

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2016

N° 053

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques

par

Juliette EUGENE LAMER
née le 31/03/1986 à Suresnes (Hauts de Seine)

Présentée et soutenue publiquement le 12 janvier 2016

INTERACTIONS CELLULES TUMORALES – MICRO ENVIRONNEMENT
IMMUNITAIRE DANS LES CANCERS COLORECTAUX : ETUDE DE L'INFLUENCE
PRONOSTIQUE DE L'EXPRESSION ABERRANTE DE HLA-E ET DE SON
RECEPTEUR CD94/NKG2 EN FONCTION DU MODE D'ONCOGENESE.

Président : Monsieur le Professeur J-F. Mosnier.

Directeur de thèse : Madame le Professeur C. Bossard.

Membres du jury : Monsieur le Professeur S. Bézieau
Monsieur le Professeur G. Meurette.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à

Monsieur le Professeur Jean-François Mosnier

Qui me fait l'honneur de présider cette thèse.

Que ce travail soit l'occasion de lui exprimer mon profond respect, de le remercier pour la qualité de son enseignement, et son accompagnement tout au long de mon internat.

Madame le Professeur Céline Bossard

Qui me fait l'honneur de diriger cette thèse.

Je la remercie de m'avoir fait confiance pour ce travail. Je la remercie également pour son encadrement, sa disponibilité, pour ses conseils lors de la rédaction, ainsi que pour son enseignement en pathologie. Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Stéphane Bézieau

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je le remercie pour l'intérêt qu'il aura pu porter à ce travail, et aussi pour m'avoir accueillie dans son service pendant un semestre, et pour m'avoir permis de réaliser des techniques dans son laboratoire qui ont servies à ce travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Guillaume Meurette

Qui me fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de mon respect et de ma reconnaissance pour avoir bien voulu juger mon travail.

- Je tiens également à adresser mes sincères remerciements :

A **Monsieur le Professeur Christian Laboisse**, mon chef de service pendant la majeure partie de mon internat, pour son accueil au sein du laboratoire, pour la qualité de son enseignement en pathologie, pour ses conseils avertis. Soyez assuré de mon profond respect.

A Christelle Volteau pour les analyses statistiques de survie.

- Et bien évidemment...

Aux Docteurs Elisabeth Cassagnau, Anne Moreau, Madeleine Joubert, Karine Renaudin, Frédérique Jossic, Marie-Françoise Heymann, Christine Sagan, Claire Toquet, Delphine Loussouarn, François Leclair, pour la qualité de leur enseignement en pathologie, et leur accompagnement tout au long de ma formation,

Aux Docteurs Pascale Guerzider, Aude Colson-Rapin, Julie Gonin, Laurent Bénard, également pour la qualité de leur enseignement en pathologie, pendant ce très bon semestre passé en leur compagnie à Saint-Nazaire,

A Christine, Laure, Marie D, pour leur amitié, et leur soutien,

A Charly, Marie G, à tous mes co-internes, Clotilde, Othman, Eva, Salim, Faustine et Delphine,

A l'équipe de Biométadys, Anne, Chantal, Stéphanie, Cécile, Ambre et Myriam, pour leur accueil chaleureux,

A l'équipe de génétique, avec qui j'ai passé un très bon semestre,

Aux secrétaires et techniciens des services d'anapath, avec qui j'ai grand plaisir à travailler,

- Mais aussi...

A Mathilde, Perrine, Fred, Leslie, Marie B, PY, Amé, Lise-Marie, Stéphanie et Vincent, Diane, Guégué, Martine et Guillaume, Martin, Thibault...

A mes parents, à mon Marco, pour leur soutien infaillible,

A Max, pour son soutien, et pour tout le reste...

A mes « petits gars », Antoine et Florent...

A Maxime,

A mes garçons, Antoine & Florent.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	7
Généralités.....	8
I- Le cancer colorectal - Généralités.....	8
1.1. <i>Epidémiologie.....</i>	8
1.2. <i>Le programme national de dépistage organisé.....</i>	8
1.3. <i>Oncogénèse colorectale.....</i>	9
1.3.1. <i>La voie CIN (« Chromosomal Instability ») ou d'instabilité chromosomique.....</i>	9
1.3.2. <i>La voie MSI ou « Instabilité microsatellitaire »</i>	10
1.4. <i>Classification et stade.....</i>	14
II- L'environnement immunitaire au sein des cancers colorectaux.....	15
2.1. <i>Caractéristiques des lymphocytes T de la muqueuse normale.....</i>	15
2.2. <i>Caractéristiques des lymphocytes intra-tumoraux dans le cancer colorectal.....</i>	16
2.3. <i>Les lymphocytes intra-tumoraux en fonction du mode d'oncogénèse.....</i>	17
III- La molécule HLA-E/ β 2m.....	18
3.1. <i>Définition.....</i>	18
3.2. <i>Les récepteurs de HLA-E/β2m : les récepteurs CD94/NKG2.....</i>	18
3.3. <i>Le rôle biologique de HLA-E.....</i>	20
3.4. <i>HLA-E/ β2m dans les cancers.....</i>	21
But de l'étude.....	23
Patients et méthodes	24
I- Patients	24
II- Recueil des données cliniques	24
III- Construction de Tissu Microarray.....	25
IV- Etude immunohistochimique.....	25
4.1. <i>Anticorps utilisés</i>	25
4.2. <i>Evaluation de l'expression des anticorps.....</i>	26
V- Dosage de HLA-E soluble.....	28
VI- Détermination du statut MSI/MSS.....	29
VII- Analyses statistiques.....	29
Résultats.....	31
I- Caractéristiques anatomo-cliniques des patients inclus dans l'étude.....	31

II-	La surexpression de HLA-E/ β 2m était plus fréquente dans les CCR MSI que dans les CCR MSS.....	31
III-	La densité en TIL-IEL exprimant CD94/NKG2, le récepteur de HLA-E, était plus importante dans les CCR ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m.....	33
IV-	La forme soluble de HLA-E détectée dans le sérum était plus élevée chez les patients ayant un CCR de stade IV.....	36
V-	La densité en TIL-IEL CD94+ était un facteur de mauvais pronostic indépendant du stade chez les patients de moins de 75 ans.....	37
Discussion.....		40
Annexes.....		45
Bibliographie.....		46

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DesoxyriboNucléique
β2m : beta 2 microglobuline
CCR : Cancer colorectal
CIN : Chromosomal Instability
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
HES : Hémalun Eosine Safran
HLA-E : Human Leukocyte Antigen – E
HLA-Es : Human Leukocyte Antigen – E sérique
HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
IHC : Immuno-Histo-Chimie
INF-γ : Interféron gamma
MMR : MisMatch Repair
MSI/MSS : MicroSatellite Instability/MicroSatellite Stable
PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
PCR : Polymerase Chain Reaction
RPM : rotations par minute
SG : Survie Globale
SSP : Survie Sans Progression
Th1 : lymphocyte T helper de type 1
TIL- IEL : TIL Intra Epithéliaux
TIL : Lymphocytes Intra Tumoraux
TMA : Tissu MicroArray
TNM : Tumor Node Metastases
UICC : Union Internationale Contre le Cancer
WHO : World Health Organisation

GENERALITES

I- Le Cancer Colorectal – Généralités

1.1 Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) représente le 3^{ème} cancer en terme d'incidence avec environ 41 000 nouveaux cas diagnostiqués en France chaque année (un homme sur 30 et une femme sur 20). Sa mortalité est de 50%. Il est le 2^{ème} cancer en terme de mortalité après le cancer du poumon avec 17 500 décès par an en France (données de l'Inca – 2015).

