Single cell suspension from tumors and spleens were centrifuged and saturated with 200 μL of PBS containing 2% mouse serum for 15 min at 4°C. After centrifugation, cells were stained for 20 min at 4°C with the following antibodies: CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for MDSC; CD3, CD4, and B220 for lymphocytes; and CD11c, CD11b, CMH2, and CD8 for dendritic cells. All cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole or 7-AAD and analyzed by flow cytometry.

Intracellular stainings. For IFN γ intracellular staining, spleens, tumors, and tumor-draining lymph nodes were harvested and dissociated as reported above, 5 d after treatment. When MDSC were reinfused, they were injected i.v. 2 d after treatment. Leukocytes were then cultured *in vitro* in three different conditions: in anti-CD3-coated wells (0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ of a 96-well tissue culture plate), in anti-CD3-coated wells with the addition of killed tumor cells (with a ratio of one killed tumor cell per two effectors), or in anti-CD3-coated wells with the addition of soluble anti-CD3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), soluble anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and interleukin-2 (1,000 U/ml; Proleukin, Chiron). Stimulation was maintained for 16 h, with brefeldin A (BD GolgiPlug) for the last 4 h. Cells were then harvested and stained for CD4, CD8, and intracellular IFN γ using the manufacturer's recommendations.

Apoptosis assays. Purified MDSC were cultured for 24 h *in vitro* with varying doses of 5FU or gemcitabine. *In vivo*, tumor-bearing mice were treated with 5FU or gemcitabine. Tumors and spleens were harvested and dissociated as described previously and then stained as follows: (a) Annexin V/7-AAD: MDSC were washed twice with cold PBS and prepared according to the manufacturer's protocol (BD Pharmingen). After staining for 15 min at room temperature with Annexin V and 7-AAD, cells were analyzed by flow cytometry; (b) Flica 3/7: cells were manipulated according to the manufacturer's protocol (ImmunoChemistry Technologies). Briefly, cells were cultured for 1 h in the presence of FAM-Flica after pretreatment with PBS or varying doses of 5FU. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry in the presence of 7-AAD. In some experiments, cell death was measured using the phenazine methosulfate

(PMS)/3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (Promega). In PMS/MTS experiments, cells were treated for 1 h with 5FU at varying concentrations in round-bottomed 96-well plates. PMS/MTS was added after 48 h and the plates were read at 540 nm.

Detection of calreticulin expression on tumor cells. EL4 cancer cells were cultured for 24 h in complete culture medium supplemented or not with doxorubicin, gemcitabine, or 5FU. Cells were stained as described elsewhere (18). Briefly, cells were saturated with 200 μ L of PBS supplemented with 2% rabbit serum before being stained with a rabbit anti-calreticulin antibody for 20 min at 4°C. Cells were permeabilized or not with BD Pharmingen, cells were incubated with anti-calreticulin rabbit antibody (AbCam) for 20 min at 4°C. Cells were then analyzed by flow cytometry.

Thymidilate synthase expression. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). One hundred to 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, random primers, and recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega). cDNA were quantified by real-time PCR using a SYBR Green Real-time PCR kit on a 7500 Fast detection system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the Δ Ct method. Values were expressed relative to mouse cyclophilin A. The same results were obtained when normalized with mouse L32 and mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase (data not shown). The sequences of the oligonucleotides used in this study were as follows: mouse cyclophilin A (forward, 5'-GGCCGATGACGAGCCC-3'; reverse, 5'-TGTCTTTGGAACCTTTGTCTGCAA-3') and mouse thymidilate synthase (TS; forward, 5'-caatggatcccagatcttc-3'; reverse, 5'-gtcatcagggttggtttga-3').

Statistical analysis. Tests used were Student's *t* test or Mann-Whitney test for parametric and nonparametric means comparison. All tests were performed with GraphPad Prism software.

Results

5FU selectively depletes MDSC. We tested the capacity of several cytotoxic agents used in conventional cancer chemotherapy to deplete MDSC *in vivo*. To this end, we used cyclophosphamide (an alkylant agent), doxorubicin (a topoisomerase II inhibitor), oxaliplatin (a platinum compound promoting DNA adducts), paclitaxel (a tubulin poison), gemcitabine (a deoxycytidine analogue that inhibits ribonucleotide reductase), and 5FU and raltitrexed [two antimetabolite agents that target thymidilate synthase (TS)]. These drugs were injected once in mice bearing 100 mm² EL4 thymoma subcutaneous tumors. In our model, MDSC were found to be abundant within the spleens and tumor beds of tumor-bearing mice before chemotherapeutic treatment (Fig. 1A), as previously described (19). Five days after injection of the cytotoxic agent, we observed that only gemcitabine and 5FU were able to significantly decrease the number of MDSC in both the spleen and tumor bed (Fig. 1A; see Supplementary

Fig. S1). Interestingly, 5FU had a more drastic effect than gemcitabine in decreasing MDSC frequency in tumor-bearing hosts. It is noteworthy that 5FU did not alter the frequency of the other cell populations within the spleen, except for a non-significant tendency for B cells to increase, compensating the loss of MDSC (Fig. 1B).

MDSC have been described to encompass at least two cell populations: granulocytic cells, Ly6G⁺Ly6C^{int}, and monocytic cells, Ly6G⁻Ly6C^{hi} (9, 10). We did not find any preferential action from either 5FU or gemcitabine on any MDSC subtype. Indeed, both drugs were similarly effective against granulocytic and monocytic MDSC (Fig. 1C). We also monitored the duration of MDSC depletion induced by 5FU, and found that the nadir was around day 5 posttreatment, then MDSC number increased following tumor growth (Fig. 1D).

Thus, we show that, among the seven cytotoxic agents assayed, only 5FU (and to a lesser extent gemcitabine) was able to lower MDSC number within the tumor bed and spleen of cancer-bearing hosts.

5FU triggers MDSC apoptosis. The disappearance of MDSC from tumors and spleens could possibly be explained by the direct cytotoxic effect of 5FU, which could preferentially trigger their death. We therefore tested whether MDSCs were undergoing apoptosis after 5FU treatment.

Because of spontaneous rapid death of *ex vivo* MDSC, we took advantage of immortalized MDSC cell lines (20). First, we cultured established murine MDSC cell lines in the presence of various concentrations of 5FU and evaluated MDSC cell death using both Annexin V/7-AAD labeling (Fig. 2A, left) and the detection of activated caspases-3 and -7 (Fig. 2A, right). Both methods showed that 5FU triggered MDSC apoptotic cell death in a dose-dependent manner. *In vivo*, we could also note an increase in the presence of activated caspases-3 and -7 in splenic MDSC from 5FU-treated tumor-bearing mice compared with untreated mice, although other immune cells were not killed by 5FU at this dose (data not shown). To our surprise, we also noted that 5FU *in vitro* at low concentrations was more toxic in MSC cell lines than in tumor cells. Indeed, a 20-fold to 50-fold higher concentration of 5FU was required to kill EL4 tumor cells relative to MSC (Fig. 2B). Of note, freshly sorted MDSC underwent spontaneous and rapid death, but surviving cells were also 5FU-sensitive (data not shown).

The cytotoxic action of 5FU was mediated by its metabolites which inhibit TS. Low expression of TS has been shown to be involved in 5FU sensitivity in tumor cells (21–23); therefore, we hypothesized that MDSC's sensitivity to 5FU might be related to lower TS expression. We then performed quantitative PCR on cell extracts to test TS expression (Fig. 2C). We found that MDSC and MSC cell lines expressed fewer TS than splenocytes or tumor cells, thus suggesting that MDSC sensitivity to 5FU may be linked to their low expression of TS. On the whole, these results show that *in vitro* and *in vivo* low concentrations of 5FU selectively induced MDSC apoptotic cell death.

5FU immunogenic effects are primarily attributable to MDSC depletion. Chemotherapeutic agents have been shown to alter the antitumor response (16). Specifically,

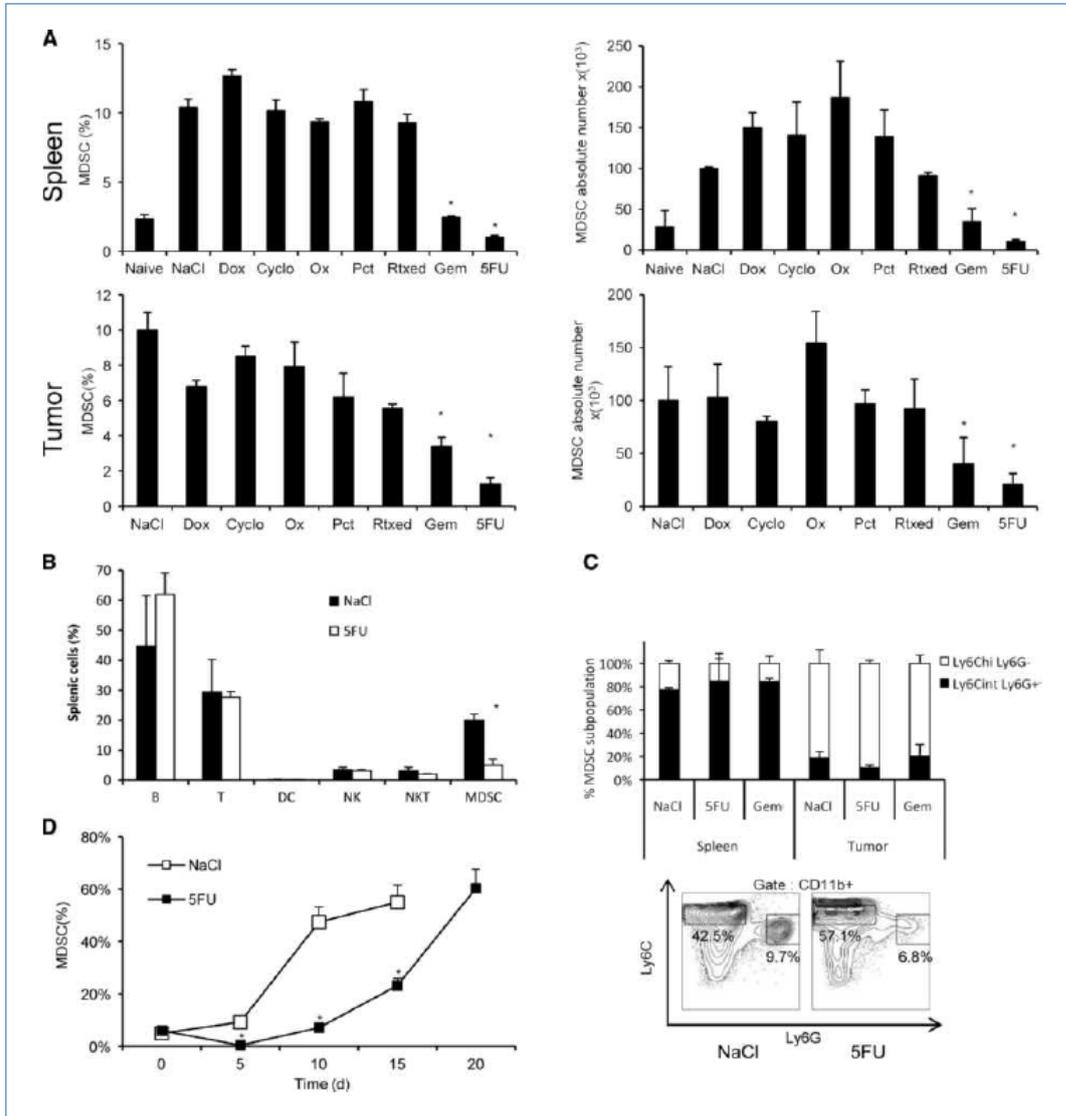


Figure 1. 5FU and gemcitabine eliminate MDSC *in vivo*. A, mice were tumor-free (Naive) or inoculated s.c. with EL4 tumor cells. Five days after the indicated chemotherapy (NaCl, control mice; Dox, doxorubicin; CTX, cyclophosphamide; Ox, oxaliplatin; Pct, paclitaxel; Rtxed, raltitrexed; Gem, gemcitabine; 5FU, 5-fluorouracil), spleens and tumors were harvested and MDSC infiltration was determined by FACS analysis. Graphics show the percentage of splenic and tumor infiltration MDSC and the absolute number of MDSC in spleen and tumors. B, effect of 5FU on other splenic cell populations. C, the percentages of monocytic (Ly6C^{hi}Ly6G⁻) and granulocytic (Ly6C^{int}Ly6G⁺) subpopulation of MDSC after 5FU treatment was determined by FACS analysis. Bottom, representative FACS. D, tumor-bearing mice were treated or not with 5FU, and spleens were harvested at various posttreatment times. Graphic shows the percentage of splenic MDSC. Columns, mean; bars, SEM. The experiments were performed twice with similar results, $n = 4$ per group (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

some chemotherapeutic agents could promote Treg cell killing (24–26) or affect the biology of dendritic cells (27, 28). We therefore tested if, in addition to its action on MDSC, 5FU exerted some of these reported effects on the immune

system. To this end, we first compared 5FU and cyclophosphamide for their ability to trigger regulatory T-cell depletion *in vivo*. Although cyclophosphamide administration led to a reduction in Treg numbers in the tumor bed and in the

spleen, 5FU had no such effect in the same setting (Fig. 3A). Similarly, we verified that 5FU (in contrast to mafosphamide) exerts no toxic effect on regulatory T cells *in vitro* (data not shown).

Cancer chemotherapy may also enhance the anticancer immune response by promoting the maturation of antigen-presenting cells. We thus tested the effect of a single systemic injection of 5FU, gemcitabine, or Gram-negative bacteria lipopolysaccharide on the maturation pattern of splenic dendritic cells. In this setting, although lipopolysaccharide induced a massive upregulation of CD86 and CD40, 5FU administration did not significantly alter the expression of

those markers, ruling out a putative involvement of 5FU in inducing dendritic cell maturation (Fig. 3B).

We have previously shown that the *in vivo* efficacy of doxorubicin relied on its ability to trigger an "immunogenic" cell death of cancer cells. Treatment of tumor cells by doxorubicin leads to the cell surface exposure of calreticulin, which is responsible for tumor cell phagocytosis, and to the release of HMGB1, which is critical for the Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated cross-presentation of tumor antigens from dendritic cells to T cells (29). To test the ability of 5FU to trigger an immunogenic form of cell death *in vivo*, we first monitored the expression of cell surface calreticulin on EL4 cells treated

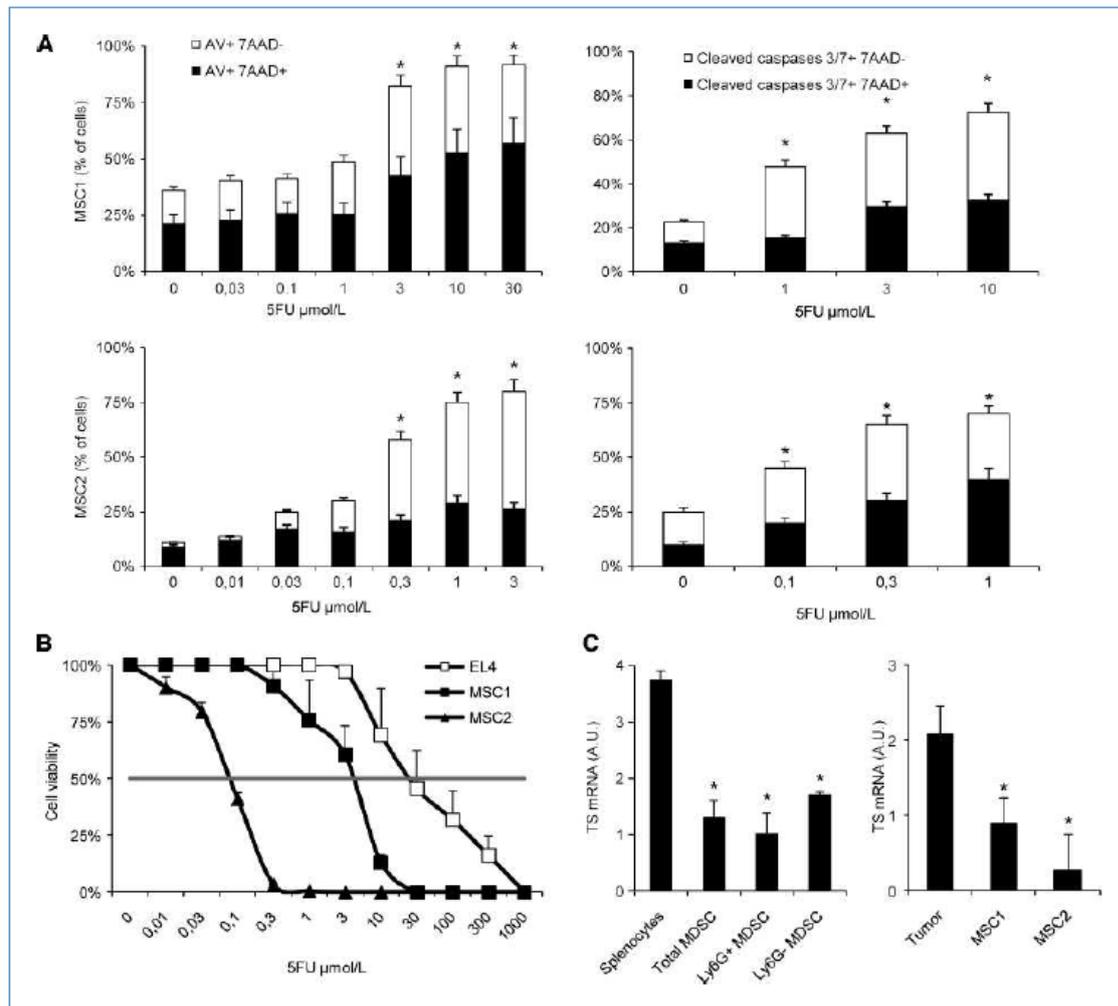


Figure 2. 5FU induces MDSC apoptosis. A, the effect of 5FU on MSC1 and MSC2 cell lines was tested *in vitro* for apoptosis induction. FACS analysis of Annexin V/7-AAD staining (left) or activated caspase-3/7-AAD (right) staining results, respectively, in MSC1 (top) or MSC2 (bottom). B, compared dose-effect relation of 5FU-induced cell death on MSC cell lines and EL4 tumor cell lines. The experiments were performed thrice with identical results. C, quantitative RT-PCR for TS was performed on extracts from the indicated cellular preparation. Total MDSC were prepared as usual, granulocytic (Ly6G⁺) or monocytic (Ly6G⁻) cells were sorted by FACS from spleens of tumor-bearing mice. The experiments were performed twice with similar results (*, $P < 0.05$).