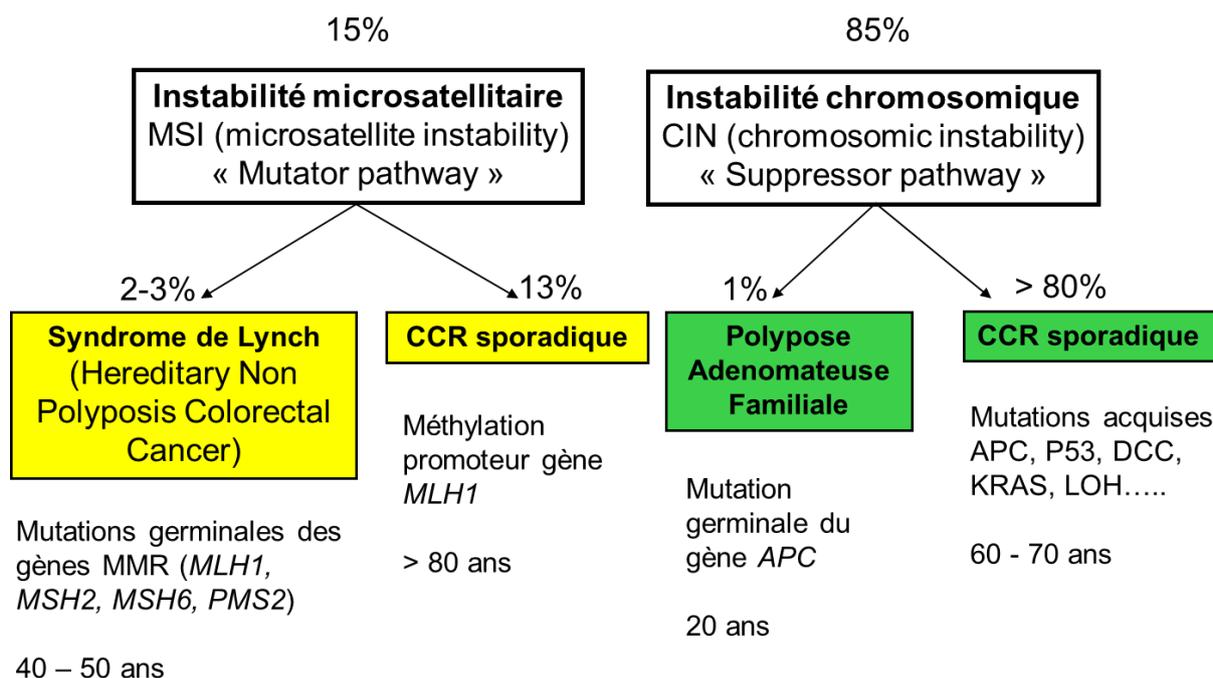
1.2. Le programme national de dépistage organisé

Le programme national de dépistage a été mis en œuvre en 2009 sur l'ensemble du territoire afin de diminuer la mortalité en diagnostiquant la maladie à un stade précoce : un cancer colorectal détecté à un stade précoce permet une meilleure survie et les traitements utilisés sont moins lourds, permettant une meilleure qualité de vie. Le dépistage organisé du cancer colorectal s'adresse aux hommes et aux femmes âgés de 50 à 74 ans dits à risque moyen (sans symptôme apparent ni histoire familiale ou personnelle). Près de 17 millions de personnes sont ainsi concernés par le programme soit 80% de cette tranche d'âge. Le dépistage repose sur :

- une recherche de sang occulte dans les selles tous les 2 ans : le test immunologique (test OC SENSOR) remplace depuis juin 2015 l'ancien test « Hemoccult » (au gaïac). Il repose sur la détection d'hémoglobine humaine dans les selles grâce à des anticorps spécifiques de la globine humaine. Ce nouveau test a l'avantage d'être d'utilisation plus simple pour le patient, plus performant (une plus grande sensibilité de 70 à 75% contre 40 à 45% avec un taux de tests positifs attendus environ à 4%, pour une spécificité semblable - 95 à 98%) et plus fiable (lecture automatisée donc moins de subjectivité), dans le but d'améliorer la participation à ce programme de dépistage (31% actuellement), et mieux dépister les lésions précancéreuses et les cancers.
- suivie d'une coloscopie totale chez les individus dépistés positifs.

1.3. Oncogénèse colorectale.

Il existe 2 grandes voies de carcinogénèse dans les CCR, correspondant à 2 types d'instabilité génomique : la voie d'instabilité chromosomique, prédominante (85 % des CCR), et la voie d'instabilité microsatellitaire (15 %).



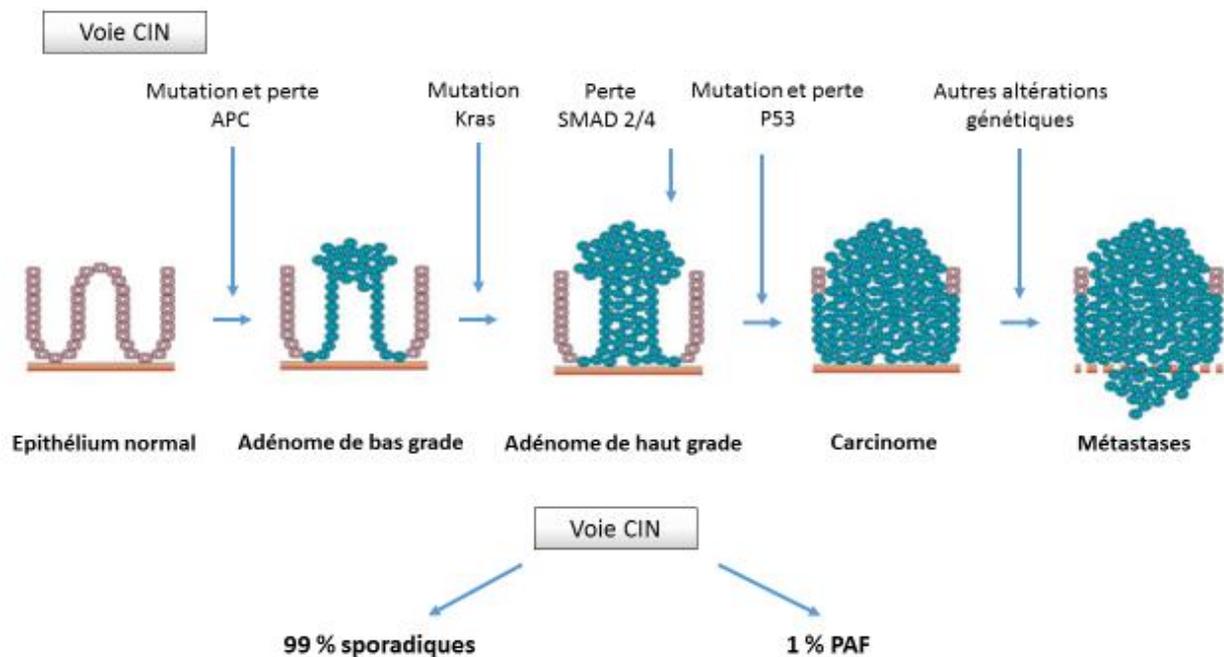
1.3.1. La voie CIN (« Chromosomal Instability ») ou d'instabilité chromosomique

La voie CIN (Chromosomal Instability), décrite par Fearon et Vogelstein en 1990 (Fearon et Vogelstein, 1990), se caractérise par l'acquisition séquentielle et l'accumulation d'anomalies chromosomiques au cours de l'évolution tumorale. Elle concerne la majorité des CCR sporadiques.

Cette voie a été initialement décrite dans un syndrome de prédisposition héréditaire aux CCR : la polypose adénomateuse familiale (PAF), de transmission autosomique dominante. Les CCR héréditaires développés dans le cadre de cette pathologie représentent 1 % des CCR. Cette voie est caractérisée par des pertes alléliques sur le bras court des chromosomes

17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22. Ces pertes alléliques sont associées à des mutations fréquentes des gènes suppresseurs de tumeurs (TP53, APC, SMAD4....) et participent ainsi à l'inactivation bi-allélique de ces gènes (figure 1). Cette voie est également nommée « LOH » pour « Loss of heterozygoty », en rapport avec des anomalies de caryotype (Thomas, et 1998).

Figure 1. Schéma de la séquence adénome – carcinome d’après Fearon et Vogelstein.

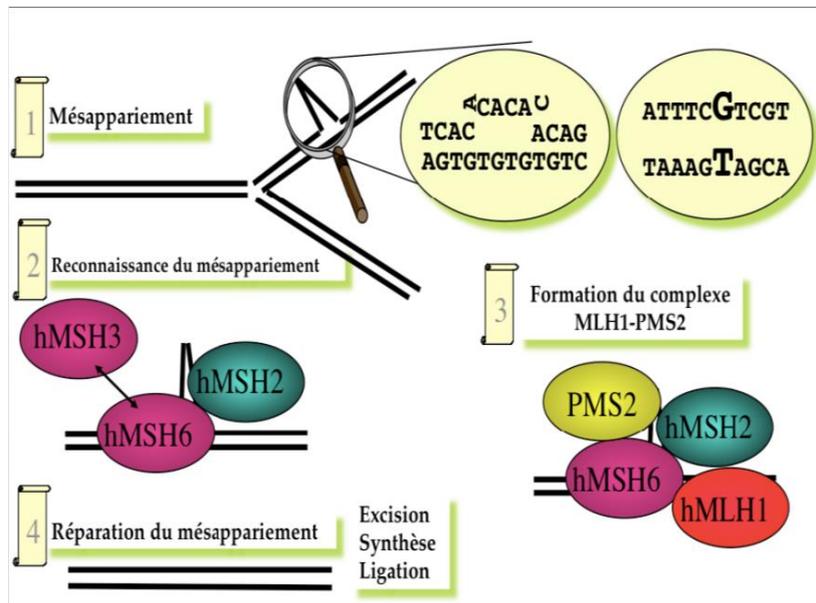


1.3.2. La voie MSI ou « Instabilité microsatellitaire »

La voie MSI (Microsatellite Instability), encore appelée MMR (deficient DNA Mismatch Repair), est impliquée dans environ 15% des CCR (figure 5). Cette voie se caractérise par une instabilité des séquences microsatellites (séquences di-, tri- ou tétra-nucléotides répétées particulièrement exposées à des erreurs à type de mésappariements lors de la réplication de l'ADN, réparties dans les séquences codantes et non codantes du génome) en raison d'une réparation déficiente de l'ADN lors du processus de réplication. Normalement, ces erreurs sont réparées par un complexe de protéines appartenant au système MMR (Mismatch repair) comprenant les protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 (figure 2). Ce défaut de réparation résulte d'une inactivation bi-allélique de gène du système

MMR (gènes MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) (Peltomaki et al, 1997, 2005). Ce défaut de réparation entraîne une accumulation de mutations secondaires dans différents gènes.

Figure 2. Schéma du mécanisme de réparation de l'ADN

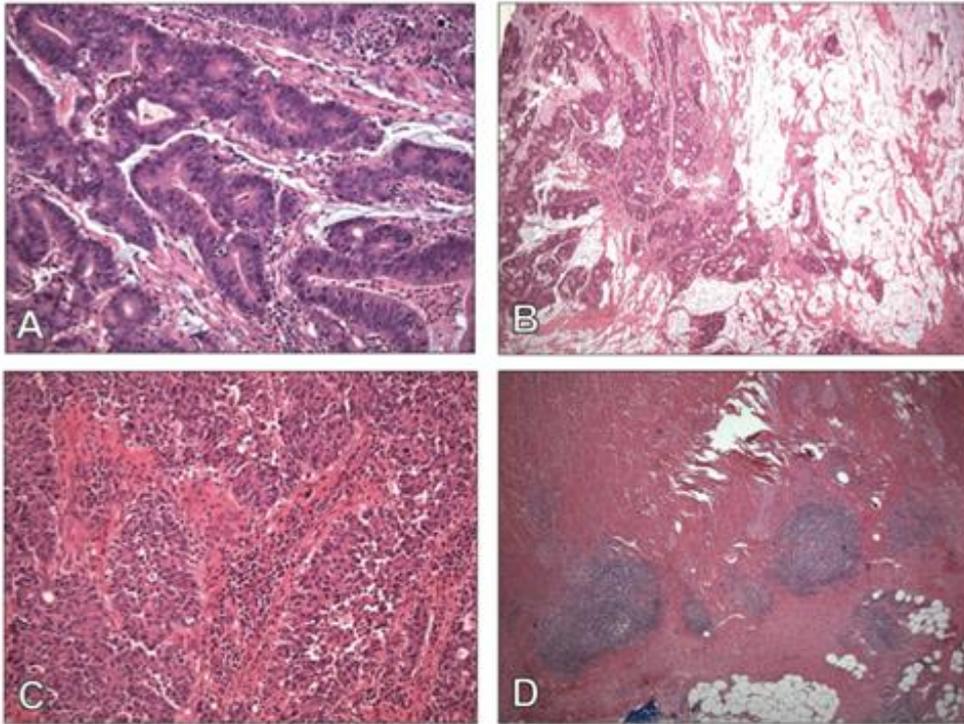


Parmi ces CCR de type MSI, une grande majorité correspond à des CCR sporadiques (environ 95%) tandis qu'une minorité (environ 5 %) correspond à des CCR survenus dans le cadre du syndrome héréditaire de prédisposition au cancer : le syndrome de Lynch. Le syndrome de Lynch ou HNPCC (Hereditary non polyposis colorectal cancer) est défini cliniquement par les critères d'Amsterdam II (Vasen et al, 1999) (critères spécifiques mais peu sensibles), se transmet de façon autosomique dominante, et prédispose aux cancers colorectaux (50-60%), et à d'autres cancers du spectre HNPCC : cancers de l'endomètre (30-40%), de l'estomac (10%), de l'intestin grêle, de l'ovaire (8%), des voies urinaires (5%) et voies biliaires (5%). Ces patients ont une mutation constitutionnelle (germinale) d'un des gènes précités, le plus souvent MSH2 et MLH1 (85%), puis une mutation somatique du même gène dans les cellules tumorales.