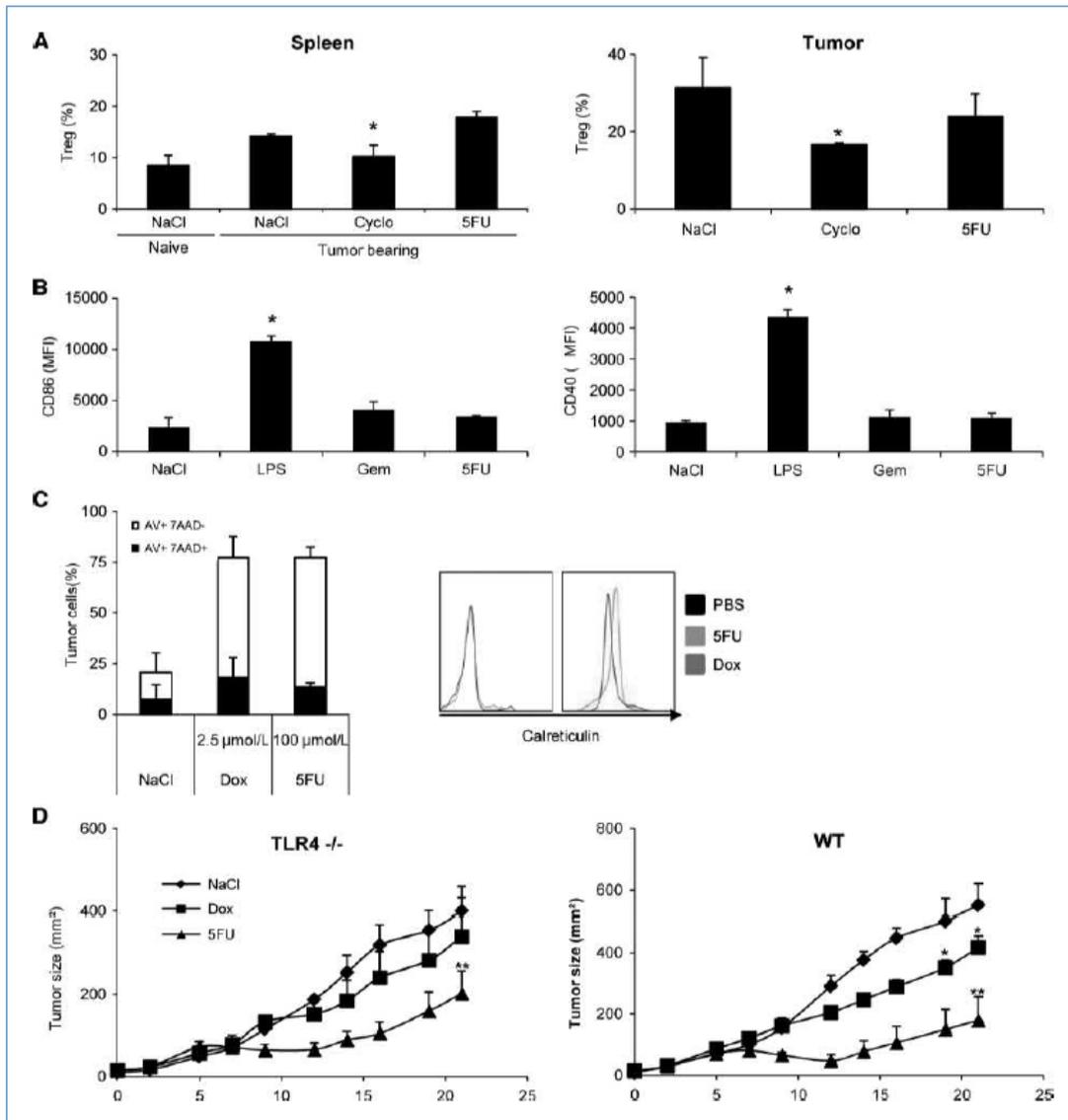


Figure 3. 5FU immunomodulatory effects are restrained to MDSC depletion. **A**, effect of 5FU or cyclophosphamide on Tregs. Mice bearing EL4 tumors either received no treatment (PBS) or one s.c. administration of cyclophosphamide (Cyclo) or 5FU. Splenic (top) or tumor-infiltrating (bottom) Tregs, respectively, 5 d after drug administration. **B**, effect of 5FU or gemcitabine on splenic dendritic cell maturation. Tumor-free mice received an injection of lipopolysaccharide (LPS), gemcitabine (Gem), or 5FU. Twenty-four hours after treatment, dendritic cells were isolated from the spleen and examined by flow cytometry after labeling with antibodies to CD86 (left) or CD40 (right). MFI, mean fluorescence index. **C**, tumor cells were treated with PBS, doxorubicin (Dox), or 5FU then mortality was evaluated with Annexin V/7-AAD labeling (left), membrane calreticulin presence was assayed by flow cytometry (right). **D**, effect of 5FU and doxorubicin on tumor growth in WT (right) or TLR4^{-/-} (left) mice ($n = 5$ per group). The experiments were performed twice with identical results (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

with 5FU or doxorubicin as a positive control. Although doxorubicin treatment could trigger cell surface expression of calreticulin, we failed to show any significant upregulation of calreticulin by treating EL4 cells with 5FU (Fig. 3C). We

then compared the effect of 5FU on EL4 tumor growth in wild-type (WT) and TLR4-deficient mice. Although the efficacy of doxorubicin was largely impaired in TLR4-deficient hosts, we observed that 5FU had a TLR4-independent

antitumor activity (Fig. 3D). These results suggest that the antitumor effects of 5FU cannot be explained by its ability to trigger an immunogenic form of tumor cell death. Altogether, these data show that the 5FU immune-mediated effects specifically rely on the elimination of MDSC.

5FU-induced specific activation of CD8⁺ T cells. As MDSC are known to inhibit antigen-dependent CD8⁺ T cell proliferation and Tc1 differentiation (3), we tested whether 5FU could affect Th1- or Tc1-specific polarization in tumor-bearing animals. To this end, leukocytes from the spleen, tumor-draining lymph nodes, and tumor bed from EL4 tumor-bearing mice treated or not with 5FU were stimulated either with dead EL4 tumor cells or nonspecifically with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. We then performed intracellular staining for IFN- γ production. We did not detect any significant IFN- γ production by either CD4⁺ or CD8⁺ T cells obtained from spleen or draining lymph node of tumor-bearing animals, even after specific T-cell restimulation (data not shown). In contrast, antigen-specific restimulation of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells (but not CD4⁺ T cells) produced detectable levels of IFN- γ , which was enhanced after 5FU treatment of EL4 tumor-bearing mice (Fig. 4A and B). Moreover, adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice drastically impeded IFN- γ production by

CD8⁺ T cells (Fig. 4A and B). These data collectively suggest that the selective cytotoxic activity of 5FU on MDSC could locally enhance the Tc1 polarization of CD8⁺ T cells.

5FU exerts an MDSC-dependent antitumor effect and acts synergistically with the depletion of regulatory T cells. We first treated WT or nude mice bearing a large EL4 tumor with gemcitabine or 5FU (Fig. 5A and B). These two treatments efficiently slowed down tumor growth in WT mice but exerted only a minor effect on tumor growth in nude mice (Fig. 5A and B). These data show that these chemotherapies depend on T cells to mediate their activity. In addition, we observed in WT mice bearing tumors that an adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice 1 day after 5FU injection blunted the *in vivo* antitumor effect of 5FU (Fig. 5C). Altogether, these data suggest that 5FU exerts its activities through the elimination of MDSC and permits the restoration of T cell-dependent antitumor responses.

Tregs represent another population of immunosuppressive cells that exerts a major negative effect on antitumor immune response (25, 26, 30). We showed previously that a low dose of cyclophosphamide could deplete this population and restore latent antitumor immunity (25, 26). Cyclophosphamide had a T-dependent antitumor effect that was annihilated by an adoptive transfer of Treg cells (25, 30). These

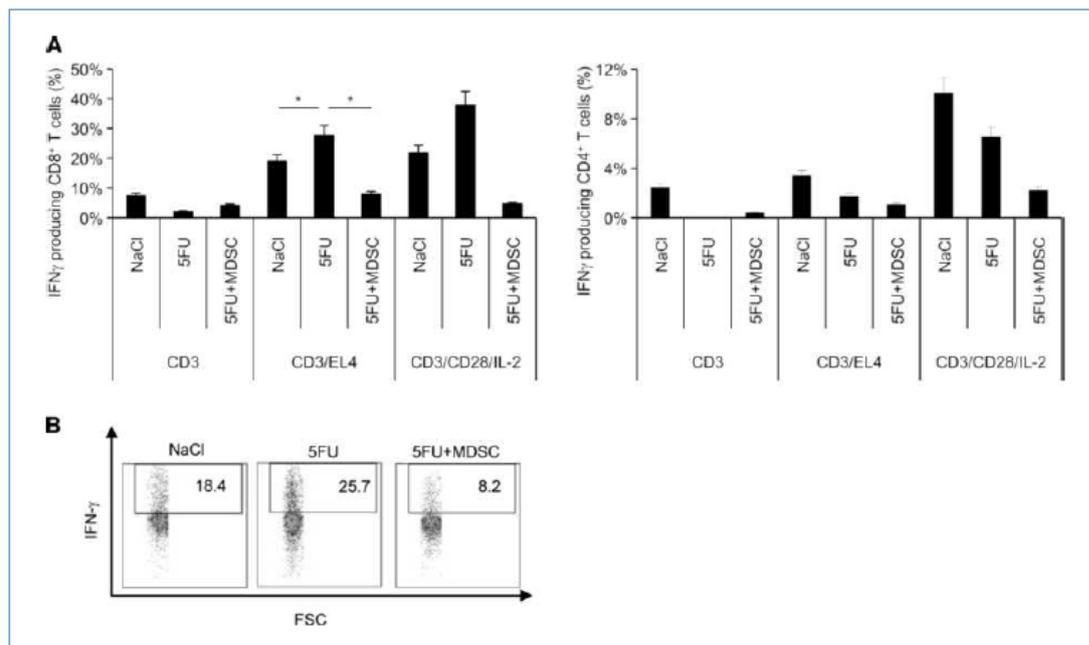


Figure 4. 5FU-induced specific activation of CD8⁺ T cells. A, EL4 tumor-bearing mice were treated with 5FU (or NaCl for controls; 50 mg/kg body weight) and injected (when indicated) with 5×10^6 MDSC isolated from the spleen of tumor-bearing mice. Tumor-infiltrating leukocytes isolated 5 d after 5FU treatment were stimulated with immobilized anti-CD3 alone, anti-CD3 plus killed EL4 cells, or anti-CD3 plus anti-CD28 for 12 h. IFN- γ production in tumor-infiltrating T CD8 (left) or T CD4 (right) lymphocytes, respectively. B, representative FACS showing the effect of 5FU treatment on IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes from EL4 tumor infiltrate and its modulation by passive transfer of MDSC. The experiments were performed thrice with identical results (*, $P < 0.05$).

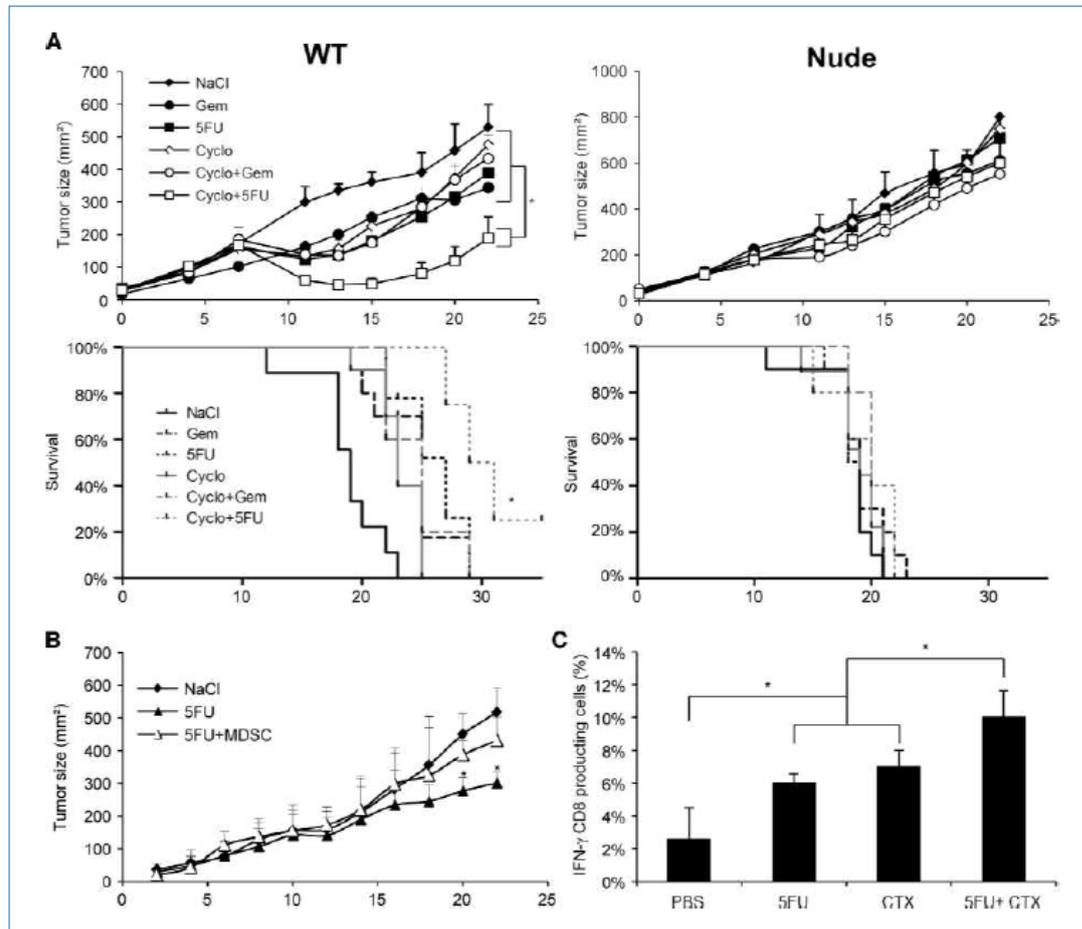


Figure 5. The antitumor effect of 5FU relies on MDSC. A, WT (left) or nude (right) mice were injected with 2×10^5 EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm^2 with one s.c. injection of the indicated chemotherapy. WT (left) or nude (right) mice, respectively. Tumor growth was measured every 2 d (top) and survival was monitored (bottom; $n = 10$). B, WT mice were treated when tumor reached 200 mm^2 with one s.c. injection of 5FU (50 mg/kg) or 5FU plus an adoptive transfer of 5×10^6 splenic MDSC cells from tumor-bearing mice ($n = 10$). Top, tumor growth in each group; bottom, mice survival using Kaplan-Meier curves. The experiments were performed thrice with similar results. C, WT mice were injected with 2×10^5 EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm^2 with the combination of 5FU (50 mg/kg) plus cyclophosphamide (CTX, 80 mg/kg), or 5FU alone or were left untreated. Cells isolated from tumor-infiltrating lymphocytes were stimulated with anti-CD3 plus dead EL4 cells. Histogram represents the percentage of IFN- γ -producing CD8 T cells in tumor-infiltrating CD8 T lymphocyte ($n = 4$). The experiments were performed twice with similar results (*, $P < 0.05$).

data provided the impetus to combine Treg and MDSC depletion to enhance T-cell functions and antitumor responses. The two combinations (cyclophosphamide plus gemcitabine and cyclophosphamide plus 5FU) showed a synergistic effect in WT mice compared with monotherapies but had little or no effect on tumors growing in nude mice (Fig. 5A and B). Interestingly, the cyclophosphamide + 5FU combination showed a significantly superior antitumor effect compared with the cyclophosphamide + gemcitabine combination in immunocompetent mice, and mice survival was improved in the cyclophosphamide + 5FU group ($P = 0.04$, log rank test). In line with the *in vivo* results, we verified *ex vivo* that the com-

bination of 5FU and cyclophosphamide enhanced the number of tumor-specific IFN- γ producing specific intratumoral CD8 T cells compared with monotherapies (Fig. 5D).

Altogether, these data show that cyclophosphamide and 5FU could exert a T-dependent synergistic antitumor effect and could lead to the cure of some animals bearing large tumors.

Discussion

The recognition that immune suppression is crucial to promote tumor progression, which might explain the failure of some cancer vaccines, has resulted in a paradigm shift

regarding approaches to cancer immunotherapy. It indeed becomes clear that successful cancer immunotherapy will only be achieved when associated with the elimination of suppressive cells (31–33). Two major immunosuppressive cell types are mainly involved in tumor-induced immunosuppression: Tregs and MDSC. The elimination of Treg cells using a low dosage of cyclophosphamide as a metronomic regimen proved its efficacy in many rodent models as well as in humans (25, 26, 30, 34–37). Many strategies have been tested to dampen the immunosuppressive actions of MDSC, including treatments designed to favor their differentiation, or to inhibit their expansion or their inhibitory function (13, 38). However, the most promising results have been obtained with the selective depletion of these cells. Some groups tested the *in vivo* administration of monoclonal antibodies against Gr-1, aimed at depleting Gr-1⁺ MDSC. This treatment gave interesting results in restoring T cell antitumor activity, both in terms of general reduction of tumor progression and in terms of prevention of relapse (39, 40). Unfortunately Gr-1 is not a specific marker of MDSC as it is also expressed in granulocytes, implying the possibility that tumor-bearing hosts treated with such depleting antibodies might undergo opportunistic infections. This consideration emphasizes the interest of screening drugs aimed at selectively depleting MDSC. It was recently shown that several cytotoxic agents used for cancer chemotherapy not only featured a direct cytotoxic effect on tumor cells, but also featured an interesting side effect by eliminating leukocyte subpopulations involved in the suppression of antitumor immunity (35). However, up to now, only gemcitabine has been shown to be able to eliminate MDSC, one of the major cell populations involved in tumor tolerance (14, 15).

Here, we show for the first time that 5FU was also able to reduce the number of MDSCs not only in the spleen but also in the tumor bed. The effect of 5FU on MDSC was obtained at low doses and seemed to be selective as we did not observe any *in vivo* drop in T cells, B cells, or dendritic cell numbers. This effect was mediated by inducing the apoptotic death of MDSC with activation of caspase-3 and caspase-7 both *in vitro* and *in vivo*. The effect of 5FU lasted for ~10 days *in vivo*, and could be related to a lower TS expression in this cell type. Moreover, the effect of 5FU on MDSC seemed more pronounced than the effect of gemcitabine, thus suggesting that this agent could be more efficient in enhancing antitumor immunity.

MDSC are well known inhibitors of CD8⁺ T cell activation (3). We showed here for the first time that 5FU induces MDSC depletion and could enhance the intratumoral CD8⁺ T cell antigen-specific capacity to produce IFN- γ . This effect was reversed by adoptive transfer of MDSC thus providing the evidence that reinfused MDSC could migrate to the tumor and blunt T cell reactivity *in situ*. When monitoring

tumor growth, we observed that its inhibition by 5FU was strictly dependent on T cells and was also completely hindered by MDSC transfer. Based on these results, we propose that most of the antitumor effect of 5FU could be explained by its capacity to eliminate MDSC and restore CD8⁺ cell capacity to produce IFN- γ . Finally, we have shown that the association of Treg and MDSC depletion obtained with cyclophosphamide and 5FU, respectively, has a synergistic effect on the suppression of tumor growth. This data is of importance because it shows that therapies acting on tumor immunosuppression may be sufficient to restore T-cell function and obtain therapeutic effects. The antitumor activity obtained by the 5FU-cyclophosphamide association in our experimental tumor model strongly suggests that controlling tumor-induced tolerance is at least of equal importance as activating tumor immunity with a tumor vaccine for the purpose of obtaining immune eradication of cancers.

5FU, an analogue of uracil, the metabolites of which misincorporate in RNA and DNA and inhibit TS, is a cytotoxic agent widely used in the treatment of colorectal and breast cancers, as well as cancers of the aerodigestive tract (21). Its efficacy in cancer chemotherapy is currently considered to result directly from its toxic effect on tumor cells. Here, we report that 5FU could also hinder tumor growth by selectively destroying the tumor-associated MDSC, thus inhibiting their suppressive effect on the T cell-mediated control of the tumor. Even if this effect was briefly discussed in a very recent review (33), our report is the first one to actually bring up experimental evidence on the cytotoxic effect of 5FU on MDSC. Interestingly, in our experimental tumor model, the effect of 5FU on MDSC was predominant over its direct effect on tumor cells, thus explaining why the antitumor effect of 5FU is hampered by MDSC adoptive transfer. In summary, the results of our study would support the addition of 5FU to the expanding list of chemotherapeutic agents whose antitumor effects depend, at least in part, on their capability to enhance the anticancer immune response (16).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Grant Support

Fondation de France, ARC, Ligue Départementale Comité de Cote d'Or; ARC (G. Mignot); Conseil Régional Bourgogne/INSERM (F. Chalmin); and the European Molecular Biology Organization (L. Apetoh).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 10/06/2009; revised 01/12/2010; accepted 01/27/2010; published OnlineFirst 04/06/2010.

References

- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009;182:4499–506.
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for

myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007;67:425, author reply 6.

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

4. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 2006;116:2777-90.
5. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 2005;202:931-9.
6. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13:828-35.
7. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 2003;74:186-96.
8. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, et al. IL4R α + myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* 2009;182:6562-8.
9. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181:5791-802.
10. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008;111:4233-44.
11. Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001;166:678-89.
12. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P, et al. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother* 2001;24:431-46.
13. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 2008;222:162-79.
14. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:6713-21.
15. Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res* 2007;67:7477-86.
16. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:59-73.
17. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med* 2008;14:141-51.
18. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009;28:578-90.
19. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates pStat3 dependent immunosuppressive function of myeloid derived suppressor cells. *J Clin Invest* 2010;120.
20. Apolloni E, Bronte V, Mazzoni A, et al. Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes. *J Immunol* 2000;165:6723-30.
21. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-8.
22. Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-305.
23. van Kuilenburg AB, De Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem* 2003;40:41-5.
24. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005;202:919-29.
25. Ghiringhelli F, Lamnion N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336-44.
26. Roux S, Apetoh L, Chalmin F, et al. CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3751-61.
27. Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res* 2009;69:6967-94.
28. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 2009;183:137-44.
29. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13:1050-9.
30. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J Exp Med* 2005;202:1075-85.
31. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007;117:1167-74.
32. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:641-8.
33. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:470-81.
34. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005;105:2862-8.
35. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1219-28.
36. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, et al. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 2005;201:1591-602.
37. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;200:771-82.
38. Serafini P, Meckel K, Kelso M, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2006;203:2691-702.
39. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999;162:5728-37.
40. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003;198:1741-52.

Discussion :

L'effet des agents chimiothérapeutiques sur les cellules immunosuppressives reste un phénomène mal connu. Notre équipe s'attache à ce phénomène depuis plusieurs années. Ainsi notre équipe a pu démontrer il y a quelques années que de faibles doses de cyclophosphamide pouvaient éliminer les cellules T régulatrices chez les animaux atteints de tumeurs^{86, 289, 300, 301, 302}. La sensibilité des Treg au cyclophosphamide pourrait être liée à leur expression sélective de Foxp3, ce qui induit l'expression de molécules pro-apoptotiques³⁰³ sensibilisant les Treg à l'apoptose³⁰⁴. Un autre mécanisme pourrait aussi expliquer leur sensibilité au cyclophosphamide. Ainsi les Treg sont caractérisés par une faible teneur en ATP intracellulaire, un phénomène qui semble aussi les rendre plus sensible au cyclophosphamide en limitant sa detoxification dépendant du glutathion et de l'ATP³⁰⁵.

Les cellules Myéloïdes Suppressives (MDSC) représentent une population de cellules myéloïdes immatures, précurseurs des macrophages, des granuleux et des cellules dendritiques, qui ont la capacité de supprimer la réponse immunitaire T-dépendante. Ces cellules peuvent contrôler directement la réponse des cellules T, mais aussi induire la prolifération des Treg via leur production de TGF- β ²⁸⁹. Ainsi, le cyclophosphamide, un anticancéreux qui élimine électivement les Treg tout en préservant les autres populations cellulaires T, a la capacité de renforcer l'immunité latente anti-tumorale et l'efficacité de vaccins anti-tumoraux. La gemcitabine, un autre médicament cytotoxique, peut réduire spécifiquement le nombre des MDSC trouvées dans la rate de souris portant une tumeur et ainsi améliorer la réponse anti-tumorale des cellules T²⁵⁴. A la suite d'un criblage de drogues, nous avons montré que l'agent le plus efficace pour éliminer les MDSC est le 5-fluorouracil. Nous avons pu démontrer que les MDSC ont une grande sensibilité à cet agent en raison de la faible expression de la thymidylate synthase, l'enzyme cible de la fluoropyrimidine. Ce mécanisme est intéressant car il semble être le pendant de l'effet du cyclophosphamide sur les lymphocytes T régulateurs mais également par ce que les MDSC présentent une sensibilité au 5FU à des doses infra cliniques et donc il semblerait qu'aux doses utilisées en clinique ce traitement devrait pouvoir détruire les MDSC.

Certaines drogues de chimiothérapie, grâce à leur mécanisme d'action, ont la capacité d'induire une mort immunogène des cellules cancéreuses caractérisées par une

suite d'événements moléculaires comme l'expression membranaire de la calréticuline, la sécrétion de la protéine HMGB1 et la sécrétion d'ATP. Le 5-fluorouracil est incapable d'induire l'exposition de calréticuline à la surface des cellules tumorales, le signal essentiel pour induire une mort cellulaire immunogène. On pourrait donc penser qu'il serait intéressant d'associer le 5-fluorouracil à des drogues pouvant induire la mort immunogène comme les anthracyclines ou l'oxaliplatine.

Suite à la reprise de mon activité clinique à plein temps, ce sujet a été repris par Mélanie Bruchard. Il a été découvert que le 5-fluorouracil, en tuant les MDSC, induit un clivage de la caspase 1 et une libération d'IL-1 β . Cette cytokine est alors impliquée dans la polarisation des lymphocytes T CD4 + en cellules Th17. Ces cellules peuvent alors favoriser l'angiogenèse et la croissance tumorale. Ce phénomène souligne l'effet ambivalent du 5-fluorouracil sur le système immunitaire avec une capacité à éliminer les cellules immunosuppressives mais aussi à induire une inflammation proangiogénique et protumorale (Bruchard et al Nat Med 2013). Ainsi l'effet du 5-fluorouracil est potentialisé par un inhibiteur de l'IL-1 chez la souris

A l'heure actuelle je participe avec le Professeur Ghiringhelli à la génération d'un essai thérapeutique d'association du LV5FU2 + bevacizumab + anakinra (un inhibiteur de l'IL-1) en deuxième ligne de traitement chez des patients ayant échappé à une première ligne thérapeutique comprenant LV5FU2 + bevacizumab. Nous espérons avec les données cliniques et biologiques de cette étude valider les travaux murins chez l'homme.

B. Projet 2.

Dans ce deuxième projet nous avons voulu aborder le problème des infiltrats immunitaires tumoraux chez des patients porteurs de cancers coliques. Récemment l'équipe de Frank Pages et Jérôme Galon a démontré qu'un infiltrat immunitaire riche en cellules CD8 et CD45RO est associé à un meilleur pronostic chez des patients porteurs d'un cancer colique localisé. Ce paramètre semble particulièrement important car il semble plus performant que la classification TNM pour classer les malades mais aussi car il semble indépendant des autres marqueurs pronostics. Malgré tout, peu de chose sont connues sur les patients atteints de cancers coliques métastatiques. Lorsque nous avons commencé ces travaux aucun résultat n'était publié dans le domaine. Nous nous sommes donc demandé si les infiltrats en cellules CD45RO, CD8 et Foxp3 étaient associés au pronostic des malades.

1. Caractéristiques de la population

a) Caractéristiques cliniques et biologiques

De 1994 à 2010, 66 patients ont été opérés à visée curative de métastases hépatiques d'un cancer colorectal au Centre Georges François Leclerc. Les caractéristiques de ces patients ainsi que de la tumeur primitive et des localisations secondaires hépatiques sont résumées dans le **tableau 1**.

Notre population se composait de 65,2% d'hommes et d'une majorité de patients âgés de plus de 60 ans (63,6%). 66,7% des localisations tumorales primitives étaient coliques et la majorité des patients (74,3%) présentait un envahissement ganglionnaire sur la pièce opératoire de la tumeur primitive.

Le délai d'apparition de la métastase hépatique après le diagnostic de la tumeur primitive était inférieur à 1 an dans 60,5% des cas. Les métastases hépatiques étaient le plus souvent uniques (71,2%) et de taille inférieure à 5 cm (75,8%). Pour la majorité des patients (62,1%), la marge chirurgicale après métastasectomie hépatique était supérieure à 1 cm.

Parmi nos 66 patients, 26 (39,4%) ont été traités par chirurgie seule, et 40 (60,6%) ont reçu une chimiothérapie préopératoire. 53% des patients ont reçu une chimiothérapie adjuvante après exérèse de la métastase hépatique.

Au cours du suivi, 71% des patients ont présenté une récurrence hépatique et au terme de la surveillance, 62% des patients sont décédés.

Tableau 1 : **Caractéristiques cliniques et biologiques des patients (n=66)**

	Patients traités par chirurgie seule N=	Patients traités par chimiothérapie, puis chirurgie N=	Total N=	p-value Chi ² ou Student
Sexe				
M	17 (65.4%)	26 (65%)	43 (65.2%)	
F	9 (34.6%)	14 (35%)	23 (34.8%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	60 (100%)	
Age				
Supérieur à 60 ans	13 (50%)	29 (72.5%)	42 (63.6%)	0.11
Inférieur à 60 ans	13 (50%)	11 (27.5%)	24 (36.4%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Tumeur primitive				
N+	19 (73.1%)	30 (75%)	49 (74.3%)	0.91
N-	7 (26.9%)	10 (25%)	17 (25.7%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Côlon	19 (73.1%)	25 (62.5%)	44 (66.7%)	
Rectum	7 (26.9%)	15 (37.5%)	22 (33.3%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Délai tumeur primitive – méta hépatique				
Supérieur à 1 an	16 (61.5%)	10 (25%)	26 (39.4%)	0.007
Inférieur à 1 an	10 (38.5%)	30 (75%)	40 (60.6%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Taille de la métastase				
Supérieure à 5 cm	7 (26.9%)	9 (22.5%)	16 (24.2%)	0.90
Inférieure à 5 cm	19 (73.1%)	31 (77.5%)	50 (75.8%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Nombre de métastases hépatiques				

1	22 (84.6%)	25 (62.5%)	47 (71.2%)	0.09
Plus de 1	4 (15.4%)	15 (37.5%)	19 (28.8%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Chirurgie				
Tumorectomie	22 (84.6%)	29 (72.5%)	51 (77.3%)	0.39
Hépatectomie	2 (7.7%)	8 (20%)	10 (15.1%)	
Complexe	2 (7.7%)	3 (7.5%)	5 (7.6%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Marge chirurgicale				
Plus de 1 cm	18 (69.2%)	23 (57.5%)	41 (62.1%)	0.48
Moins de 1 cm	8 (30.8%)	17 (42.5%)	25 (37.9%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Métastase extra hépatique à la chirurgie				
Non	23 (88.5%)	30 (75%)	53 (80.3%)	0.30
Oui	3 (11.5%)	10 (25%)	13 (19.7%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Taux d'ACE				
Inférieur à 5	13 (50%)	21 (52,5%)	34 (51,5%)	0,664
Supérieur à 5	13 (50%)	19 (47,5%)	32 (48,5%)	
Taux de LDH				
Inférieur à N	10 (38.5%)	14 (35%)	24 (36.4%)	0.98
Supérieur à N	16 (61.5%)	26 (65%)	42 (63.6%)	
Taux de leucocytes				
Inférieur à N	24 (92.3%)	38 (95%)	62 (93.9%)	0.93
Supérieur à N	2 (7.7%)	2 (5%)	4 (6.1%)	
Chimiothérapie adjuvante				
Non	14 (53.8%)	21 (52.5%)	35 (53%)	0.88
Oui	12 (46.2%)	19 (47.5%)	31 (47%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Rechute				
Oui	18 (69.2%)	29 (72.5%)	47 (71.2%)	0.99
Non	8 (30.8%)	11 (27.5%)	19 (28.8%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	

Décès				
Oui	18 (69.2%)	23 (57.5%)	41 (62.1%)	0.48
Non	8 (30.8%)	17 (42.5%)	25 (37.9%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	

b) Caractéristiques immunologiques

L'ensemble des caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'infiltrat immunologique en lymphocytes T CD45RO+, CD8+ et Foxp3+ des métastases hépatiques des cancers colorectaux sont résumées dans le **tableau 2**. Lorsque plusieurs métastases ont été réséquées, chacune des pièces de métastasectomie a fait l'objet d'une analyse individuelle. Dans ces conditions et chez un même patient, les résultats trouvés ont été identiques d'une métastase à l'autre.

Sur les 66 métastases hépatiques réséquées, 22,7% ne présentaient pas d'infiltration intratumorale en lymphocytes T CD45RO+, et 33,3% avaient un infiltrat de moyenne abondance. 63,6% des métastases hépatiques avaient un faible infiltrat intratumoral en lymphocytes T CD8+ et 67,5% une forte infiltration en lymphocytes T régulateurs Foxp3+. Concernant l'infiltrat lymphocytaire péri tumoral, 45,5% des patients présentaient un infiltrat faible en lymphocytes T CD45RO+, et la majorité une faible densité en lymphocytes T CD8+ (65,2%) et T régulateurs Foxp3+ (65,2%).

Tableau 2 : Caractéristiques de l'infiltrat immunologique des métastases hépatiques (n=66)

	Patients traités par chirurgie seule N=	Patients traités par chimiothérapie, puis chirurgie N=	Total N=	p-value Chi²
Infiltrat CD45RO+ intratumoral				
0	5 (19.2%)	10 (25%)	15 (22.7%)	0.83
1	8 (30.8%)	11 (27.5%)	19 (28.8%)	
2	8 (30.8%)	14 (35%)	22 (33.3%)	
3	5 (19.2%)	5 (12.5%)	10 (15.2%)	
Total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Infiltrat CD45RO+ péri tumoral				
0	2 (7.7%)	1 (2.5%)	3 (4.5%)	0.42
1	14 (53.8%)	16 (40%)	30 (45.5%)	
2	6 (23.1%)	13 (32.5%)	19 (28.8%)	
3	4 (15.4%)	10 (25%)	14 (21.2%)	
total	26 (100%)	40 (100%)	66 (100%)	
Infiltrat CD8+ intratumoral				
Faible	17 (65.4%)	25 (62.5%)	42 (63.6%)	0.98
Fort	9 (34.6%)	15 (37.5%)	24 (36.4%)	
Infiltrat CD8+ péri tumoral				
Faible	18 (69.2%)	25 (62.5%)	43 (65.2%)	0.76
Fort	8 (30.8%)	15 (37.5%)	23 (34.8%)	
Infiltrat Foxp3+ intratumoral				
Faible	8 (30.8%)	13 (32.5%)	21 (31.8%)	0.90
Fort	18 (69.2%)	27 (67.5%)	45 (68.2%)	
Infiltrat Foxp3+ péri tumoral				
Faible	15 (57.7%)	28 (70%)	43 (65.2%)	0.44
Fort	11 (42.3%)	12 (30%)	23 (34.8%)	

2. Survie sans récurrence

a) analyse univariée

- Paramètres cliniques et biologiques

Les résultats des différents paramètres cliniques et biologiques étudiés en analyse univariée sont résumés dans le **tableau 3**.

Parmi les différents paramètres étudiés en analyse univariée, seuls une marge chirurgicale supérieure à 1 cm ($p=0,01$) et un taux de LDH bas ($p=0,03$) étaient significativement associés à une meilleure survie sans récurrence.

Dans notre étude, l'administration d'une chimiothérapie préopératoire n'est pas associée à une meilleure survie sans récurrence ($p=0,51$).

Tableau 3 : Analyse univariée de la survie sans récurrence, variables non immunologiques

		HR	IC 95%	p-value
Age				
	Inférieur à 60 ans	1		
	supérieur à 60 ans	0.6	[0.34-1.11]	0.11
Tumeur primitive				
	N-	1		
	N+	1.51	[0.72-3.13]	0.25
Délai tumeur primitive – méta hépatique				
	Inférieur à 1 an	1		
	Supérieur à 1 an	1.15	[0.62-2.14]	0.64
Taille de la métastase				
	Inférieure à 5 cm	1		
	Supérieure à 5 cm	0.76	[0.35-1.63]	0.48
Nombre de métastases hépatiques				
	1	1		
	Plus de 1	1.24	[0.66-2.32]	0.50
Métastase extra hépatique à la chirurgie				
	Non	1		
	Oui	1.72	[0.83-3.58]	0.14
Marge chirurgicale				
	Plus de 1 cm	1		
	Moins de 1 cm	2.08	[1.17-3.70]	0.01
Taux d'ACE*				

	1		
	0.99	[0.98-1.0043]	0.21
Taux de LDH*			
	1		
	1.0017	[1.0001-1.0032]	0.03
Taux de leucocytes*			
	1		
	1.0001	[1.000-1.0002]	0.18
Chimiothérapie adjuvante			
Oui	1		
Non	1.06	[0.59-1.91]	0.83
Chimiothérapie néoadjuvante			
Oui	1		
Non	1.23	[0.65-2.30]	0.51

(*Les hasard ratio pour les variables quantitatives sont calculés pour une unité)

Tableau 4 : Analyse univariée de la survie sans récurrence, caractéristiques immunologiques

	HR	IC 95%	p-value
Infiltrat CD45RO+ intratumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	3.23	[1.72-6.11]	0.00028
Infiltrat CD45RO+ péri-tumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	1.16	[0.65-2.08]	0.61
Infiltrat CD8+ intratumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	1.85	[0.97-3.57]	0.06
Infiltrat CD8+ péri-tumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	1.61	[0.84-3.12]	0.62
Infiltrat Foxp3+ intratumoral			
Présent	1		
Absent	1.96	[1.08-3.57]	0.02
Infiltrat Foxp3+ péri-tumoral			
Présent	1		
Absent	1.20	[0.65-2.22]	0.55

- **Paramètres immunologiques**

Les résultats des différents paramètres immunologiques étudiés en analyse univariée sont résumés dans le **tableau 4**.

Parmi ces paramètres, seule une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+ ($p=0.00028$) et T régulateurs Foxp3+ ($p=0.02$) était associée à une meilleure survie sans récurrence.

La **figure 1** représente les courbes de survie sans récurrence des patients selon la densité en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ au sein de la métastase hépatique.

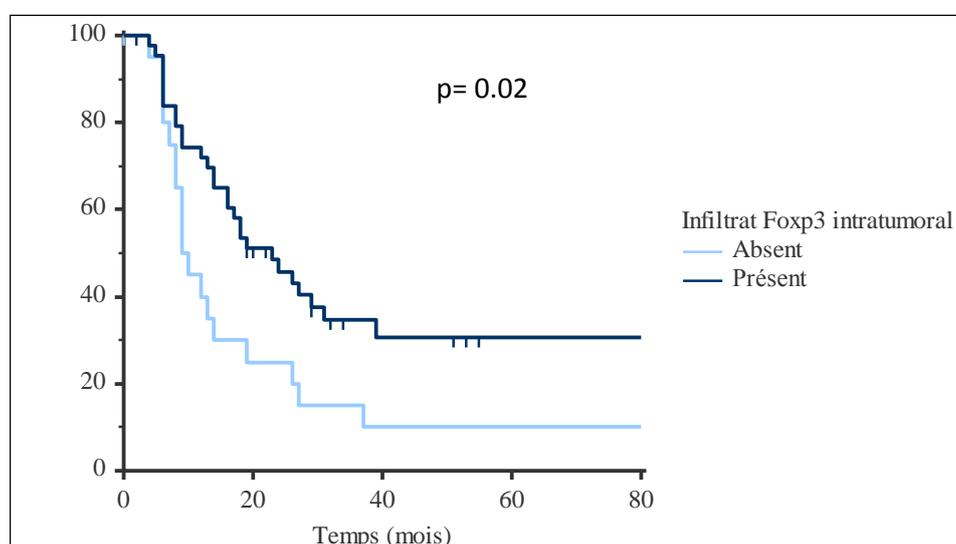


Figure 1 : survie sans récurrence des patients opérés à visée curative de métastases hépatiques de cancers colorectaux selon la densité intratumorale en lymphocytes T régulateurs Foxp3+.