Les CCR MSI de type sporadique sont secondaires à une hyperméthylation du promoteur de MLH1, induisant la répression de son expression. Ces CCR MSI sporadiques, sont fortement corrélées à certaines caractéristiques anatomo-cliniques et moléculaires : ces tumeurs sont retrouvées chez des femmes âgées, et sont localisées au niveau du colon droit. Sur le plan morphologique, ces CCR présentent de façon plus fréquente une différenciation mucineuse,

ou peu différenciée ou encore médullaire, et sont associés à un infiltrat lymphocytaire que l'on trouve au contact des cellules tumorales et/ou dans le stroma donnant parfois un aspect Crohn like (figure 3). Ces tumeurs sont également associées à une meilleure survie par rapport aux cancers MSS à stade égal (Samowitz et al, 2001). D'un point de vue moléculaire, elles sont associées en outre à une mutation du gène Braf.

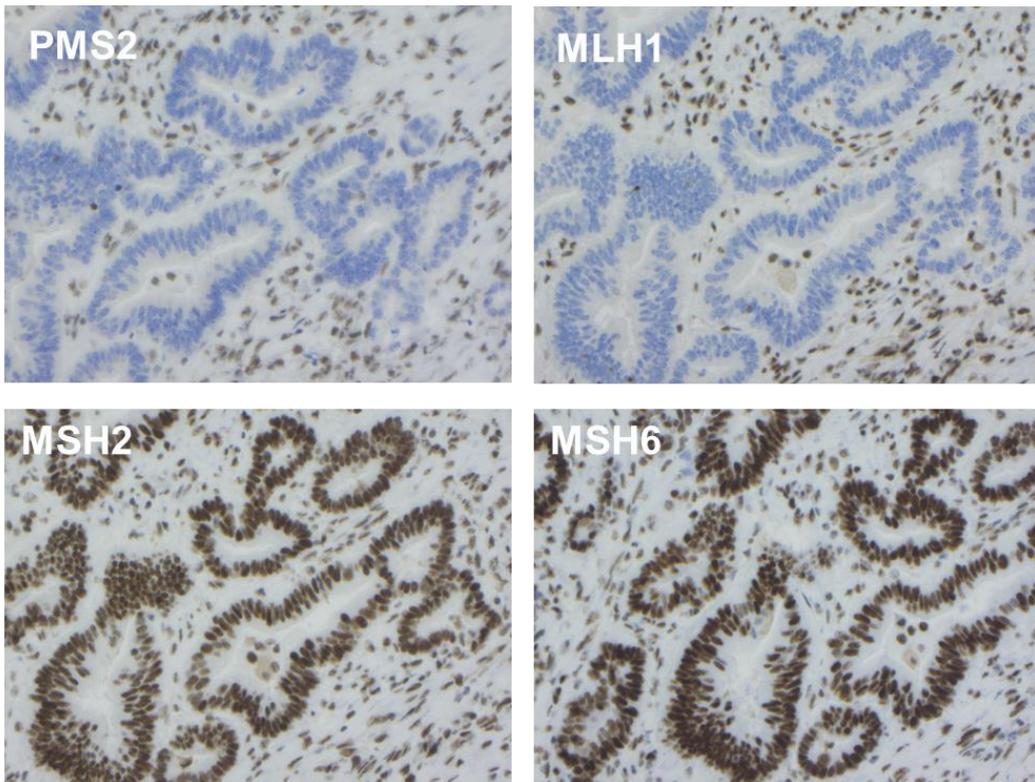
Figure 3. Aspects morphologiques rencontrés dans les CCR de type MSI



A. Adénocarcinome de type NOS («not otherwise specified»), B. Adénocarcinome mucineux, C. Adénocarcinome médullaire, D. Aspect dit Crohn Like, avec un infiltrat inflammatoire localisé, ici en périphérie d'une tumeur.

Ce phénotype MSI peut être détecté par deux techniques complémentaires : l'immunohistochimie (IHC) va détecter la perte d'expression d'une ou plusieurs protéines du système de réparation de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) (figure 4); et la biologie moléculaire, par PCR multiplex, en utilisant un panel minimal de 5 microsatellites (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22, NR-24 par exemple) permet de détecter un phénotype RER (Replication ERror). Les tumeurs qualifiées de MSI-High se définissent par au moins 2 microsatellites instables, tandis que celles ayant un phénotype MSS ne présente aucun microsatellite instable (Boland et al, 1998).

Figure 4. Etude immuno-histochimique des protéines du système MMR



Perte d'expression nucléaire des protéines MLH1 et PMS2 et expression conservée de MSH2 et MSH6.

Figure 5. Répartition des CCR de type MSI

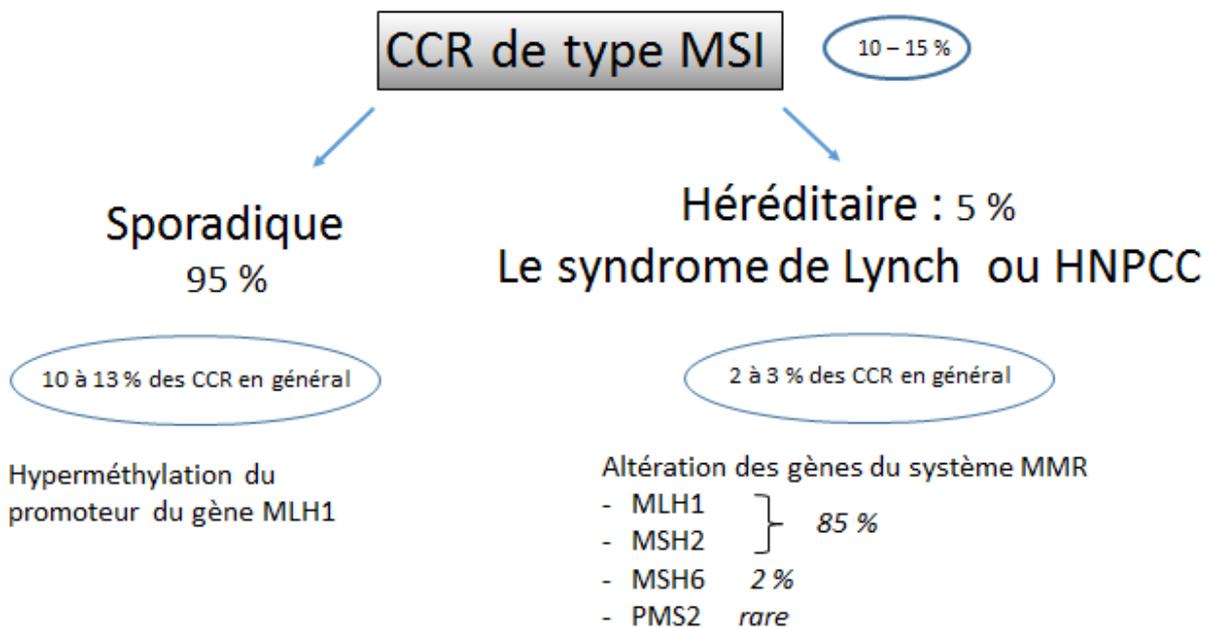
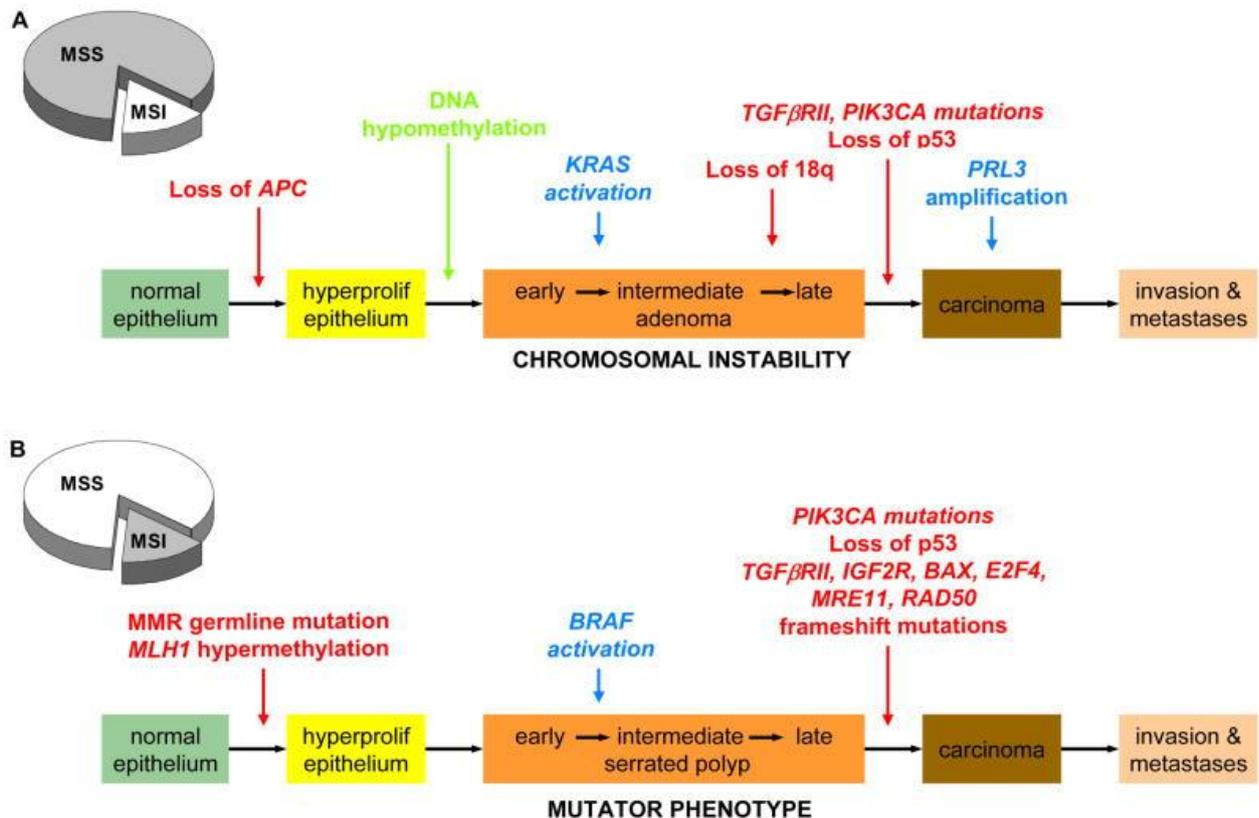