Les figures 2a et 2b représentent les courbes de survie sans récurrence selon la densité intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+. Plus ces derniers sont abondants au sein de la métastase hépatique et plus le pronostic des patients en terme de survie sans récurrence est favorable. Dans la figure 2a, l'infiltrat en lymphocytes T mémoires a été réparti en 4 groupes de densité croissante en lymphocytes T CD45RO+, allant de 0 (absence de cellules) à 3 (forte infiltration mimant un organe lymphoïde).

Dans la figure 2b, l'infiltrat intratumoral en lymphocytes T mémoires a été réparti en 2 groupes : le premier regroupe les faibles densités en lymphocytes T CD45RO+ (groupes 0 et

1 de la figure 2a) ; le deuxième regroupe les fortes densités en T mémoires (groupes 2 et 3 de la figure 2a).

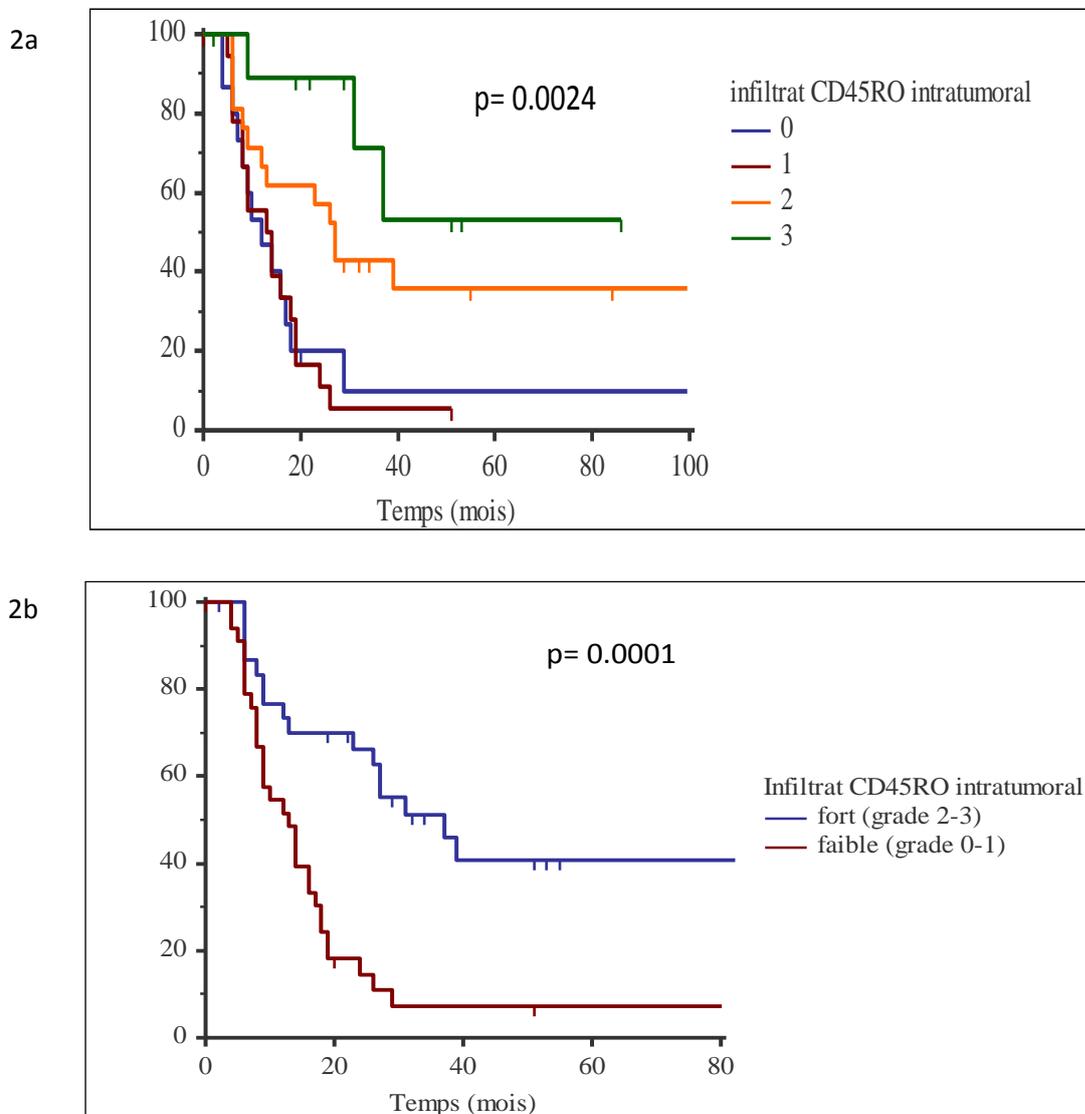


Figure 2a et 2b : survie sans récurrence selon la densité intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+.

b) Analyse multivariée

En analyse multivariée, les 2 facteurs restant indépendamment associés à une meilleure survie sans progression sont une marge chirurgicale supérieure à 1 cm ($p=0,013$) et une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+ ($p=0.00032$). L'ensemble

des résultats est illustré dans le **Tableau 5**. Un faible taux de LDH et une forte infiltration en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ ne sont plus significatifs, avec une valeur de p respectivement de 0,241 et 0,071.

3. Survie globale

En analyse univariée, les 3 facteurs associés à un meilleur pronostic en termes de survie globale sont une marge chirurgicale supérieure à 1 cm, un faible taux de LDH et une forte densité intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+.

En analyse multivariée, ces 3 paramètres restent indépendamment associés à la survie globale (**Tableau 6**), avec $p = 0,008$ pour une marge chirurgicale supérieure à 1cm, $p < 0,0001$ pour un faible taux de LDH et $p = 0,00037$ pour une densité élevée en lymphocytes T mémoires CD45RO+.

Tableau 5 : Analyse multivariée (régression de Cox), facteurs associés à la survie sans récurrence

	HR	IC 95%	p-value
Marge chirurgicale			
Plus de 1 cm	1		
Moins de 1 cm	2.22	[1.18-3.98]	0.013
Taux de LDH			
	1		
	1.0012	[0.9992-1.0032]	0.241
Infiltrat CD45RO intratumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	3.39	[1.74-6.58]	0.00032
Infiltrat Foxp3 intratumoral			
Présent	1		
Absent	1.83	[0.94-3.57]	0.071

Tableau 6: Analyse multivariée (régression de Cox) : facteurs associés à la survie globale

	HR	IC 95%	p-value
Marge chirurgicale			
Plus de 1 cm	1		
Moins de 1 cm	2.74	[1.31-5.78]	0.008
Taux de LDH			
	1		
	1.0034	[1.0017-1.0051]	< 0.0001
Infiltrat CD45RO intratumoral			
Fort (2-3)	1		
Faible (0-1)	3.81	[1.83-7.96]	0.00037

Les **figures 3a et 3b** représentent les courbes de survie globale selon la densité intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+. Comme précédemment, l'infiltrat en lymphocytes T mémoires réparti en 4 groupes de densité croissante en lymphocytes T CD45RO+, allant de 0 (absence de cellules) à 3 (forte infiltration mimant un organe lymphoïde), est représenté dans la figure 3a. Dans la figure 3b, les lymphocytes T mémoires intratumoraux ont été répartis en 2 groupes : le premier correspondant aux faibles densités en lymphocytes T CD45RO+ (groupes 0 et 1 de la figure 2a) ; le deuxième aux fortes densités en T mémoires (groupes 2 et 3 de la figure 2a).

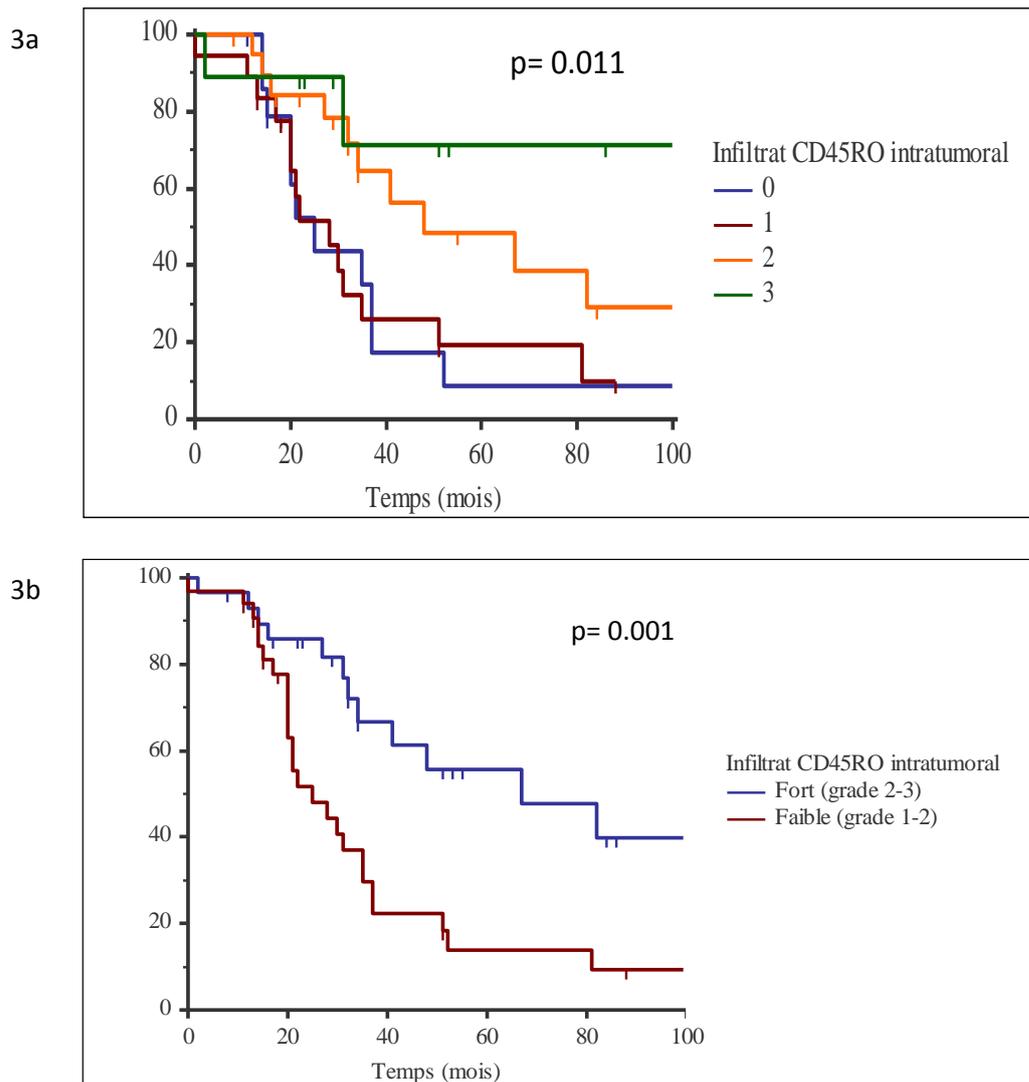


Figure 3 : survie globale selon la densité intratumorale en lymphocytes T mémoires.

4. Association lymphocytes T mémoires et T régulateurs

Le rôle pronostic en termes de survie sans récurrence d'une infiltration intratumorale en lymphocytes T régulateurs apparaît en analyse univariée, mais n'est plus significatif en analyse multivariée. Le test de corrélation entre l'infiltrat intratumoral en lymphocytes T régulateurs et en lymphocytes T mémoires étant négatif (Foxp3/CD45RO : $R = 0,23$ ($p=0,07$)), il est donc possible d'associer ces paramètres. Ceci permet de définir 3 groupes de patients en termes de survie sans récurrence (**Figure 4**). Plus la densité de ces 2 populations lymphocytaires est élevée au sein de la tumeur et plus le risque de récurrence semble faible. Au

contraire, une faible densité en lymphocytes T CD45RO+ et Foxp3+ est associée à un risque élevé de récurrence. Le groupe intermédiaire correspond aux patients ayant soit une forte densité en CD45RO+ mais une faible densité en Foxp3+, soit inversement une forte densité en Foxp3+ et une faible densité en CD45RO+.

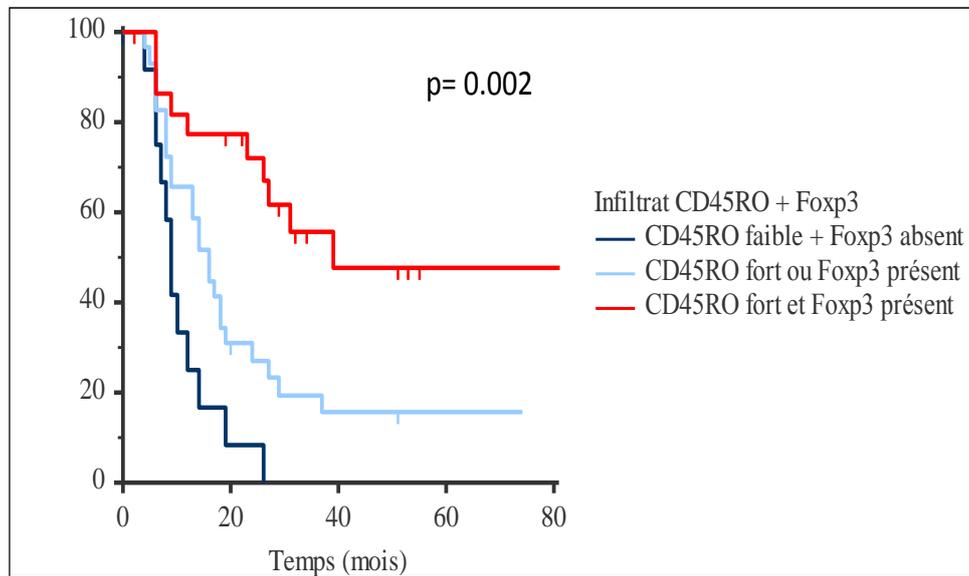


Figure 4 : survie sans récurrence selon l'association entre la densité intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+ et en lymphocytes T régulateurs Foxp3+.

C. DISCUSSION

1. Infiltrats lymphocytaires T CD8+, Foxp3+, CD45RO+ et cancers

a) CD8+ et CD45RO+

L'existence d'une immunité anti-tumorale ainsi que son rôle dans le développement tumoral sont maintenant clairement établis. L'implication, notamment pronostique du système immunitaire a été particulièrement étudiée dans le cancer colorectal. Les premières études rapportant un rôle pronostic favorable de l'infiltration tumorale par des lymphocytes T (TILs : Tumor Infiltrating Lymphocytes) dans les cancers colorectaux ont été publiées il y a près de 20 à 30 ans^{306, 307}.

En 1998, l'équipe de Naito a démontré le rôle essentiel des cellules T CD8+ infiltrant la tumeur pour prédire la survie sans récurrence et la survie globale des patients atteints d'un cancer colorectal. Ils ont ainsi analysé, chez 131 patients porteurs d'un cancer colorectal, l'infiltration tumorale en lymphocytes T CD8+, en différenciant 3 localisations : au sein même de la tumeur, sur le front d'invasion tumorale et en périphérie de la tumeur. En analyse univariée, une densité importante en CD8+ au sein de la tumeur était significativement associée à un meilleur pronostic de la maladie. Ces résultats ont été confirmés en analyse multivariée. De plus, il existait une corrélation inverse entre l'infiltrat en CD8+ au sein de la tumeur et la classification de Duke : une forte densité en CD8+ intratumorale était plus fréquente dans les stades A et B. L'ensemble de ces données était donc en faveur de la prise en compte de l'infiltrat au sein de la tumeur en CD8+ en tant que nouveau facteur pronostic dans le cancer colorectal⁴⁹. Ces données ont par la suite été confirmées par d'autres équipes, notamment celles de Galon et Pagès. Dans une étude publiée en 2005, ces derniers ont étudié la valeur pronostique de la réponse immunitaire au sein de cancers du côlon localisés en étudiant l'infiltration des lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes T mémoires CD45RO+ au sein de la tumeur primitive. Ils ont par la suite corrélié ces résultats à l'existence de signes précoces de dissémination métastatique : présence d'embolie vasculaire (VE), d'invasion lymphatique (LI) et d'infiltration périneurale (PI) ; ces trois dernières entités étant regroupées sous le terme général VELIPI. Ils ont ainsi montré à partir d'une cohorte de 959 patients présentant des tumeurs colorectales à différents stade de la classification TNM,

avec présence ou absence de VELIPI et un suivi clinique de plus de 15 ans, la valeur pronostique péjorative de la présence de VELIPI. Les patients ne présentant aucun signes précoces d'invasion métastatique (VELIPI -) dans la tumeur primitive avaient une survie sans récurrence et une survie globale plus longue que les patients présentant des signes précoces d'invasion métastatique (VELIPI +) ($p < 0,001$). Les auteurs ont ensuite analysé, sur 75 tumeurs sélectionnées au hasard, la nature des cellules immunes infiltrant la tumeur primitive en cytométrie en flux et en immunohistochimie sur des coupes de tumeur incluses en paraffine, et ont corrélé ces données avec le statut VELIPI de la tumeur. Ils ont ainsi établi qu'un niveau élevé d'expression des gènes associés à une polarisation Th1 (T-bet, IFN gamma) de la réponse immune et à une fonction effectrice cytotoxique (CD8 α , granzyme B et granulysine) étaient associés à l'absence de signes précoces d'invasion métastatique (VELIPI -). Il n'existait par contre aucune corrélation entre le statut VELIPI de la tumeur et l'orientation Th2 (GATA 3) ou les marqueurs de l'inflammation (IL8, VEGF, metalloprotéinase 7, cyclooxygénase 2). Cette étude a été complétée par l'analyse détaillée de l'infiltrat immunologique tumoral de 39 tumeurs. Ils ont ainsi pu confirmer qu'une forte infiltration tumorale en CD8+ était corrélée à l'absence de signes précoces d'invasion tumorale (VELIPI+) et à un meilleur pronostic. De façon inverse, les patients présentant une invasion tumorale à distance présentaient une densité significativement plus basse en cellules T CD8+. L'ensemble de ces données montre donc une corrélation significative entre une orientation de la réponse immunitaire favorable à une réponse antitumorale, c'est-à-dire une différenciation Th1 avec des composants mémoires et cytotoxiques, et l'absence de signes microscopiques précoces de dissémination tumorale à distance ⁵².

Dans une étude complémentaire publiée en 2009, la même équipe a démontré la valeur pronostique en termes de survie sans récurrence et de survie globale de l'infiltrat en CD8+ et en lymphocytes T mémoires CD45RO+. Ils ont ainsi étudié une cohorte de 411 patients présentant des cancers colorectaux de stades I et II, et ont déterminé la densité en CD45RO+ et CD8+ au sein de la tumeur et au niveau du front d'invasion tumoral. Ils ont par la suite corrélé ces densités au devenir des patients. Les patients ayant une forte infiltration intra et péri-tumorale en CD8+ et CD45RO+ présentaient moins de récurrence et avaient une meilleure survie globale. Ainsi, l'évaluation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et des cellules T

mémoires CD45RO+ au sein de la tumeur et au niveau du front d'invasion semble donc en plus constituer un facteur pronostique en terme de survie et de récurrence⁵⁰.

Dans ces 2 études, l'analyse de l'infiltrat immunologique au sein des tumeurs primitives semble être un facteur pronostique plus pertinent que les critères utilisés en pratique courante, tels que la classification TNM ou l'envahissement ganglionnaire pour la prédiction de la récurrence métastatique et permettrait potentiellement ainsi une meilleure détermination de la population éligible à une chimiothérapie adjuvante^{50, 52}.

Plus récemment, l'équipe de Nosho a étudié la valeur pronostique, dans le cancer colorectal, des sous populations lymphocytaires (CD3+, CD8+, Foxp3+ et CD45RO+) infiltrant les tumeurs coliques d'une large population de patients (N=768). Leur analyse démontre qu'une densité élevée de lymphocytes T mémoires CD45RO+ est significativement associée à un meilleur pronostic, et ce de façon indépendante des paramètres pronostiques usuels cliniques, anatomopathologiques et moléculaires. Ils confirment donc que la densité de CD45RO+ sur le front d'invasion tumoral semble être un biomarqueur pronostic déterminant dans le cancer colorectal²⁹⁹.

Les mêmes données avaient été rapportées préalablement par l'équipe de Salama en 2009. Ces derniers ont étudié l'infiltrat tumoral immun de 967 cancers colorectaux dont 593 présentaient un stade II et 374 un stade III. Leurs résultats confirment que la densité en cellules T mémoires CD45RO+ était plus faible chez les patients présentant des signes précoces d'invasion tumorale, c'est-à-dire une invasion vasculaire ou périneurale. En analyse univariée, de fortes densités intra tumorales en T CD45RO+ et T CD8+ étaient corrélées à un bon pronostic²⁹⁷.

Si de nombreuses études se sont donc intéressées à la corrélation entre l'infiltration tumorale immunologique et le pronostic des cancers colorectaux localisés, peu de données sont disponibles concernant cette même relation au sein des métastases, notamment hépatiques, des cancers colorectaux. Toutefois, une étude récente publiée en 2011 par l'équipe d'Halama³⁰⁷ a mis en évidence une association significative entre l'infiltrat immunologique au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux et la réponse à la chimiothérapie chez ces patients. Les tumeurs secondaires hépatiques de 101 patients présentant un cancer colorectal stade IV avec métastases hépatiques, et traités par chimiothérapie, ont été analysées. L'analyse de l'infiltrat immunologique a été réalisée au

niveau du front d'invasion tumorale des métastases hépatiques, après exérèse chirurgicale ou biopsie, avec quantification des T CD3+, CD8+, Foxp3+, ainsi qu'une quantification des lymphocytes exprimant le granzyme B. Les patients qui présentaient une densité élevée en CD3+, CD8+ et granzyme B avaient un meilleur pronostic que ceux dont la densité en CD3+, CD8+ et granzyme B était faible, avec une survie sans progression significativement plus longue³⁰⁸.

Les résultats de notre étude ne mettent pas en évidence de rôle pronostic de l'infiltrat intratumoral en lymphocytes T CD8+, qui reste en analyse univariée à la limite de la significativité, ceci pouvant peut être s'expliquer par le faible effectif de notre étude. Toutefois, nos résultats soulignent l'importance pronostique d'une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+, associée de façon indépendante en analyse multivariée à une meilleure survie globale et sans progression. Ces résultats confirment le rôle pronostic majeur de l'infiltrat en lymphocytes T mémoires au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux, ce qui avait été jusqu'alors décrit uniquement pour la tumeur primitive. L'absence de significativité au sein des métastases de l'infiltrat en lymphocytes T CD8+ mérite d'être confirmée sur une plus large population.

b) Lymphocytes T régulateurs Foxp3+

Dans leur étude publiée en 2009, l'équipe de Salama a également démontré qu'une forte densité intra tumorale en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ était associée à un pronostic favorable, cette donnée se confirmant en analyse multivariée chez les patients avec un cancer au stade III²⁹⁷.

La notion d'une relation positive entre une infiltration tumorale importante en Tregs et un pronostic favorable chez des patients porteurs d'un cancer colorectal est assez inattendue. En effet, en oncologie fondamentale et clinique, les cellules T Foxp3+ sont généralement considérées comme l'une des populations clé du microenvironnement tumoral immunosuppresseur, capable de supprimer la réponse immune anti-tumorale et ainsi de favoriser la croissance et la dissémination tumorale. Initialement, leur présence a systématiquement été associée chez l'homme à un mauvais pronostic tumoral. L'équipe de Curiel a été la première à décrire un nombre élevé de lymphocytes T Foxp3+ dans l'ascite de

femmes porteuses de cancer de l'ovaire et à le corrélér au stade de la maladie et à un mauvais pronostic²⁹⁶. Ceci a par la suite été confirmé dans d'autres tumeurs solides, comme dans les cancers de l'œsophage et de l'estomac, par l'équipe d'Ichihara en 2003 : la densité en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ dans le sang de 20 patients porteurs d'un cancer de l'estomac, de 10 patients présentant un cancer de l'œsophage et de 16 patients indemnes de pathologie tumorale a été étudiée. Une augmentation significative des lymphocytes Treg dans le sang des patients présentant une tumeur, que ce soit de l'estomac ou de l'œsophage, comparé au groupe témoin a été mise en évidence²⁹². Dans le carcinome hépatocellulaire, l'équipe d'Ormandy a étudié la proportion de Treg Foxp3+ chez 84 patients. Ils ont ainsi montré qu'une augmentation du nombre de ces cellules aussi bien au sein de la tumeur que dans le sang des patients était corrélée à une évolution défavorable²⁹¹. L'augmentation des Treg dans le sang circulant et au sein du microenvironnement tumoral a également été rapportée dans de nombreuses autres tumeurs comme le poumon³⁰⁹, le pancréas et le sein²⁹⁰.

Partant de la notion qu'un infiltrat tumoral riche en CD8+ était un facteur de bon pronostic alors que celui en Foxp3+ était un facteur de mauvais pronostic, il a par la suite été démontré l'importance du rapport CD8/Foxp3 dans différents types de tumeurs solides.

Dans une étude publiée en 2005, Sato et al ont étudié, chez 117 femmes présentant des tumeurs ovariennes, le rapport entre les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes Treg Foxp3+ infiltrant les tumeurs. Ils ont ainsi confirmé le meilleur pronostic des patientes présentant une forte infiltration tumorale en lymphocytes T CD8+. De plus, ils ont mis en évidence que les patientes ayant un faible rapport CD8+/CD4+ avaient un pronostic plus péjoratif comparé à celles ayant un ratio élevé. Les auteurs ont par la suite démontré que cet effet néfaste des CD4+ sur les CD8+ était dû aux Treg CD4+ CD25+ Foxp3+. Ainsi, le ratio CD8+/Treg infiltrant la tumeur influence le pronostic des cancers de l'ovaire³¹⁰. En 2007, Gao et al ont démontré la valeur pronostique du rapport CD8+/Foxp3+ infiltrant les carcinomes hépatocellulaires chez 302 patients. Ainsi ce rapport constitue un facteur prédictif indépendant de récurrence et de survie. L'association concomitante d'une absence de Treg et d'une forte infiltration en CD8+ représente un facteur de bon pronostic³¹¹. Dans une étude publiée en 2008, Ladoire et al ont évalué l'infiltration tumorale en lymphocytes T CD3+, CD8+ et Foxp3+ chez 56 patientes présentant un cancer du sein. La quantification de

la densité de l'infiltrat immunologique a été effectuée à l'initiation et à la fin d'un traitement par chimiothérapie néoadjuvante. Ils ont ainsi mis en évidence que la réponse pathologique complète était associée à un profil immunologique associant l'absence de cellules immunosuppressives Foxp3+ à la présence de façon élevée de lymphocytes T CD8+ et de cellules cytotoxiques³¹².

L'étude publiée en 2009 dans le cancer colorectal par l'équipe de Salama, a été ainsi la première à démontrer qu'une forte infiltration intra tumorale en Foxp3+ pouvait avoir une signification pronostique favorable dans cette variété de tumeur. L'ensemble des données publiées dans la littérature suggère donc qu'une forte infiltration en cellules T CD8+, CD45RO+ et Foxp3+ a un rôle pronostic favorable dans le cancer colorectal^{52, 297, 298}. Toutefois, il n'existe actuellement que très peu de données concernant le rôle pronostic de l'infiltrat en lymphocytes T régulateurs au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux. Le travail de l'équipe d'Halama s'était également intéressé à l'infiltration tumorale en Treg chez les patients recevant une chimiothérapie : la densité des lymphocytes T régulateurs Foxp3+ n'était pas significativement associée à un pronostic favorable, leur distribution n'étant pas différente chez les répondeurs et chez les non répondeurs à la chimiothérapie³⁰⁸.

Dans notre étude, le rôle pronostic favorable en termes de survie sans récurrence d'une infiltration intratumorale en lymphocytes T régulateurs apparaît en analyse univariée. Ainsi, pour la première fois, nos résultats soulignent que le rôle favorable d'une forte infiltration en lymphocytes T régulateurs n'existerait pas seulement au sein de la tumeur primitive, mais également au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux. De plus, ce paramètre associé à l'importance de l'infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires, permet de définir 3 groupes de patients en termes de survie sans récurrence : plus la densité des 2 populations lymphocytaires est élevée au sein de la tumeur et plus le risque de récurrence semble faible, et à l'inverse, plus la densité en lymphocytes T CD45RO+ et Foxp3+ est faible et plus le risque de récurrence est élevé.

L'étude de ces 2 populations lymphocytaires au sein des métastases hépatiques pourrait donc constituer un facteur pronostic en termes de survie globale et de survie sans récurrence. Toutefois, la mise en évidence d'un rôle favorable d'une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T régulateurs Foxp3+, au sein des métastases hépatiques, soulève, comme pour

la tumeur primitive, la question du mécanisme immunologique pouvant expliquer ce phénomène.

2. Hypothèses expliquant le rôle pronostic favorable des Treg dans le cancer colorectal

a) Les cellules Foxp3+ infiltrant les tumeurs colorectales correspondent-elles bien à des lymphocytes T régulateurs aux fonctions immunosuppressives ?

Dans la littérature, les cellules Foxp3+ infiltrant les cancers colorectaux sont considérées comme des lymphocytes T régulateurs. Cependant, le caractère spécifique de Foxp3 vis-à-vis de la population T régulatrice a récemment été remis en question chez l'homme³¹³.

Initialement, les Treg ont été décrits comme une sous population fonctionnellement distincte des cellules T CD4+, exprimant fortement CD25 et pouvant prévenir l'auto-immunité ainsi que contrôler l'immunité tumorale. Les anticorps anti Foxp3 marquent non seulement les cellules CD4+ CD25+ mais également les lymphocytes T CD8+ CD25+, qui sont présents dans les cancers colorectaux³¹⁴. Toutefois, il a été démontré que les cellules T CD8+ CD25+ Foxp3+ représentent seulement une fraction minime des cellules Foxp3+ infiltrant ces cancers. Ainsi, lorsque des coupes de tissus issus de cancers colorectaux sont doublement marquées avec des anticorps dirigés contre Foxp3 et CD8 ou CD4, la majorité des cellules Foxp3+ expriment CD4 et très peu CD8^{315, 316}. De plus, ces cellules T CD8+ CD25+ Foxp3+ exercent également des fonctions suppressives sur la réponse immune anti tumorale, de la même façon que les lymphocytes T CD4+ CD25+ Foxp3+³¹⁴.

L'expression de Foxp3 chez l'homme n'est pas uniquement confinée aux cellules Treg fonctionnelles. Foxp3 peut également être transitoirement exprimé par des cellules T effectrices conventionnelles activées, CD4+ CD25+³¹⁷. Très peu d'études dans la littérature se sont intéressées aux propriétés fonctionnelles de ces cellules T Foxp3+. Cependant, une étude a démontré que les cellules T CD4+ Foxp3+ isolées des cancers colorectaux ont la capacité de supprimer la prolifération des cellules T et la production d'IFN gamma³¹⁸. De façon intéressante, dans une étude réalisée dans un modèle murin de polyposé intestinale, les lymphocytes T CD4+ CD25+ étaient capables d'induire la régression des tumeurs

intestinales³¹⁹, soulevant donc la possibilité d'un rôle plus large des Tregs dans les cancers colorectaux.

Pris ensemble, en apparence contradiction avec leur rôle pronostic favorable dans le cancer colorectal et ses métastases hépatiques, ces résultats mettent en évidence qu'une large majorité de cellules T Foxp3+ infiltrant ces cancers sont bien des Tregs fonctionnels, suppresseurs, pouvant plutôt diminuer que favoriser la réponse immunitaire.

b) cause septique

Une des grandes particularités du cancer colorectal par rapport à presque toutes les autres localisations tumorales, est qu'il se développe au sein d'un environnement riche en bactéries. En effet, chez l'homme, en dehors de tout contexte pathologique, l'intestin contient plus de 500 différents types de micro-organismes, et le côlon plus de 10^{13} bactéries³²⁰. La muqueuse intestinale constitue une barrière de défense naturelle entre l'organisme et le monde extérieur.

A sa surface se trouve une monocouche de cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées. Cette barrière limite l'accès de la flore intestinale à la muqueuse avec l'aide du système lymphoïde et des cellules myéloïdes, accumulées dans la lamina propria ou infiltrées entre les cellules épithéliales. Dans le cas des tumeurs colorectales, de multiples espèces bactériennes sont présentes en quantité beaucoup plus importante dans les tumeurs³²¹. La translocation bactérienne à travers la surface de la muqueuse est fréquente dans les cancers colorectaux. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la perte d'adhésion intercellulaire des cellules tumorales et par la nécrose ou les ulcérations présentes à la surface de la tumeur³²².

De nombreuses bactéries présentes dans l'intestin sont connues pour entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires^{323, 324}. Elles ont des effets proangiogéniques³²⁵ et favorisent la croissance tumorale par l'activation de facteur de transcription comme NFκB ou STAT3^{326, 327 328}. A la différence d'autres carcinomes dans lesquels les cellules T infiltrant la tumeur sont spécifiques d'antigènes tumoraux, les lymphocytes T infiltrant les cancers colorectaux pourraient être plus spécifiques de la microflore commensale de l'intestin.

Les travaux réalisés par l'équipe d'Erdman dans des modèles murins de cancers colorectaux ont permis d'établir des données importantes concernant les interactions entre flore bactérienne gastrointestinale, cancer colorectal et Treg. Ils ont ainsi démontré que des souris déficientes en cellules T étaient beaucoup plus susceptibles de développer une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, et par la suite un cancer colorectal, après une contamination microbienne. Le transfert adoptif de cellules Treg chez ces souris est capable de prévenir l'inflammation due aux bactéries ainsi que la carcinogénèse^{329, 330, 331, 332}. Ainsi, en supprimant l'inflammation et la réponse immune résultant de l'invasion bactérienne, les Treg Foxp3+ pourraient, en fait, avoir un rôle antitumoral dans le cancer colorectal, ce qui pourrait également expliquer la relation entre leur abondance dans la tumeur et leur pronostic favorable^{321, 333}.

De façon intéressante, le cancer colorectal n'est pas la seule localisation tumorale où les lymphocytes T régulateurs sont associés à un pronostic favorable, puisque une relation identique a également été mise en évidence dans les cancers de la tête et du cou. Chez 84 patients présentant un carcinome épidermoïde non traités de la tête ou du cou, une forte infiltration en cellules T CD4+ Foxp3+ a été associée à un meilleur contrôle tumoral local, mais sans pour autant influencer la survie globale³³⁴. Un marquage immunohistochimique a également été réalisé sur 106 biopsies prélevées chez des patients présentant un carcinome nasopharyngé venant d'être diagnostiqué, et dont 47% avaient des antigènes EBV+. Dans cette étude, une forte densité en cellules T était corrélée à une meilleure survie³³⁵. La densité en cellules T Foxp3+ infiltrant la tumeur était associée à une meilleure survie globale et sans progression, et inversement associée au stade tumoral.

Les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes indifférenciés nasopharyngés représentent 2 types différents de cancer de la tête et du cou, dont les facteurs favorisants sont respectivement, l'alcool - le tabac et l'infection virale EBV. Cependant, les 2 types de cancer surviennent dans la cavité buccale, exposée de façon permanente à des agents microbiens, même en condition physiologique, ce qui est également le cas des cancers colorectaux. De plus, la contamination par des pathogènes semble jouer un rôle dans la carcinogénèse et la progression tumorale dans ces cancers de la tête et du cou³³⁶.

L'ensemble de ces données pourrait donc être en faveur d'une explication septique au pronostic favorable des Treg dans les cancers colorectaux. Toutefois, si cette explication

semble rationnelle dans le cas de la tumeur primitive, cela l'est beaucoup moins concernant ses métastases hépatiques. En effet, nous avons mis en évidence dans notre étude, la persistance d'une association significative entre l'infiltration en Tregs Foxp3+ et un pronostic favorable, au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux. Or, à la différence du tube digestif, le parenchyme hépatique est un environnement aseptique, où il n'existe aucun germe, aucune bactérie pouvant étayer cette hypothèse. Ainsi l'explication septique semble, à elle seule, ne pas pouvoir donner une explication à cet effet paradoxal de l'infiltrat en Treg dans le cancer colorectal.

A la lumière de nos résultats, nous pouvons soumettre une autre hypothèse, celle de la mémoire immunologique. En effet, nous avons mis en évidence l'existence d'une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires CD45RO+ au sein de la métastase hépatique ainsi que son rôle pronostic favorable. Il est donc possible que la réponse immune développée initialement au niveau de la tumeur primitive colique persiste sous forme d'une réponse immunitaire antitumorale mémoire.

Ceci pourrait donc expliquer le fait que l'on retrouve au sein des métastases hépatiques les mêmes résultats en termes de facteur pronostic d'une forte infiltration en Foxp3+ et CD45RO+. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une comparaison quantitative et qualitative des différents infiltrats lymphocytaires entre la tumeur primitive et sa métastase hépatique.

c) Implication thérapeutique du rôle favorable d'une forte infiltration en Treg Foxp3+

Les lymphocytes T régulateurs étant associés à un pronostic défavorable dans de nombreux types de tumeurs solides, des thérapies anticancéreuses basées sur leur diminution ont été étudiées, partant du principe que leur élimination pourrait permettre de rétablir l'efficacité des biothérapies. Ainsi, l'équipe de François Ghiringhelli a restauré l'efficacité de l'immunothérapie dans des modèles tumoraux murins après élimination des Tregs par de petites doses de cyclophosphamide⁸⁶. Ce même phénomène a été observé chez l'homme, dans de petites études cliniques, en association avec des vaccins^{337, 338}.

Dans d'autres essais cliniques, la déplétion en Treg dans des cancers humains a été obtenue en utilisant soit des anticorps monoclonaux humanisés anti CD25 (Dalizumab)³³⁹, soit une protéine de fusion entre l'IL-2 humain et la toxine diphtérique (denileukin diftitox)^{340, 341}. Ces essais ont permis de mettre en évidence une déplétion sélective des lymphocytes Tregs circulants. Il est également intéressant de noter que ces traitements éliminant les Treg étaient relativement bien tolérés chez des patients considérés en échec de toutes les autres thérapies anticancéreuses. Même si aucun bénéfice majeur clinique n'a été clairement observé, il faut garder en considération le faible nombre de patients enrôlés dans chaque essai, ainsi que le fait que chacun présentait un stade très avancé de sa maladie.