Figure 6. Schéma des deux voies d'oncogénèse.



D'après Vilar et Gruber, 2010

1.4. Classification et stade

La classification anatomo-pathologique utilisée est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation (*WHO*) classification of tumours of the digestive system, édition 2010) (tableau 1 en annexe) et permet de définir un type histologique en fonction de la morphologie de la tumeur et le grade de différenciation. L'adénocarcinome « sans autre précision » (not otherwise specified: NOS) représente 80% des adénocarcinomes. On décrit d'autres variantes moins fréquentes, caractérisées par des aspects morphologiques particuliers ; telles que l'adénocarcinome mucineux défini par une composante mucineuse occupant plus de 50% de la lésion, le carcinome médullaire défini par une prolifération tumorale peu différenciée associée à un infiltrat inflammatoire intra-épithélial important. Le stade pTNM (Tumor Node Metastasis) en vigueur est celui de la 7^{ème} édition publiée par l'UICC (Union Internationale contre le Cancer) en 2009 (en annexe). Il

sert à définir les facteurs histo-pronostiques, et inclus la taille, l'extension locale et à distance.

Cependant, les CCR de stade II (T3-T4 N0) ont une évolution clinique hétérogène avec des patients rechutant plus facilement que d'autres (la survie globale à 5 ans est comprise entre 72% (T4N0) et 85% (T3N0)). Aucune chimiothérapie adjuvante n'est recommandée pour ces patients de stade II à l'exception de ceux présentant les facteurs de risque suivants : stade pT4, un grade peu différencié, une perforation, moins de 12 ganglions examinés, des engainements périnerveux, ou embolies vasculaires. Cependant, la chimiothérapie adjuvante proposée à ces patients à risque de rechute n'apporte qu'un bénéfice minime en terme de survie. Par conséquent, d'autres facteurs de risque histo-pronostiques doivent être identifiés et de nouveaux protocoles thérapeutiques doivent être proposés (Fang et al, 2014).

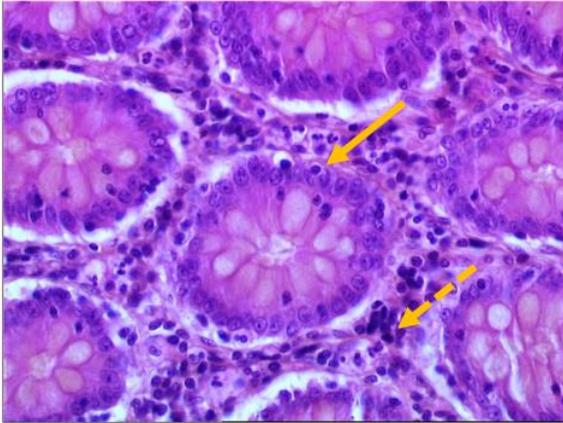
II- L'environnement immunitaire au sein des cancers colorectaux

2.1. Caractéristiques des lymphocytes T de la muqueuse normale

L'intestin est le principal organe lymphoïde de l'organisme, hébergeant le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Cette caractéristique est vraisemblablement liée à l'exposition constante de la muqueuse à de nombreux antigènes dérivés de l'alimentation, des allergènes, des nutriments et aux bactéries commensales ou pathogènes présentes dans la lumière intestinale. Parmi ces lymphocytes, on décrit les lymphocytes de la lamina propria, et des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL). Ces lymphocytes intra-épithéliaux ont un phénotype et des caractéristiques fonctionnelles différents des lymphocytes T circulants, et plusieurs lymphocytes T « non conventionnels » ont été récemment identifiés. La grande majorité des IEL sont des lymphocytes T CD8+, pouvant exprimer soit le TCR (T cell receptor) $\alpha\beta$ soit le TCR $\gamma\delta$. Il a été montré que certains d'entre eux peuvent co-exprimer des récepteurs NK, dont le CD94/NKG2, et leur interaction avec les cellules épithéliales (via notamment HLA-E) de la muqueuse jouerait un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Jabri et al, 2000 ; Kunisawa et al, 2007, Dahan et al, 2007).

Cet environnement immunitaire particulier de la muqueuse colique normale pourrait également intervenir dans la réponse immunitaire caractérisant les CCR.

Photographie de la muqueuse colique normale.