L'observation inattendue qu'une infiltration tumorale importante en Treg Foxp3+, que ce soit au sein de la tumeur principale ou au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux, pouvait être associée à un pronostic favorable pose la question de la stratégie de l'immunothérapie dans ces tumeurs. En effet, l'objectif ne serait peut-être plus de diminuer, voire d'éliminer cette population cellulaire, mais au contraire de la favoriser. Toutefois, une telle attitude ne peut s'envisager qu'une fois que les mécanismes immunologiques expliquant le rôle positif des lymphocytes T régulateurs dans le cancer colorectal et au sein de ses métastases hépatiques seront élucidés. Ainsi, à l'heure actuelle, il n'y a pas d'information suffisante pour définir l'effet clinique d'une thérapie ciblant les Treg chez des patients présentant un cancer colorectal, localisé ou métastatique hépatique.

d) Infiltration immunologique et phénotype MSI

La connaissance du statut MSI est un facteur moléculaire pronostique intéressant dans le cadre des cancers colorectaux de stade II et III. En effet, il permet de différencier des patients pouvant être traité de façon uniquement chirurgicale, ne retirant pas de bénéfice d'un traitement adjuvant. Environ 15% des cancers colorectaux présentent une instabilité microsatellitaire. Différentes études ont mis en évidence qu'une forte infiltration en lymphocytes au sein de la tumeur était associée au statut MSI dans les cancers colorectaux^{342, 343}. Les mutations secondaires au statut MSI + entraîneraient la production d'un grand nombre de peptides antigéniques, expliquant ainsi la densité en lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux beaucoup plus élevée que dans les tumeurs MSI^{-344, 345}.

Une étude publiée en 2010 a mis en évidence qu'une forte infiltration en CD45RO+ et Foxp3+ au sein de la tumeur était significativement associée au statut MSI de la tumeur (MSI+). Cette association n'était pas mise en évidence pour les CD3+ et les CD8+²⁹⁹.

Notre étude concerne l'infiltration immunologique au sein de métastases hépatiques de cancers colorectaux. Il s'agit donc de patients présentant déjà une localisation à distance, et n'ayant donc pas un pronostic initial favorable. Toutefois, il serait intéressant d'étudier au sein de notre population de malades, le statut MSI de la tumeur primitive et de le corrélérer à la nature de l'infiltrat lymphocytaire retrouvé au sein de la métastase hépatique.

e) Valeur de la localisation des cellules de la réponse immune anti tumorale

Une des différences importante mise en évidence dans notre étude par rapport à ce qui a déjà été décrit dans la tumeur principale concerne la localisation dans la métastase de l'infiltrat immunologique ayant une valeur pronostic.

En effet, lorsque l'on étudie l'infiltrat immunologique dans des tumeurs primitives ou métastatiques, on doit distinguer la densité en cellules immunitaires selon que l'on se trouve au centre de la tumeur ou à sa périphérie. En effet, le centre de la tumeur est le plus souvent nécrotique, plus pauvre en cellules tumorale et immunitaires. Au contraire, la périphérie de la tumeur, encore appelée front d'invasion tumorale, correspond à la zone où les cellules tumorales sont au contact du tissu sain et des cellules de l'immunité anti-tumorale.

Dans son étude publiée en 2006, l'équipe de Galon a étudié le rôle pronostic de l'infiltrat immunologique en cellules T CD3+, CD8+ et CD45RO+ au centre et en périphérie de 415 tumeurs colorectales. Ils ont ainsi mis en évidence que les patients qui ne présentaient pas de récurrence avaient des densités plus importantes en cellules immunes (CD3+, CD8+ et CD45RO+) que ce soit au centre ou en périphérie de la tumeur, par rapport aux patients qui présentaient des récurrences. Ainsi, pour chaque marqueur immunologique étudié et pour chaque localisation au sein de la tumeur (centre et périphérie), il existait une corrélation significative entre la densité en cellules immunes et le devenir des patients. Les patients avec une faible densité en CD3+ et CD45RO+ que ce soit au centre ou en périphérie de la tumeur avaient un plus mauvais pronostic⁵¹. Ces résultats ont été confirmés dans une étude publiée en 2009 par l'équipe de Pagès, où il existait une corrélation positive entre la densité en

cellules T CD45RO+ et T CD8+, que ce soit au centre ou en périphérie de la tumeur, et le devenir des patients⁵⁰.

Ces études sont donc en faveur du rôle pronostic en terme de récurrence et de survie globale de la détermination, au centre de la tumeur primitive et au front d'invasion tumoral, de la densité en lymphocytes T CD8+ et T CD45RO+.

Dans son étude publiée en 2011, l'équipe d'Halama a mis en évidence une association forte entre la nature de l'infiltrat immunologique en périphérie de métastases hépatiques de cancers colorectaux et le pronostic de réponse à la chimiothérapie. Dans cette étude, les auteurs n'ont étudié que l'infiltrat immunologique situé en périphérie de la métastase, considérant que la nécrose souvent présente au centre des tumeurs constituait une gêne à une évaluation objective³⁰⁸.

Notre étude est donc la première à s'être intéressée à la nature de l'infiltrat immunologique au sein de métastases hépatiques de cancers colorectaux, situé au centre et en périphérie de la métastase. Contrairement aux données de la littérature et à ce que l'on pourrait attendre, nos résultats n'ont pas mis en évidence de rôle pronostic de l'infiltrat immunologique situé en périphérie des métastases. Par contre, ils soulignent le rôle de l'infiltrat immunologique situé au sein des métastases, que ce soit pour les lymphocytes T mémoires ou les T régulateurs. Là encore, ces résultats méritent d'être confirmés sur une plus vaste population.

f) Infiltrats immunologiques et chimiothérapie

A l'heure actuelle, quelques travaux seulement ont mis en évidence une relation entre le type de chimiothérapie administrée et l'influence potentielle de celle-ci sur la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, dans le cancer du sein, l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante peut s'accompagner d'une diminution de la densité intratumorale en Treg : dans cette étude, les patientes présentant une réponse anatomopathologique complète après chimiothérapie étaient celles dont le taux de T Foxp3+ au sein de la tumeur était fortement diminué, alors que le taux de CD8+ restait élevé³¹².

Dans le cancer colorectal, le travail d'Halama évoqué plus haut a permis de mettre en évidence que les patients répondeurs à la chimiothérapie présentaient un infiltrat riche en

CD3+ et CD8+. Ils en ont déduit un score prédictif de réponse à la chimiothérapie, qu'ils ont confirmé chez 101 patients porteurs de métastases hépatiques de cancers colorectaux. Leurs résultats permettaient de prédire la réponse à la chimiothérapie avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 100%³⁰⁸.

Nous avons voulu étudier l'impact de la chimiothérapie sur la nature de l'infiltrat immunologique en lymphocytes T CD8+, CD45RO+ et Foxp3+ au sein des métastases hépatiques de cancers colorectaux. A cet égard, il est ainsi intéressant de noter que le 5 FU, chimiothérapie largement utilisée dans le cancer colorectal, semble avoir des effets anti-tumoraux médiés, au moins en partie, par une cytotoxicité portant sur les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), plutôt que sur les cellules T ou les cellules tumorales. En effet, chez la souris porteuse de tumeur, le traitement par 5FU entraîne une diminution majeure du nombre de MDSC dans la rate de l'animal et au sein de la tumeur, alors qu'aucun effet significatif n'est noté sur les cellules T, B ou NK³⁴⁶.

Les résultats observés dans notre étude ne mettent pas en évidence de différence qualitative ou quantitative des infiltrats immunologiques, que ce soit en péri ou en intratumoral, entre les patients ayant reçu une chimiothérapie pré-opératoire et ceux ayant été traités par résection chirurgicale seule. Il faut néanmoins garder en mémoire le faible effectif de nos populations, qui comptaient 26 patients dans le groupe chirurgie seule, et 40 dans le groupe chimiothérapie pré-opératoire. Dans ces conditions, il peut donc s'agir simplement d'un manque de puissance de l'essai. Il semble donc là encore nécessaire de confirmer ces résultats sur une population plus large de patients.

3. Perspective

a) Interaction entre Tregs et Th17 infiltrant les cancers colorectaux

Il a été récemment décrit une nouvelle ligne de différenciation des cellules T CD4+ helper, nommée Th17³⁴⁷. Les Th17 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription RORC, dépendant de STAT3. Comme pour les Treg, la différenciation des Th17 requiert la présence de TGF- β 1, mais, à la différence des Treg, les Th17 ont également besoin de la présence de l'interleukine 6 (IL-6). Les cellules Th17 constituent une lignée distincte de cellules CD4+ helper, et produisent la cytokine pro-inflammatoire IL-17, ce qui leur a valu leur appellation.

Dans des conditions physiologiques, la plupart des Th17 du tube digestif sont induits dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT), en réponse à la flore microbologique intestinale³⁴⁸. Ces cellules sont considérablement plus abondantes dans les cancers colorectaux que dans les autres types de cancer, tel que le cancer du sein ou le mélanome. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par la colonisation bactériologique. Cette dernière entraîne l'activation des cellules dendritiques par l'association des ligands des Toll-like récepteurs (TLR) ou par d'autres signaux bactériologiques^{349 350}, et ainsi la production d'IL-6. Le rôle précis des cellules Th17 infiltrant les tumeurs reste toujours controversé. Les Th17 assurent une protection contre les pathogènes extra cellulaires. Ils permettent en effet le recrutement de macrophages et de neutrophiles, ainsi que la production de cytokines et de protéines antibactériennes, prévenant donc la dissémination des pathogènes³⁵¹.

Cependant, les Th17 ont également un rôle pro-inflammatoire par la sécrétion de certaines cytokines, dont l'IL-17³⁵². L'IL-17 semble susceptible d'exercer un effet proangiogénique sur les cellules endothéliales et les fibroblastes en entraînant la sécrétion de VEGF et d'autres facteurs angiogéniques³²⁵. Du fait de leur activité pro inflammatoire et pro angiogénique, les Th17 ont principalement été décrits comme favorisant la croissance tumorale³⁵². En effet, la formation de néo vaisseaux permet la survie des cellules tumorales et est une condition *sine qua non* à la progression tumorale.

Une étude récente de l'équipe de Gallon a mis en évidence un rôle pronostic péjoratif d'une forte infiltration tumorale en Th17 chez les patients présentant un cancer colorectal,

contrastant avec le pronostic favorable des tumeurs présentant une forte infiltration en cellules cytotoxiques CD8+ et Th1³⁵³, et en Treg Foxp3+.

En effet, de façon intéressante, ce même travail a confirmé le pronostic favorable associé à une forte infiltration tumorale en cellules T exprimant Foxp3. Ainsi, la relation entre les Tregs et les cellules immunes pro inflammatoires Th17 pourrait être prise en considération afin d'expliquer le rôle pronostic favorable de l'infiltration tumorale en Tregs Foxp3+.

Les Tregs humains sont connus pour inhiber l'activation et la fonction non seulement des cellules T CD4+ effectrices Th1 et Th2, mais également des cellules Th17. En supprimant la capacité des Th17 à proliférer et à produire de l'IL17, et par la même en supprimant leur capacité pro inflammatoire et proangiogénique, les Tregs pourraient alors inhiber les effets protumorigènes des Th17³⁵⁴. Il nous semble donc tout à fait pertinent d'étudier l'infiltration en Th17 au sein de la tumeur ainsi que dans le micro environnement tumoral des métastases hépatiques des cancers colorectaux.

b) Rôle pronostic de l'IL-21.

Une autre cytokine pourrait avoir un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire antitumorale, il s'agit de l'interleukine-21. IL-21 est une cytokine de la famille des cytokines reconnues par le « gamma chain receptor » comme l'IL-2 et l'IL-15. Le récepteur de l'IL-21 est exprimé par les lymphocytes T, B et NK. L'IL-21 a été décrite par Li et al comme ayant une influence sur la réponse immunitaire T en modulant la polarisation lymphocytaire T notamment en activant les lymphocytes T CD8 à devenir cytotoxiques et à produire de l'interferon gamma. Par ailleurs l'IL-21 a un rôle dans la polarisation lymphocytaire T CD4 en orientant cette polarisation vers une différenciation de Th17 ou de lymphocytes T folliculaire³⁵⁵.

L'IL-21 est actuellement utilisée dans des essais cliniques pour le traitement du mélanome métastatique et du cancer du rein à cellules claires. Son action antitumorale semble liée à sa capacité d'activer les cellules CD8 et NK. Cette cytokine est produite essentiellement par les lymphocytes T CD4 activés ayant un phénotype Th1, T_{FH} ou Th17. Pour l'instant aucune donnée n'existe sur le rôle pronostic de cette cytokine dans les cancers coliques.

c) Etude de l'infiltration macrophagique des métastases hépatiques des cancers colorectaux

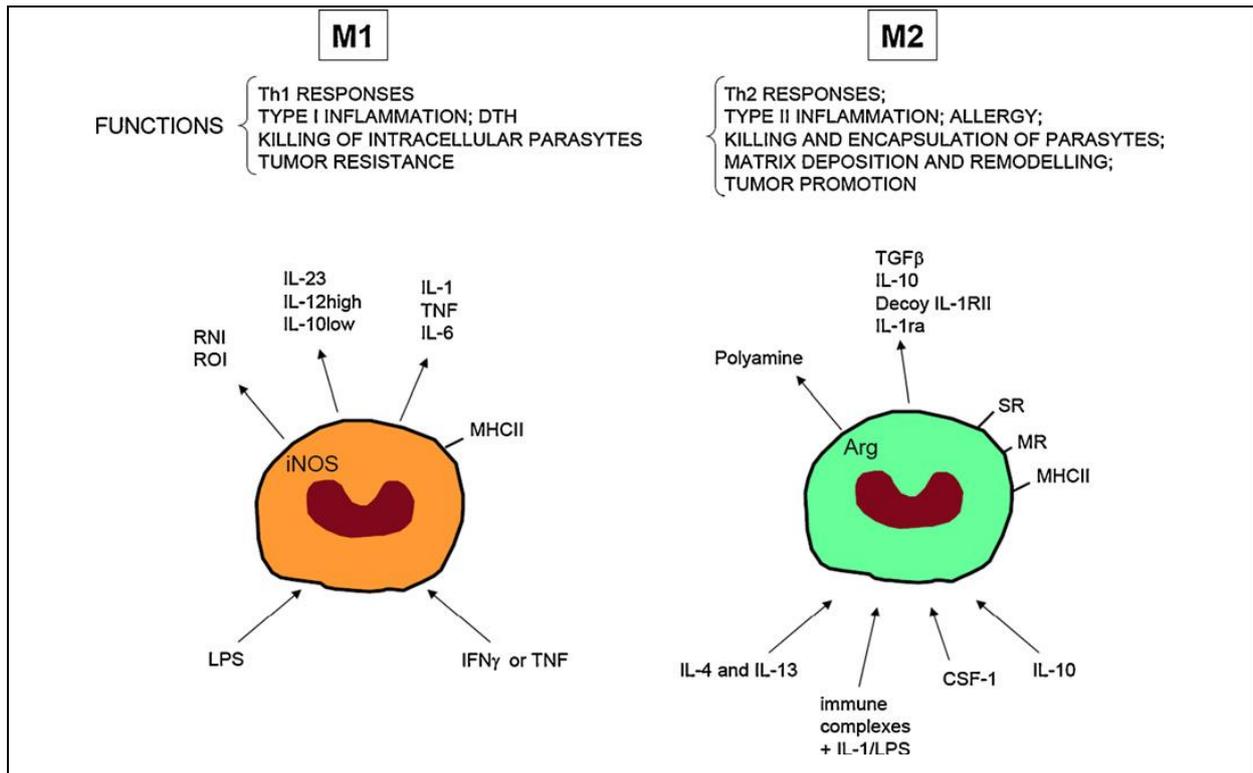
Les macrophages sont des effecteurs clés de la réponse immunitaire et jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ils sont également impliqués dans certaines conditions pathologiques, incluant le cancer.

Les macrophages sont des cellules appartenant au système phagocytaire. Ce dernier se compose des macrophages tissulaires, des cellules dendritiques, des monocytes circulants et des cellules myéloïdes progénitrices de la moelle osseuse³⁵⁶.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont des cellules régulatrices importantes du microenvironnement tumoral. Ils sont dérivés des monocytes sanguins, recrutés par la tumeur grâce à différents signaux tels que M-CSF (CSF-1), CCL2 (MCP-1), VEGF, et l'angiopietine 2. Plusieurs études mettent en évidence leur rôle dans différentes étapes clés du développement tumoral. En effet, il existe une corrélation positive entre une densité élevée en TAMs et un pronostic péjoratif dans différents cancers comme le cancer du sein, de la prostate et de la vessie. De plus, l'augmentation du nombre des TAMs in vivo dans des modèles murins entraîne une augmentation de la croissance tumorale³⁵⁷.

Le recrutement des monocytes est un des premiers événements survenant lors de l'apparition d'une tumeur, ces cellules étant détectées de façon précoce, aussi bien dans la lésion primitive que dans les lésions secondaires. Il est intéressant de noter que leur fonction est alors bivalente. En effet, dans les tumeurs, les macrophages peuvent avoir des fonctions cytotoxiques, empêchant la dissémination et la croissance tumorale, ou au contraire des effets immunosuppresseurs et proangiogéniques, favorisant la croissance tumorale. L'orientation vers telle ou telle fonction va essentiellement dépendre des signaux du microenvironnement tumoral.

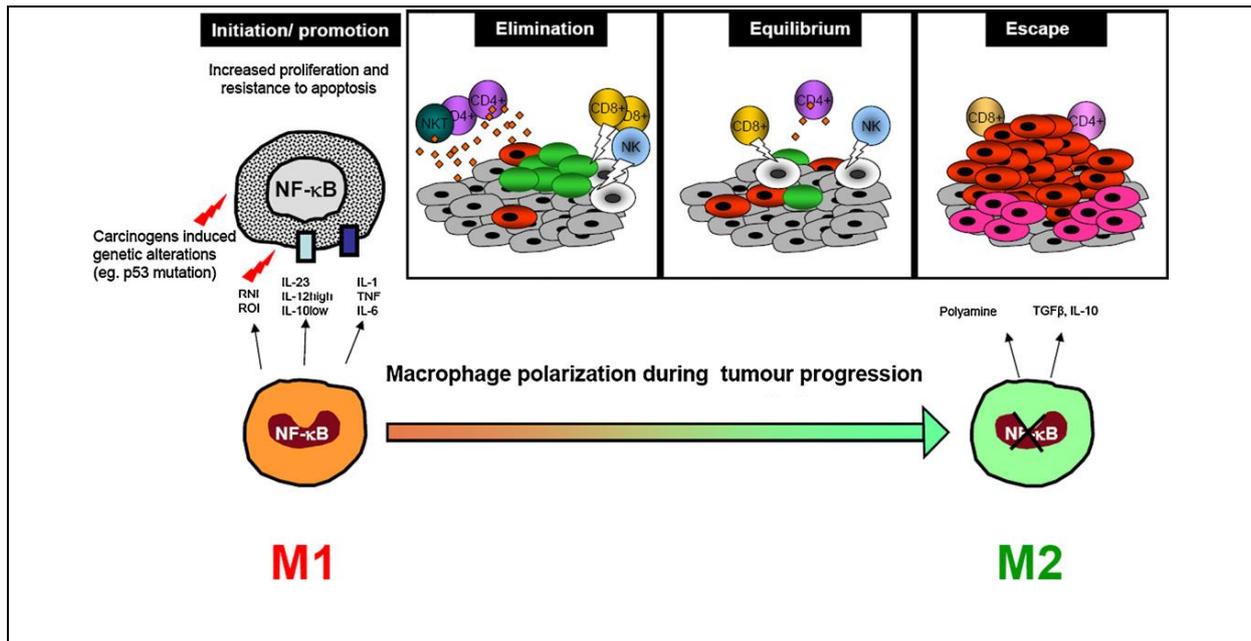
Les macrophages peuvent sécréter soit de l'IL-12 et favoriser une réponse Th1 (phénotype de macrophages M1), soit produire de l'IL-10 et orienter la réponse immune vers une réponse Th2 (phénotype de macrophages M2). Ainsi, les macrophages peuvent être polarisés par les différents signaux du microenvironnement tumoral en M1 et M2, et ainsi moduler la réponse immunitaire vers une réponse Th1 ou Th2.