Flèche pleine : un lymphocyte intra-épithélial (IEL) dans une crypte colique normale

Flèche pointillée : un lymphocyte de la lamina propria

2.2. Caractéristiques des lymphocytes intra-tumoraux dans le cancer colorectal

Un certain nombre de CCR se caractérise par un stroma riche en lymphocytes T CD3+, plus précisément des lymphocytes T CD45 mémoires et CD8+ (TIL, Tumor-infiltrating lymphocytes), et cet infiltrat est significativement associé à un meilleur pronostic, cet infiltrat étant un facteur pronostique supérieur au stade, considéré jusqu'alors comme le plus important facteur histo-pronostique. Effectivement, l'équipe de Pagès et Galon a montré que plus la densité en lymphocytes T CD45 mémoires et CD8+ cytotoxiques était augmentée dans les CCR de stade I et II, moins le risque de récurrence était grand, et les facteurs histo-pronostiques (emboles vasculaires et lymphatiques, invasion périnerveuse) moins fréquents. Au vu de ces conclusions, cette équipe a proposé un score immunologique, l'« immunoscore », basé sur la densité de l'infiltrat lymphocytaire T CD8+ et T mémoire CD45RO+ et de sa localisation, et a montré qu'il était supérieur au stade en terme de pronostic (Pages et al, 2005, 2009; Galon et al, 2006 ; Mlecnik et al, 2011 ; Pagès et al, 2014). De plus, des études montrent que cet infiltrat lymphocytaire présente une signature moléculaire de type Th1 (T-bet, interféron regulator factor 1, IFN- γ) et de type T cytotoxique CD8+ (CD8 α , perforine, granzyme) (Galon et al, 2006, Pagès et al, 2009).

Ces résultats suggèrent donc une relation entre la progression tumorale et la réponse lymphocytaire T intra-tumorale, la réponse Th1 et CD8 cytotoxique semblant avoir un rôle anti-tumoral. Ces données permettent d'envisager des protocoles d'immunomodulation thérapeutique dans la prise en charge des CCR.

2.3. Les lymphocytes intra-tumoraux en fonction du mode d'oncogénèse

Quelques études ont tenté de préciser les relations entre la réponse immunitaire et la voie d'oncogénèse des CCR, les CCR de type MSI étant morphologiquement riches en éléments lymphocytaires, à la fois dans le stroma, et dans la composante épithéliale.

Une étude récente du transcriptome dans une large cohorte de patients atteints de CCR a permis d'identifier 6 groupes de CCR, isolant clairement les CCR de type MSI, se caractérisant par une signature immunitaire surexprimée, incluant des gènes de cytotoxicité, des gènes du TCR et des gènes impliqués dans la présentation antigénique (Marisa et al, 2013). Plus précisément, l'infiltrat lymphocytaire T de phénotype Th1 et CD8+ est plus dense dans les CCR MSI que dans les CCR MSS (Llosa et al, 2015), et les CCR MSI sont plus riches en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques au contact des cellules tumorales (TIL-IEL) (Jass et al, 1998 ; Dolcetti et al, 1999 ; Guidoboni et al, 2001). Certains auteurs ont enfin associé cet infiltrat en TIL-IEL CD8+ cytotoxiques à une meilleure survie dans les CCR MSI, (Guidoboni et al, 2001 ; Deschoolmeester et al, 2010).

Les CCR MSI étant considérés de meilleur pronostic que les CCR MSS (Jass et al, 1998 ; Samowitz et al, 2001), ces données sur la réponse immunitaire suggèrent un rôle important de l'infiltrat lymphocytaire T, et plus particulièrement des TIL-IEL dans le contrôle de la progression tumorale. Certains font le lien entre la plus grande immunogénicité des CCR MSI et le phénotype RER par l'accumulation de mutations frameshift et donc la synthèse de néopeptides (Woerner et al, 2001).

Cependant, malgré cet environnement immunitaire riche en lymphocytes T effecteurs Th1 et CD8 cytotoxiques, la même équipe de Llosa identifie également, et de façon surprenante, dans les CCR MSI, l'expression accrue de molécules inhibitrices ou tolérogènes, dont PD-L1, pouvant correspondre à des mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire effectrice (Llosa et al, 2015). Ces données suggèrent par conséquent une balance entre la réponse immunitaire effectrice, anti-tumorale, et la mise en place de mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire, même dans les CCR MSI.

Bien que de nombreuses études aient montré une relation étroite entre 1) la densité des TIL CD8+ et Th1, et le statut MSI ; et 2) le statut MSI et un meilleur pronostic, la fonction biologique précise des TIL et leur responsabilité exacte dans le bénéfice de survie de ces

patients n'est pas encore clairement établi. De même, l'existence potentielle et la nature des interactions entre les lymphocytes T et les cellules tumorales, via notamment des interactions récepteurs-ligands sont peu étudiées, notamment en fonction du mode d'oncogénèse.

III- La molécule HLA-E/ β 2m

3.1. Définition

La molécule HLA-E (Human Leukocyte Antigen-E), est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe Ib, non classique. Le gène HLA-E présente une organisation en 8 exons, commune à celles des autres molécules HLA-I. Le gène HLA-E code pour une glycoprotéine transmembranaire de 358 acides aminés (soit 2 à 4 acides aminés de moins que les molécules HLA-A/-B/-C du CMH de classe Ia). Les deux isoformes protéiques efficaces de HLA-E ne diffèrent que par un seul acide aminé situé à la position 107 et caractérisé par la substitution d'une Arginine par une Glycine. Cette molécule est donc très peu polymorphe, ce qui suggère un rôle important dans l'immunité innée. La molécule HLA-E n'est fonctionnelle que couplée sous la forme d'un hétérodimère avec la chaîne β 2microglobuline (Braud et al, 1997, 1998).

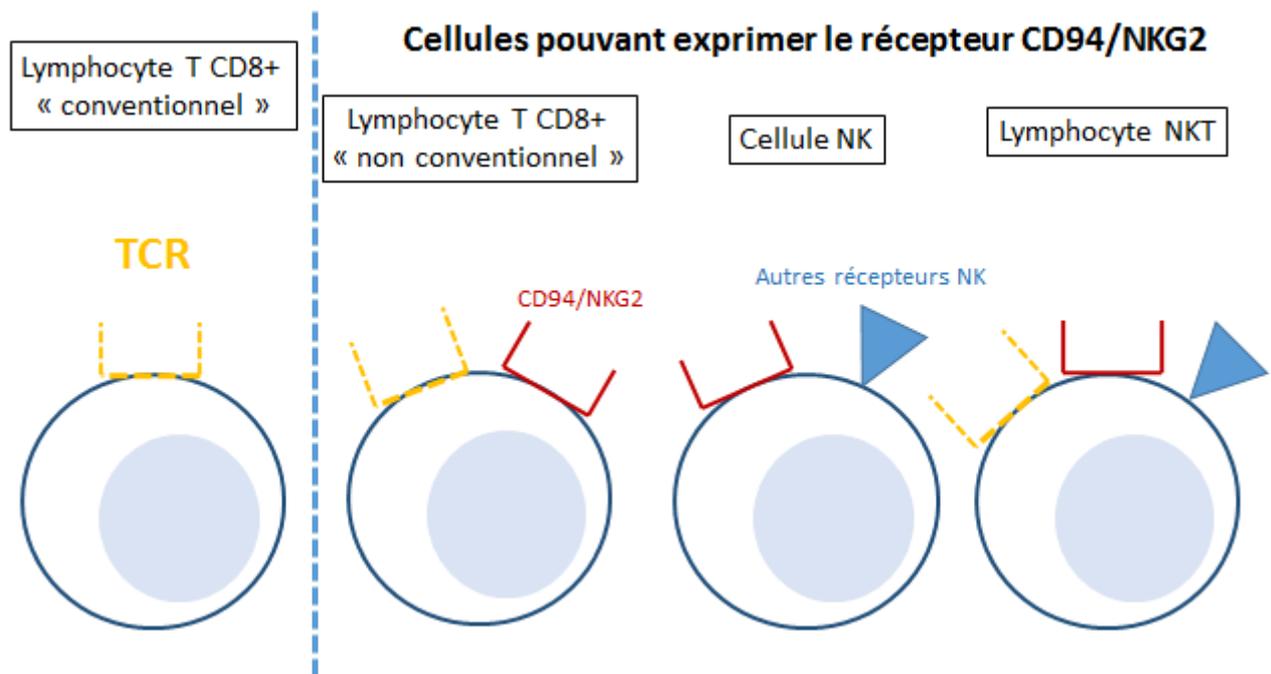
L'expression de la molécule HLA-E est ubiquitaire mais faible, et dépend de l'expression concomitante des molécules du CMH I classiques (Ia, HLA-A, B, C). Elle est plus intensément exprimée par les lymphocytes et les cellules endothéliales.