Sica et al, Seminars in Cancer Biology, 2008

Durant la phase d'initiation tumorale, il existe plutôt une polarisation M1 alors que dans les tumeurs établies, la polarisation des macrophages est plutôt de type M2.

Il existe donc un changement progressif de la polarisation des macrophages de M1 à M2, parallèlement à une inhibition progressive de l'activité de NF κ B. Ces événements vont participer à la création d'un environnement favorable à la croissance tumorale et à sa dissémination.



Sica et al, Seminars in Cancer Biology, 2008

Un nombre élevé de TAMs dans le microenvironnement tumoral est associé à une augmentation de la vascularisation tumorale et des ganglions lymphatiques envahis dans les tumeurs chez l'homme⁹².

Il nous semble donc intéressant d'étudier la densité des TAMs au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux et dans le microenvironnement tumoral, afin de voir si comme dans d'autres tumeurs, leur augmentation est corrélée à un pronostic plus péjoratif.

CONCLUSION

PERSPECTIVES

III. CONCLUSION PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail a permis de mieux comprendre le rôle des MDSC dans l'évolution des cancers ainsi que l'effet immunologique du 5-fluorouracil.

Nous avons pu souligner pour la première fois que le 5-fluorouracil est capable d'induire la mort des MDSC. Le 5-fluorouracil cible spécifiquement les MDSC du fait de leur concentration en thymidylate synthase, l'enzyme cible du 5-fluorouracil. Ainsi le 5-fluorouracil se révèle être un très bon candidat comme drogue anti-immunosuppressive. Ces travaux nous ont permis aussi d'amorcer d'autres recherches en montrant que le 5-fluorouracil pourrait aussi avoir un effet délétère en induisant la production d'IL-1 et d'IL-17 protumorales.

D'un point de vue thérapeutique, ces données font poser la question d'associer le 5-fluorouracil avec une drogue immunogène comme l'oxaliplatine pour augmenter son activité immunologique. Une autre stratégie que nous sommes en train de tester est d'associer le 5-fluorouracil avec un inhibiteur de l'IL-1 dans le but d'augmenter son efficacité.

Pour le travail sur les infiltrats immunitaires des cancers coliques, notre étude est l'une des premières à mettre en évidence l'importance pronostique de la réponse immunitaire au sein des métastases hépatiques des cancers colorectaux, chez des patients opérés à visée curative. Des données similaires ont été observées par l'équipe de Ronald DeMatteo³⁵⁸ sur la population CD45RO. Nos résultats soulignent l'importance d'une forte infiltration en lymphocytes T mémoires CD45RO+, associée de façon indépendante en analyse multivariée à une meilleure survie globale et sans progression tumorale. Le rôle pronostic d'une infiltration intratumorale en lymphocytes T régulateurs en termes de survie sans récurrence apparaît en analyse univariée, et ce paramètre, associé à l'importance de l'infiltration intratumorale en lymphocytes T mémoires permet de définir 3 groupes de patients en termes de survie sans progression. Plus la densité de ces 2 populations lymphocytaires est élevée au sein de la tumeur et plus le risque de récurrence semble faible. A l'inverse, une faible densité en lymphocytes T CD45RO+ et Foxp3+ est associée à un risque élevé de récurrence. Nos résultats démontrent également l'importance de la marge d'exérèse chirurgicale comme facteur pronostic. En effet, lorsqu'elle est supérieure à 1 cm, elle est

associée de façon indépendante à une meilleure survie globale et sans progression. Un faible de taux de LDH est également un facteur pronostic indépendant de meilleure survie globale. Il sera important de valider ces résultats sur une deuxième série de patients et de valider l'automatisation de la lecture. Pour cela nous venons d'acheter le logiciel d'analyse d'image de DEFINIENS. Nous sommes en cours de validation de la technique et nous voulons savoir si les résultats sont reproductibles avec la lecture automatisées. Nous pensons aussi que ce travail pourrait avoir l'intérêt de définir une population qui ne bénéficie pas de la chirurgie hépatique. Cette hypothèse devra bien évidemment être testée dans un essai clinique prospectif.

Nos résultats concernant l'infiltrat immunologique au sein des métastases hépatiques sont comparables à ceux décrits au niveau de la tumeur primitive où une densité élevée en lymphocytes T mémoires et en T régulateurs est associée à un pronostic favorable. Cette nouvelle description d'un rôle pronostic favorable des T régulateurs dans le cancer colorectal soulève de nouveau la question du mécanisme par lequel ils sont associés à un bon pronostic dans ce type de cancer. Il ressort toutefois ici clairement que ce sont essentiellement les lymphocytes T mémoires qui jouent un rôle primordial pour prédire le devenir des patients. Il est intéressant de noter que la densité en lymphocytes T CD8+, largement décrite comme associée à un pronostic favorable au niveau de la tumeur primitive, ne ressort pas dans notre étude comme un facteur pronostic au sein de la métastase hépatique, puisqu'elle reste à la limite de la significativité. Ceci peut s'expliquer en partie par le faible effectif de patients impliqués dans notre étude. Toutefois, la différence majeure entre nos résultats et ceux préalablement publiés relatifs aux tumeurs coliques primitives concerne la localisation pronostique de l'infiltrat immunologique : en effet, contrairement à ce qui est décrit pour les tumeurs primitives, dans notre étude portant sur les métastases, ce sont les infiltrats lymphocytaires intratumoraux, et non péritumoraux, qui sont associés au pronostic.

Ainsi cette étude tend à démontrer le rôle pronostic en terme de survie globale et de survie sans récurrence de l'infiltrat immunologique au sein même des métastases hépatiques des cancers colorectaux, en soulignant l'importance de la densité en lymphocytes T mémoires CD45RO+. Leur quantification intratumorale pourrait ainsi permettre d'individualiser des populations à haut risque de récurrence, pouvant tirer bénéfice d'une chimiothérapie postopératoire. Toutefois, cette étude reposant sur un effectif faible, il est fondamental de

confirmer ces résultats sur un plus grand nombre de patients et d'y associer l'étude d'autres populations cellulaires importantes de l'immunité antitumorale : les Th17, dont une forte infiltration a été décrite récemment comme ayant une signification péjorative au sein de la tumeur primitive et les macrophages dont l'implication pronostique a déjà été rapportée dans d'autres localisations comme le cancer bronchique, mais dont le rôle dans le cancer colorectal reste à ce jour inconnu.

BIBLIOGRAPHIE

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, **100**(1): 57-70.
2. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(10): 715-727.
3. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, **3**(11): 991-998.
4. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, **331**(6024): 1565-1570.
5. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004, **21**(2): 137-148.
6. Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, *et al.* Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(6): 1039-1046.
7. Jeannin P, Duluc D, Delneste Y. IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN-gamma. *Immunotherapy* 2011, **3**(4 Suppl): 23-26.
8. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, *et al.* NK cells and cancer. *Journal of immunology* 2007, **178**(7): 4011-4016.
9. Morita M, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E, *et al.* Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem* 1995, **38**(12): 2176-2187.
10. Nakagawa R, Motoki K, Ueno H, Iijima R, Nakamura H, Kobayashi E, *et al.* Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN7000. *Cancer research* 1998, **58**(6): 1202-1207.
11. Nakagawa R, Serizawa I, Motoki K, Sato M, Ueno H, Iijima R, *et al.* Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol Res* 2000, **12**(2): 51-58.
12. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997, **278**(5343): 1626-1629.

13. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, *et al.* CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(8): 1521-1528.
14. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, *et al.* The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(7): 1121-1128.
15. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *Journal of immunology* 2001, **166**(10): 6012-6018.
16. Terabe M, Berzofsky JA. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol* 2007, **28**(11): 491-496.
17. Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas. *British journal of cancer* 1998, **78**(4): 478-483.
18. Snijdewint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, Livingston PO, Hilgers J, *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2001, **93**(1): 97-106.
19. Livingston P, Zhang S, Adluri S, Yao TJ, Graeber L, Ragupathi G, *et al.* Tumor cell reactivity mediated by IgM antibodies in sera from melanoma patients vaccinated with GM2 ganglioside covalently linked to KLH is increased by IgG antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 1997, **43**(6): 324-330.
20. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, *et al.* IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001, **410**(6832): 1107-1111.
21. Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 1996, **104**(9): 629-639.
22. Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scandinavian journal of immunology* 1997, **45**(5): 463-470.

23. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 2001, **13**(4): 459-463.
24. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001, **294**(5542): 605-609.
25. Girardi M, Glusac E, Filler RB, Roberts SJ, Properova I, Lewis J, *et al.* The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(5): 747-755.
26. Swann JB, Uldrich AP, van Dommelen S, Sharkey J, Murray WK, Godfrey DI, *et al.* Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* 2009, **113**(25): 6382-6385.
27. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001, **97**(1): 192-197.
28. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(13): 7556-7561.
29. Alimonti J, Zhang QJ, Gabathuler R, Reid G, Chen SS, Jefferies WA. TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2000, **18**(5): 515-520.
30. Fallarino F, Gajewski TF. Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *Journal of immunology* 1999, **163**(8): 4109-4113.
31. Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(4): 1398-1404.
32. Xiao M, Wang C, Zhang J, Li Z, Zhao X, Qin Z. IFNgamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. *Cancer research* 2009, **69**(5): 2010-2017.
33. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(5): 755-760.

34. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(1): 129-134.
35. Penn I. Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 2000, **23**(2): 101-113.
36. Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer AM, Lengerich EJ. Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 2005, **104**(9): 1962-1967.
37. Kobayashi N. Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 1985, **15 Suppl 1**: 307-312.
38. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, *et al*. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(7): 1069-1075.
39. Nakachi K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y. Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci* 2004, **95**(12): 921-929.
40. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000, **356**(9244): 1795-1799.
41. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer research* 2006, **66**(1): 563-570.
42. Clementi R, Locatelli F, Dupre L, Garaventa A, Emmi L, Bregni M, *et al*. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* 2005, **105**(11): 4424-4428.
43. Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, *et al*. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(7): 967-974.
44. Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Menard C, Roux S, Lyonnet L, *et al*. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nature medicine* 2011, **17**(6): 700-707.

45. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, Geller MD. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(11): 1753-1757.
46. Beckhove P, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, *et al.* Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *The Journal of clinical investigation* 2004, **114**(1): 67-76.
47. Kornstein MJ, Brooks JS, Elder DE. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer research* 1983, **43**(6): 2749-2753.
48. Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Stathopoulos GP, Papamichail M. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer* 1994, **74**(4): 1275-1282.
49. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, *et al.* CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 1998, **58**(16): 3491-3494.
50. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, *et al.* 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* 2009, **27**(35): 5944-5951.
51. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006, **313**(5795): 1960-1964.
52. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005, **353**(25): 2654-2666.
53. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(11): 834-846.
54. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007, **450**(7171): 903-907.
55. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 2009, **457**(7225): 36-37.

56. Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, *et al.* Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer research* 2003, **63**(20): 6784-6790.
57. Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA. Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother* 2004, **27**(3): 184-190.
58. Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL. Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(2 Pt 2): 937s-943s.
59. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(1): 46-53.
60. Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, *et al.* FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology* 1998, **161**(8): 3936-3942.
61. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, *et al.* Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 2000, **19**(48): 5477-5486.
62. Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Dal Cin P, Neuberg D, *et al.* FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, **12**(11 Pt 1): 3265-3271.
63. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 2002, **8**(8): 793-800.
64. Tripathi P, Agrawal S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest* 2006, **24**(2): 178-186.
65. Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, *et al.* Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *Journal of immunology* 2006, **177**(5): 3100-3107.
66. Della Porta M, Danova M, Rigolin GM, Brugnattelli S, Rovati B, Tronconi C, *et al.* Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 2005, **68**(2-3): 276-284.

67. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, *et al.* VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003, **101**(12): 4878-4886.
68. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, *et al.* Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *Journal of immunology* 2000, **164**(1): 361-370.
69. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 1996, **88**(2): 100-108.
70. Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1996, **66**(4): 470-476.
71. Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer research* 2005, **65**(8): 3447-3453.
72. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietsky N, *et al.* Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 2008, **9**(9): 1065-1073.
73. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, *et al.* Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nature medicine* 2010, **16**(1): 98-105.
74. Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy SV, Nagaraj S, Tyurin VA, *et al.* Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature medicine* 2010, **16**(8): 880-886.
75. Tyurin VA, Cao W, Tyurina YY, Gabrilovich DI, Kagan VE. Mass-spectrometric characterization of peroxidized and hydrolyzed lipids in plasma and dendritic cells of tumor-bearing animals. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **413**(1): 149-153.
76. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(8): 641-654.
77. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine* 2003, **9**(10): 1269-1274.

78. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine* 2002, **196**(4): 447-457.
79. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* 2004, **5**(3): 241-251.
80. Huang Y, Obholzer N, Fayad R, Qiao L. Turning on/off tumor-specific CTL response during progressive tumor growth. *Journal of immunology* 2005, **175**(5): 3110-3116.
81. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**(12): 1581-1592.
82. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004, **22**: 531-562.
83. Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2004, **16**(2): 157-162.
84. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009, **21**(10): 1105-1111.
85. Teng MW, Swann JB, von Scheidt B, Sharkey J, Zerafa N, McLaughlin N, *et al.* Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion. *Cancer research* 2010, **70**(7): 2665-2674.
86. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *European journal of immunology* 2004, **34**(2): 336-344.
87. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, **1183**: 38-57.
88. Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, *et al.* A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(12): 1627-1633.

89. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000, **1**(6): 515-520.
90. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, *et al.* Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature medicine* 2005, **11**(12): 1314-1321.
91. Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature medicine* 2004, **10**(9): 950-958.
92. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 2008, **18**(5): 349-355.
93. De Santo C, Serafini P, Marigo I, Dolcetti L, Bolla M, Del Soldato P, *et al.* Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(11): 4185-4190.
94. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(4): 871-881.
95. Song H, Park G, Kim YS, Hur I, Kim H, Ryu JW, *et al.* B7-H4 reverse signaling induces the apoptosis of EBV-transformed B cells through Fas ligand up-regulation. *Cancer Lett* 2008, **266**(2): 227-237.
96. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2006, **55**(12): 1584-1589.
97. Coudert JD, Zimmer J, Tomasello E, Cebecauer M, Colonna M, Vivier E, *et al.* Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* 2005, **106**(5): 1711-1717.
98. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 2005, **6**(9): 928-937.

99. Coleman S, Clayton A, Mason MD, Jasani B, Adams M, Tabi Z. Recovery of CD8+ T-cell function during systemic chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer research* 2005, **65**(15): 7000-7006.
100. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011, **29**: 235-271.
101. Marx J. Cancer immunology. Cancer's bulwark against immune attack: MDS cells. *Science* 2008, **319**(5860): 154-156.
102. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* 1987, **47**(1): 100-105.
103. Buessow SC, Paul RD, Lopez DM. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute* 1984, **73**(1): 249-255.
104. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(14): 6254-6258.
105. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1995, **1**(1): 95-103.
106. Young MR, Kolesiak K, Wright MA, Gabrilovich DI. Chemoattraction of femoral CD34+ progenitor cells by tumor-derived vascular endothelial cell growth factor. *Clin Exp Metastasis* 1999, **17**(10): 881-888.
107. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research* 2007, **67**(20): 10019-10026.
108. Haile LA, von Wasielewski R, Gamrekashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 2008, **135**(3): 871-881, 881 e871-875.
109. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(6): 1463-1474.

110. Brys L, Beschin A, Raes G, Ghassabeh GH, Noel W, Brandt J, *et al.* Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *Journal of immunology* 2005, **174**(10): 6095-6104.
111. Angulo I, de las Heras FG, Garcia-Bustos JF, Gargallo D, Munoz-Fernandez MA, Fresno M. Nitric oxide-producing CD11b(+)Ly-6G(Gr-1)(+)CD31(ER-MP12)(+) cells in the spleen of cyclophosphamide-treated mice: implications for T-cell responses in immunosuppressed mice. *Blood* 2000, **95**(1): 212-220.
112. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, *et al.* CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2007, **179**(8): 5228-5237.
113. Kerr EC, Raveney BJ, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. *J Autoimmun* 2008, **31**(4): 354-361.
114. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *Journal of immunology* 2006, **176**(4): 2085-2094.
115. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* 2009, **9**(3): 162-174.
116. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunological reviews* 2008, **222**: 162-179.
117. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *Journal of immunology* 2005, **174**(8): 4880-4891.
118. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* 2004, **64**(17): 6337-6343.
119. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology* 2008, **181**(7): 4666-4675.

120. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology* 2001, **166**(1): 678-689.
121. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2009, **58**(1): 49-59.
122. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* 2005, **65**(8): 3044-3048.
123. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, *et al.* Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *Journal of immunology* 1991, **147**(1): 22-28.
124. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, *et al.* Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 2000, **96**(12): 3838-3846.
125. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, *et al.* All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research* 2003, **63**(15): 4441-4449.
126. Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH. Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer research* 2004, **64**(3): 1130-1139.
127. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol* 2003, **74**(2): 186-196.
128. Dietlin TA, Hofman FM, Lund BT, Gilmore W, Stohlman SA, van der Veen RC. Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol* 2007, **81**(5): 1205-1212.
129. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, *et al.* Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology* 2010, **40**(1): 22-35.
130. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 2008, **181**(8): 5791-5802.

131. Van Ginderachter JA, Meerschaut S, Liu Y, Brys L, De Groeve K, Hassanzadeh Ghassabeh G, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands reverse CTL suppression by alternatively activated (M2) macrophages in cancer. *Blood* 2006, **108**(2): 525-535.
132. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(5): 1155-1166.
133. Umemura N, Saio M, Suwa T, Kitoh Y, Bai J, Nonaka K, *et al.* Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* 2008, **83**(5): 1136-1144.
134. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, *et al.* Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(10): 2777-2790.
135. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* 2006, **66**(2): 1123-1131.
136. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WHt, Roby KF, Roden RB. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research* 2006, **66**(13): 6807-6815.
137. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, *et al.* IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *Journal of immunology* 2009, **182**(10): 6562-6568.
138. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, *et al.* Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research* 2009, **69**(4): 1553-1560.
139. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research* 2001, **61**(12): 4756-4760.
140. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, *et al.* Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(18): 2546-2553.

141. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008, **135**(1): 234-243.
142. Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, *et al.* All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer research* 2006, **66**(18): 9299-9307.
143. Ma G, Pan PY, Eisenstein S, Divino CM, Lowell CA, Takai T, *et al.* Paired immunoglobulin-like receptor-B regulates the suppressive function and fate of myeloid-derived suppressor cells. *Immunity* 2011, **34**(3): 385-395.
144. Young MR, Wright MA. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminishes tumor recurrence and metastasis. *Cancer research* 1992, **52**(22): 6335-6340.
145. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(9): 675-687.
146. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *Journal of immunology* 2006, **176**(1): 284-290.
147. Song X, Krelm Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, *et al.* CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *Journal of immunology* 2005, **175**(12): 8200-8208.
148. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 2007, **67**(9): 4507-4513.
149. Smith CW, Chen Z, Dong G, Loukinova E, Pegram MY, Nicholas-Figueroa L, *et al.* The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1alpha, IL-6, GM-CSF, and KC. *Clin Exp Metastasis* 1998, **16**(7): 655-664.
150. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, *et al.* Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of immunology* 1999, **162**(10): 5728-5737.

151. Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, *et al.* Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 1996, **77**(6): 1101-1106.
152. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature medicine* 1996, **2**(10): 1096-1103.
153. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998, **92**(11): 4150-4166.
154. Roland CL, Lynn KD, Toombs JE, Dineen SP, Udugamasooriya DG, Brekken RA. Cytokine levels correlate with immune cell infiltration after anti-VEGF therapy in preclinical mouse models of breast cancer. *PLoS one* 2009, **4**(11): e7669.
155. Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunological reviews* 2008, **222**: 222-241.
156. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**: 519-550.
157. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, *et al.* Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer cell* 2008, **14**(5): 408-419.
158. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *Journal of the National Cancer Institute* 1998, **90**(20): 1529-1536.
159. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *Journal of the National Cancer Institute* 1998, **90**(21): 1609-1620.
160. Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. Tumor growth increases Ia- macrophage synthesis of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2: changes in macrophage suppressor activity. *J Leukoc Biol* 1993, **53**(5): 550-558.
161. Wang D, DuBois RN. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008, **267**(2): 197-203.
162. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* 2004, **172**(2): 989-999.

163. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* 2008, **205**(10): 2235-2249.
164. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, *et al.* Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*, **32**(6): 790-802.
165. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, *et al.* Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *Journal of immunology* 2011, **187**(11): 6120-6129.
166. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008, **111**(8): 4233-4244.
167. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *Journal of immunology* 2001, **166**(4): 2173-2177.
168. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer research* 2005, **65**(24): 11743-11751.
169. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 2003, **170**(1): 270-278.
170. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, *et al.* Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(11): 1741-1752.
171. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *The American journal of pathology* 2007, **171**(3): 715-727.
172. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005, **23**: 821-852.
173. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, *et al.* Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 2008, **9**(11): 1225-1235.

174. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007, **109**(4): 1568-1573.
175. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, *et al.* Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(7): 931-939.
176. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(24): 21123-21129.
177. Liu Y, Van Ginderachter JA, Brys L, De Baetselier P, Raes G, Geldhof AB. Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. *Journal of immunology* 2003, **170**(10): 5064-5074.
178. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuolo MB, *et al.* Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer research* 2004, **64**(16): 5839-5849.
179. Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, *et al.* Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(8): 1257-1268.
180. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(23): 13119-13124.
181. Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A, Kupisz K, Kandefer-Szerszen M. Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol* 2004, **43**(3): 252-258.
182. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001, **11**(4): 173-186.
183. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006, **5**: 14.
184. Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, *et al.* Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med (Berl)* 2003, **81**(10): 664-673.

185. Agostinelli E, Seiler N. Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications. *Amino Acids* 2006, **31**(3): 341-355.
186. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *Journal of immunology* 1998, **160**(12): 5729-5734.
187. Harari O, Liao JK. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des* 2004, **10**(8): 893-898.
188. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, *et al.* Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunological reviews* 2002, **188**: 97-113.
189. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine* 2007, **13**(7): 828-835.
190. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine*, **208**(10): 1949-1962.
191. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol* 2011, **32**(8): 345-349.
192. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology* 2009, **183**(2): 937-944.
193. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *Journal of immunology* 1996, **156**(5): 1916-1922.
194. Beck C, Schreiber K, Schreiber H, Rowley DA. C-kit+ FcR+ myelocytes are increased in cancer and prevent the proliferation of fully cytolytic T cells in the presence of immune serum. *European journal of immunology* 2003, **33**(1): 19-28.
195. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research* 2010, **70**(1): 68-77.

196. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* 2009, **85**(6): 996-1004.
197. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2007, **56**(5): 739-745.
198. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *Journal of immunology* 2001, **166**(9): 5398-5406.
199. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *Journal of immunology* 2005, **175**(7): 4583-4592.
200. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010, **16**(18): 4583-4594.
201. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *Journal of immunology* 2004, **172**(1): 464-474.
202. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine* 2004, **10**(1): 48-54.
203. Kitamura H, Kamon H, Sawa S, Park SJ, Katunuma N, Ishihara K, *et al.* IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity* 2005, **23**(5): 491-502.
204. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer research* 2010, **70**(11): 4335-4345.
205. Solito S, Falisi E, Diaz-Montero CM, Doni A, Pinton L, Rosato A, *et al.* A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2011, **118**(8): 2254-2265.

206. Nagaraj S, Nelson A, Youn JI, Cheng P, Quiceno D, Gabrilovich DI. Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer research* 2012, **72**(4): 928-938.
207. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, *et al.* Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research*, **70**(1): 99-108.
208. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer research* 2008, **68**(13): 5439-5449.
209. Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Journal of immunology* 2008, **180**(12): 7898-7906.
210. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, *et al.* Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *Journal of immunology* 2002, **168**(2): 689-695.
211. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *Journal of immunology* 2005, **174**(2): 636-645.
212. Cao S, Liu J, Chesi M, Bergsagel PL, Ho IC, Donnelly RP, *et al.* Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *Journal of immunology* 2002, **169**(10): 5715-5725.
213. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *Journal of immunology* 2007, **179**(2): 977-983.
214. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppe G, Tremblay J, Aumont A, Houde M, *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *European journal of immunology* 2008, **38**(5): 1225-1230.
215. Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, *et al.* Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* 2007, **109**(10): 4336-4342.
216. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, *et al.* IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *European journal of immunology* 2010, **40**(12): 3347-3357.

217. Nausch N, Galani IE, Schlecker E, Cerwenka A. Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* 2008, **112**(10): 4080-4089.
218. Hu CE, Gan J, Zhang RD, Cheng YR, Huang GJ. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand J Gastroenterol* 2011, **46**(2): 156-164.
219. Poschke I, Mao Y, Adamson L, Salazar-Onfray F, Masucci G, Kiessling R. Myeloid-derived suppressor cells impair the quality of dendritic cell vaccines. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2011.
220. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* 2009, **182**(8): 4499-4506.
221. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(11): 798-809.
222. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(28): 20059-20063.
223. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999, **10**(1): 105-115.
224. Bollrath J, Pheesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, *et al.* gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer cell* 2009, **15**(2): 91-102.
225. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell* 2009, **15**(2): 103-113.
226. Shain KH, Yarde DN, Meads MB, Huang M, Jove R, Hazlehurst LA, *et al.* Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer research* 2009, **69**(3): 1009-1015.
227. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(1): 41-51.

228. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, *et al.* Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 2009, **457**(7226): 200-204.
229. Aziz MH, Manoharan HT, Verma AK. Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3. *Cancer research* 2007, **67**(3): 1385-1394.
230. Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, *et al.* Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer research* 2009, **69**(2): 632-639.
231. Samavati L, Rastogi R, Du W, Huttemann M, Fite A, Franchi L. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Mol Immunol* 2009, **46**(8-9): 1867-1877.
232. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 2007, **21**(11): 1396-1408.
233. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, *et al.* Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer cell* 2009, **15**(4): 283-293.
234. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer research* 2005, **65**(20): 9525-9535.
235. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(10): 3367-3377.
236. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003, **19**(3): 425-436.
237. Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, *et al.* Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *Journal of immunology* 2005, **175**(5): 3354-3359.
238. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, *et al.* Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer cell* 2009, **15**(2): 114-123.

239. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, *et al.* Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *Journal of immunology* 2007, **179**(4): 2170-2179.
240. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(4): 295-307.
241. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, *et al.* Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(21): 8137-8142.
242. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(7): 1457-1464.
243. Caprioli F, Sarra M, Caruso R, Stolfi C, Fina D, Sica G, *et al.* Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *Journal of immunology* 2008, **180**(3): 1800-1807.
244. Hengesbach LM, Hoag KA. Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *The Journal of nutrition* 2004, **134**(10): 2653-2659.
245. Kuwata T, Wang IM, Tamura T, Ponnampereuma RM, Levine R, Holmes KL, *et al.* Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 2000, **95**(11): 3349-3356.
246. Lathers DM, Clark JI, Achille NJ, Young MR. Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2004, **53**(5): 422-430.
247. Michels T, Shurin GV, Naiditch H, Sevko A, Umansky V, Shurin MR. Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *J Immunotoxicol* 2012.
248. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, *et al.* Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 2008, **111**(1): 219-228.
249. Fricke I, Mirza N, Dupont J, Lockhart C, Jackson A, Lee JH, *et al.* Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007, **13**(16): 4840-4848.

250. Kuzmartsev S, Eruslanov E, Kubler H, Tseng T, Sakai Y, Su Z, *et al.* Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *Journal of immunology* 2008, **181**(1): 346-353.
251. Melani C, Sangaletti S, Barazzetta FM, Werb Z, Colombo MP. Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer research* 2007, **67**(23): 11438-11446.
252. Talmadge JE, Hood KC, Zobel LC, Shafer LR, Coles M, Toth B. Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int Immunopharmacol* 2007, **7**(2): 140-151.
253. Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(12): 2691-2702.
254. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(18): 6713-6721.
255. Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, Chang WS, Ko SY, Chang SY, *et al.* A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer research* 2007, **67**(15): 7477-7486.
256. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* 2005, **55**(2): 74-108.
257. UICC 6th edition 2002. Sobin LH and Wittekind C ed. New York : Wiley-Liss ; 2002.
258. Bis AJCC Cancer Staging Manual, 6 th ed. New York (NY) : Springer ; 2002).
259. Mulier S, Ruers T, Jamart J, Michel L, Marchal G, Ni Y. Radiofrequency ablation versus resection for resectable colorectal liver metastases: time for a randomized trial? An update. *Dig Surg* 2008, **25**(6): 445-460.
260. Fernandez FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM. Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg* 2004, **240**(3): 438-447; discussion 447-450.

261. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, *et al.* Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(29): 4575-4580.
262. Ekberg H, Tranberg KG, Andersson R, Lundstedt C, Hagerstrand I, Ranstam J, *et al.* Determinants of survival in liver resection for colorectal secondaries. *The British journal of surgery* 1986, **73**(9): 727-731.
263. Garden OJ, Rees M, Poston GJ, Mirza D, Saunders M, Ledermann J, *et al.* Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut* 2006, **55 Suppl 3**: iii1-8.
264. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, *et al.* Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008, **371**(9617): 1007-1016.
265. Adam R, Avisar E, Ariche A, Giachetti S, Azoulay D, Castaing D, *et al.* Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Annals of surgical oncology* 2001, **8**(4): 347-353.
266. Yamada H, Katoh H, Kondo S, Okushiba S, Morikawa T. Repeat hepatectomy for recurrent hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001, **48**(39): 828-830.
267. Nishio H, Hamady ZZ, Malik HZ, Fenwick S, Rajendra Prasad K, Toogood GJ, *et al.* Outcome following repeat liver resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2007, **33**(6): 729-734.
268. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Annals of surgical oncology* 2003, **10**(1): 65-71.
269. Beart RW, Jr., Moertel CG, Wieand HS, Leigh JE, Windschitl HE, van Heerden JA, *et al.* Adjuvant therapy for resectable colorectal carcinoma with fluorouracil administered by portal vein infusion. A study of the Mayo Clinic and the North Central Cancer Treatment Group. *Arch Surg* 1990, **125**(7): 897-901.
270. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, *et al.* Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, **21**(15): 2912-2919.

271. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, *et al.* Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990, **322**(6): 352-358.
272. Benson AB, 3rd, Ajani JA, Catalano RB, Engelking C, Kornblau SM, Martenson JA, Jr., *et al.* Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, **22**(14): 2918-2926.
273. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *European journal of cancer* 1999, **35**(14): 1986-2002.
274. Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol* 2003, **14**(7): 1026-1038.
275. Tsuji T, Hidaka S, Sawai T, Nakagoe T, Yano H, Haseba M, *et al.* Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region is not an efficacious marker for tumor sensitivity to 5-fluorouracil-based oral adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003, **9**(10 Pt 1): 3700-3704.
276. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004, **22**(3): 529-536.
277. Johnston PG, Benson AB, 3rd, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, **21**(5): 815-819.
278. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992, **340**(8820): 626-630.
279. Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003, **21**(6): 1174-1179.
280. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, *et al.* Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993, **104**(5): 1535-1549.

281. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(3): 609-618.
282. Gomez D, Cameron IC. Prognostic scores for colorectal liver metastasis: clinically important or an academic exercise? *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2010, **12**(4): 227-238.
283. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *The Journal of urology* 2008, **179**(1): 53-56.
284. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(5): 1175-1183.
285. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(1): 59-73.
286. Galon J, Fridman WH, Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer research* 2007, **67**(5): 1883-1886.
287. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 1995, **155**(3): 1151-1164.
288. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, *et al.* Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 2006, **212**: 8-27.
289. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(8): 1075-1085.
290. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology* 2002, **169**(5): 2756-2761.
291. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2005, **65**(6): 2457-2464.

292. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003, **9**(12): 4404-4408.
293. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* 2001, **61**(12): 4766-4772.
294. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003, **98**(5): 1089-1099.
295. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, *et al.* Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *Journal of immunology* 2004, **173**(2): 1444-1453.
296. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 2004, **10**(9): 942-949.
297. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, *et al.* Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, **27**(2): 186-192.
298. Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, *et al.* High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **126**(11): 2635-2643.
299. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of pathology* 2010, **222**(4): 350-366.
300. Menard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2008, **57**(11): 1579-1587.
301. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, *et al.* Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2007, **56**(5): 641-648.

302. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, *et al.* Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(10): 1591-1602.
303. Kasprawicz DJ, Droin N, Soper DM, Ramsdell F, Green DR, Ziegler SF. Dynamic regulation of FoxP3 expression controls the balance between CD4+ T cell activation and cell death. *European journal of immunology* 2005, **35**(12): 3424-3432.
304. Roux S, Apetoh L, Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Puig PE, *et al.* CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(11): 3751-3761.
305. Zhao J, Cao Y, Lei Z, Yang Z, Zhang B, Huang B. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer research* 2010, **70**(12): 4850-4858.
306. House AK, Watt AG. Survival and the immune response in patients with carcinoma of the colorectum. *Gut* 1979, **20**(10): 868-874.
307. Svennevig JL, Lunde OC, Holter J, Bjorgsvik D. Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. *British journal of cancer* 1984, **49**(3): 375-377.
308. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, *et al.* Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer research* 2011, **71**(17): 5670-5677.
309. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, *et al.* Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *Journal of immunology* 2002, **168**(9): 4272-4276.
310. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(51): 18538-18543.
311. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, **25**(18): 2586-2593.
312. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the

- disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, **14**(8): 2413-2420.
313. Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *European journal of immunology* 2008, **38**(4): 925-927.
314. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, *et al.* Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009, **58**(4): 520-529.
315. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 2009, **137**(4): 1270-1279.
316. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y, *et al.* Intratumoral CD8(+)/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2010, **59**(5): 653-661.
317. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *The Journal of clinical investigation* 2003, **112**(9): 1437-1443.
318. Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, *et al.* FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer research* 2009, **69**(9): 3995-4000.
319. Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, Nambiar PR, Ge Z, Fox JG, *et al.* CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer research* 2005, **65**(10): 3998-4004.
320. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008, **134**(2): 577-594.
321. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010, **138**(6): 2101-2114 e2105.
322. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999, **20**(8): 1425-1431.
323. Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe* 2008, **4**(4): 337-349.

324. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, *et al.* A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature medicine* 2009, **15**(9): 1016-1022.
325. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003, **101**(7): 2620-2627.
326. Wang Y, Cui X, Tai G, Ge J, Li N, Chen F, *et al.* A critical role of activin A in maturation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cellular & molecular immunology* 2009, **6**(5): 387-392.
327. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer cell* 2009, **15**(2): 79-80.
328. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & molecular immunology* 2009, **6**(5): 327-334.
329. Erdman SE, Poutahidis T, Tomczak M, Rogers AB, Cormier K, Plank B, *et al.* CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *The American journal of pathology* 2003, **162**(2): 691-702.
330. Poutahidis T, Haigis KM, Rao VP, Nambiar PR, Taylor CL, Ge Z, *et al.* Rapid reversal of interleukin-6-dependent epithelial invasion in a mouse model of microbially induced colon carcinoma. *Carcinogenesis* 2007, **28**(12): 2614-2623.
331. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, *et al.* IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(11): 2485-2494.
332. Erdman SE, Rao VP, Olipitz W, Taylor CL, Jackson EA, Levkovich T, *et al.* Unifying roles for regulatory T cells and inflammation in cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **126**(7): 1651-1665.
333. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2011, **60**(7): 909-918.
334. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, **12**(2): 465-472.

335. Zhang YL, Li J, Mo HY, Qiu F, Zheng LM, Qian CN, *et al.* Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Molecular cancer* 2010, **9**: 4.
336. Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head & neck* 2009, **31**(9): 1228-1239.
337. MacLean GD, Miles DW, Rubens RD, Reddish MA, Longenecker BM. Enhancing the effect of THERATOPE STn-KLH cancer vaccine in patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* 1996, **19**(4): 309-316.
338. Berd D, Maguire HC, Jr., Mastrangelo MJ. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer research* 1986, **46**(5): 2572-2577.
339. Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, **1174**: 99-106.
340. Gerena-Lewis M, Crawford J, Bonomi P, Maddox AM, Hainsworth J, McCune DE, *et al.* A Phase II trial of Denileukin Diftitox in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *American journal of clinical oncology* 2009, **32**(3): 269-273.
341. Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, *et al.* Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 2008, **112**(3): 610-618.
342. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, *et al.* Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *The American journal of surgical pathology* 2003, **27**(11): 1407-1417.
343. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, *et al.* Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(20): 6412-6420.
344. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, *et al.* Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008, **134**(4): 988-997.
345. Speetjens FM, Lauwen MM, Franken KL, Janssen-van Rhijn CM, van Duikerem S, Bres SA, *et al.* Prediction of the immunogenic potential of frameshift-mutated antigens in microsatellite

- instable cancer. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2008, **123**(4): 838-845.
346. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research* 2010, **70**(8): 3052-3061.
347. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006, **24**(6): 677-688.
348. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009, **139**(3): 485-498.
349. Su YC, Lee CC, Kung JT. Effector function-deficient memory CD8+ T cells clonally expand in the liver and give rise to peripheral memory CD8+ T cells. *Journal of immunology* 2010, **185**(12): 7498-7506.
350. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *Journal of immunology* 2010, **184**(3): 1630-1641.
351. Blaschitz C, Raffatellu M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology* 2010, **30**(2): 196-203.
352. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *Journal of immunology* 2009, **183**(7): 4169-4175.
353. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research* 2011, **71**(4): 1263-1271.
354. Crome SQ, Clive B, Wang AY, Kang CY, Chow V, Yu J, *et al.* Inflammatory effects of ex vivo human Th17 cells are suppressed by regulatory T cells. *Journal of immunology* 2010, **185**(6): 3199-3208.
355. Fewkes NM, Mackall CL. Novel gamma-chain cytokines as candidate immune modulators in immune therapies for cancer. *Cancer journal* 2010, **16**(4): 392-398.
356. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 1972, **46**(6): 845-852.

357. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *Journal of immunology* 1992, **148**(4): 1280-1285.
358. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, *et al.* T cell infiltrate predicts long-term survival following resection of colorectal cancer liver metastases. *Annals of surgical oncology* 2009, **16**(9): 2524-2530.

ANNEXE

V. Annexe

Liste des autres publications

Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, **Vincent J**, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. **Immunity**. 2012 Mar 23;36(3):362-73.

Bevacizumab plus FOLFIRI-3 in chemotherapy-refractory patients with metastatic colorectal cancer in the era of biotherapies. Ghiringhelli F, **Vincent J**, Guiu B, Chauffert B, Ladoire S. *Invest New Drugs*. 2012 Apr;30(2):758-64.

5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. **Vincent J**, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *Cancer Res*. 2010 Apr 15;70(8):3052-61.

Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, **Vincent J**, Bruchard M, Chauffert B, Martin F, Fumoleau P, Ghiringhelli F. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(1):65-72.

Hepatic arterial infusion of gemcitabine-oxaliplatin in a large metastasis from colon cancer. Guiu B, **Vincent J**, Guiu S, Ladoire S, Ortega-Deballon P, Cercueil JP, Chauffert B, Ghiringhelli F. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar 7;16(9):1150-4.

Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, **Vincent J**, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. *J Clin Invest*. 2010 Feb;120(2):457-71.