3.2. Les récepteurs de HLA-E/ β 2m : les récepteurs CD94/NKG2

Les molécules du CMH de classe I classiques interagissent avec le TCR (T cell receptor) des lymphocytes T CD8+ de l'immunité adaptative. Ces TCRs sont hautement polymorphes, et spécifiques d'un peptide donné. A l'inverse, la molécule HLA-E du CMH-I non classique, peu polymorphe, interagit préférentiellement des cellules de l'immunité innée, via des récepteurs de la famille des récepteurs de type lectine-C, CD94/NKG2, invariants, et qui peuvent être activateur ou inhibiteur.

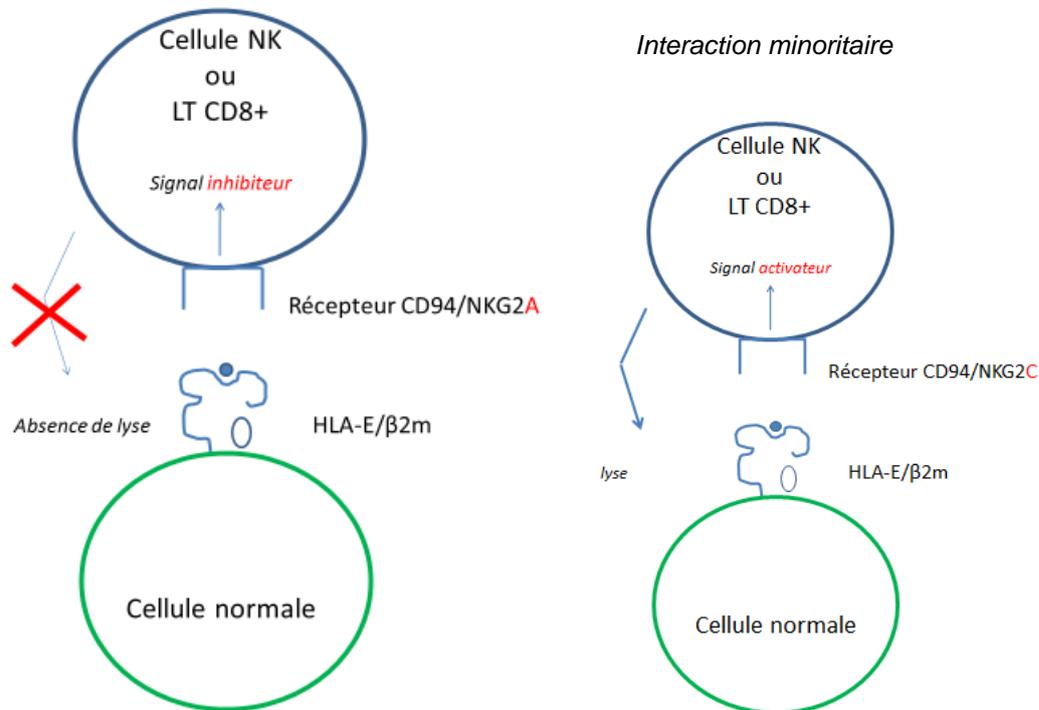
Ces récepteurs sont des hétérodimères, formés par l'association de la molécule invariante CD94 et d'une glycoprotéine NKG2, soit inhibitrice (NKG2A) soit activatrice (NKG2C). Ces récepteurs CD94/NKG2 sont majoritairement exprimés par les cellules NK, mais peuvent également être exprimés par une sous-population de lymphocytes T CD8+ et par des lymphocytes dits NKT (Braud et al, 1998 ; Derre et al, 2002, Ota et al, 2005)(figure 7). Les lymphocytes NKT expriment à leur surface, à la fois des récepteurs NK, et des TCR, et ont la capacité de sécréter rapidement des cytokines (Kronenberg M, 2005).

Figure 7. Schéma de lymphocyte conventionnel et de lymphocytes pouvant exprimer CD94/NKG2.



L'interaction de HLA-E/ β 2m avec l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A est 6 à huit fois plus forte qu'avec l'hétérodimère activateur CD94/NKG2C. Cette différence d'affinité est due au polymorphisme des acides aminés (Valez-gomez 1999, Sullivan LC, 2008). En outre, le récepteur CD94/NKG2A est exprimé de façon prédominante (20 fois plus de transcrits produits) (Brostjan et al, 2002). La molécule HLA-E interagit donc préférentiellement avec le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A (figure 8).

Figure 8. Schéma de l'interaction entre HLA-E/ β 2m et son récepteur CD94/NKG2A



3.3. Le rôle biologique de HLA-E

Dans les conditions physiologiques, les molécules HLA-E présentent majoritairement des peptides du soi issus des autres molécules du CMH-I classique. Les effecteurs T, NKT ou NK exprimant majoritairement la forme inhibitrice CD94/NKG2-A, l'expression des molécules HLA-E joue un rôle prépondérant dans la tolérance périphérique au soi et le contrôle des réponses immunitaires. En revanche, l'expression et le répertoire peptidique des molécules HLA-E peuvent être modifiés à la surface des cellules du soi transformées (infectées ou tumorales) et ainsi influencer leur sensibilité à la lyse par les cellules NK et T. Plusieurs virus sont capables de fournir des peptides alternatifs, permettant à la fois de stabiliser l'expression des molécules HLA-E à la surface des cellules infectées et d'interagir avec les récepteurs CD94/NKG2.

3.4. HLA-E/ β 2m dans les cancers

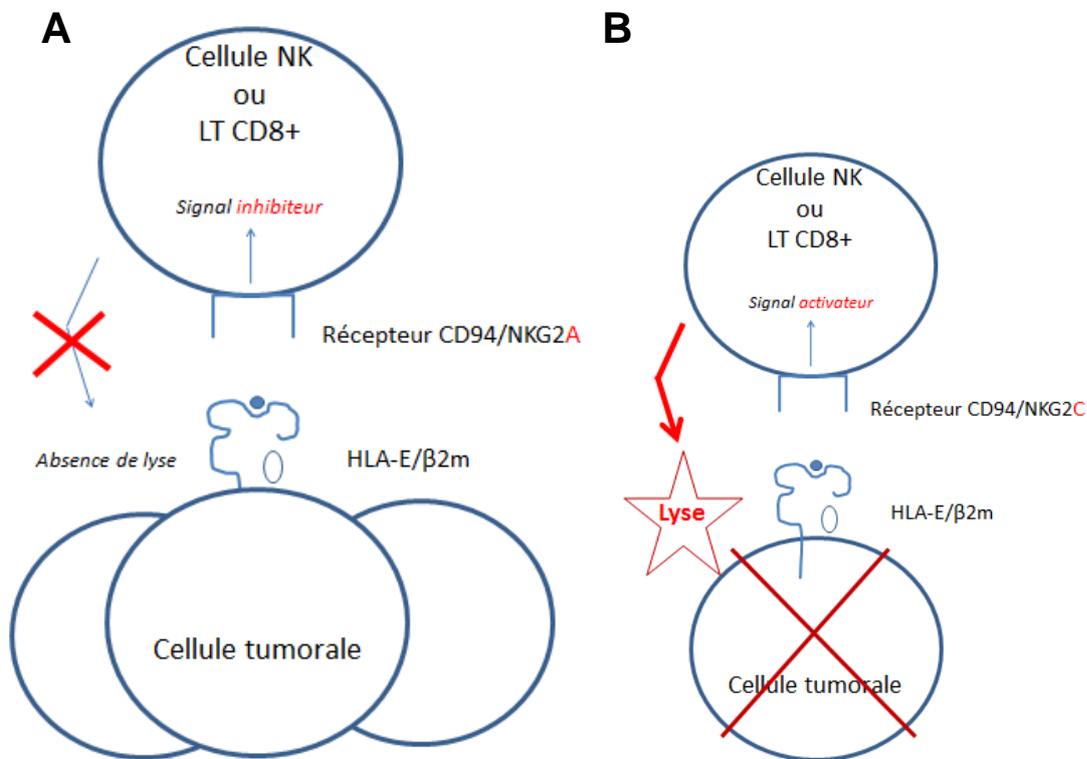
En pathologie tumorale, plusieurs études descriptives et fonctionnelles *in vitro* suggèrent que HLA-E joue un rôle dans l'échappement tumoral au système immunitaire.

Une surexpression de HLA-E par les cellules tumorales a été décrite dans les tumeurs gliales, le cancer de l'ovaire, le cancer du col, le cancer du sein et le cancer colorectal (Mittelbronn et al, 2007 ; Lévy et al 2008, de Kruijf et al, 2010 ; Gooden et al, 2012, Bossard et al, 2012). Cette surexpression de HLA-E est associée à une augmentation des TIL-IEL CD8+ et CD94+ dans le cancer de l'ovaire (Gooden et al, 2012), et le cancer colorectal (Bossard et al, 2012). Par ailleurs, il a été montré que les TIL-IEL CD8+ expriment le récepteur CD94/NKG2A dans les cancers gynécologiques (Sheu et al, 2005 ; Chang et al, 2005). De plus, cette surexpression de HLA-E est associée à un pronostic défavorable dans les cancers de l'ovaire (Gooden et al, 2012) et les CCR, (Bossard et al, 2012), ou associée à une rechute précoce dans le cancer du sein (de Kruijf et al, 2010) suggérant que la surexpression d' HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales constitue un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire permettant aux cellules tumorales d'interagir avec des cellules immunitaires tolérogènes et favorisant ainsi la progression tumorale (figure 9).

En effet, d'un point de vue fonctionnel, la surexpression de HLA-E par les cellules tumorales de lignées de mélanome et de CCR diminue leur sensibilité à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules NK (Derré et al, 2006 ; Levy et al, 2008).

Enfin, les cellules tumorales peuvent produire une forme soluble de HLA-E, HLA-Es, et cette forme soluble peut être détectée dans le sérum des patients atteints de mélanome notamment (Allard et al, 2011).

Figure 9. Schéma de l'interaction entre HLA-E/ β 2m à la surface d'une cellule tumorale et de son récepteur CD94/NKG2 : un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire dans le cas du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A.



A. Interaction entre une cellule tumorale exprimant HLA-E/ β 2m et le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A : inhibition de l'activité cytolytique anti-tumorale, correspondant à un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire. B. Interaction entre une cellule tumorale exprimant HLA-E/ β 2m et le récepteur activateur CD94/NKG2C : persistance de l'activité cytolytique anti-tumorale.

Ces résultats posent donc plusieurs questions dans le cadre des CCR :

- la surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales et la densité des TIL-IEL CD94+ est-elle subordonnée à la voie d'oncogénèse, MSI ou MSS ?
- la densité en TIL-IEL CD94+ influence-t-elle de la même façon le pronostic que la surexpression de HLA-E/ β 2m ?
- si oui, cette influence pronostique est-elle également subordonnée à la voie d'oncogénèse ?
- la forme soluble de HLA-Es est-elle détectable chez les patients atteints d'un CCR et associée à des caractéristiques anatomo-cliniques particulières ?

BUTS DE L'ETUDE

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail sont de déterminer ;

- 1) l'expression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales en fonction de la voie d'oncogénèse, MSI ou MSS,
- 2) la corrélation entre l'expression de HLA-E/ β 2m et la densité en TIL-IEL CD94/NKG2+, en fonction de la voie d'oncogénèse,
- 3) l'impact pronostique de la densité des TIL-IEL CD94+ en fonction du statut MSI/MSS des CCR
- 4) si la forme soluble de HLA-E est détectable dans le sérum des patients atteints de CCR.

PATIENTS ET METHODES

I- Patients

Cette étude a permis d'inclure 234 patients opérés d'un CCR au CHU de Nantes entre 1998 et 2014, et pour lesquels nous disposions d'un échantillon paraffiné de tumeur et de muqueuse colique normale appariée, archivés dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques. Parmi ceux-ci, 80 ont fait l'objet de l'étude précédente sur le statut de HLA-E dans les CCR (Bossard et al, 2012). Cette cohorte a donc été incrémentée par 104 nouveaux patients, inclus rétrospectivement et 50 autres inclus prospectivement entre janvier 2011 et avril 2014. Pour ces 50 derniers patients nous avons disposé en complément des prélèvements tissulaires d'un tube de sang de 10ml sur tube sec prélevé au moment de l'intervention chirurgicale pour le dosage de HLA-E sérique. Etant donné le manque de données évolutives pour les patients âgés, et l'impact pronostique majeur de l'âge sur la survie des patients atteints de CCR (Wang et al, 2015) nous avons restreint les analyses de survie aux patients de moins de 75 ans (âge maximum concerné par le dépistage du CCR). Etaient exclus de l'étude, les patients atteints du syndrome de Lynch ou HNPCC, ou de PAF, les patients ayant eu un traitement néo-adjuvant (chimiothérapie et/ou radiothérapie), et ceux pour lesquels le matériel tissulaire disponible pour les études morphologiques et de biologie moléculaire était insuffisant ou inadéquat. Cette étude a été réalisée en accord avec les règles d'éthique émises par notre institution.

II- Recueil des données cliniques

Pour chaque patient, le sexe, l'âge, la date d'intervention, la localisation tumorale, le sous-type histologique défini selon la classification OMS 2010, le stade pTNM selon la 7^{ème} édition de la classification des tumeurs publiée par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer), ainsi que la date de métastase, de récurrence ou de décès lié au cancer, et la date de dernière visite ont été recueillis.

Pour les analyses de survie, la survie globale était mesurée depuis la date d'intervention jusqu'au décès ou jusqu'à la date de dernière visite, la survie sans progression depuis la date

d'intervention jusqu'à la date de métastase ou de récurrence ; et pour les patients déjà métastatiques, depuis la date d'intervention jusqu'à la date de progression ou de décès.

La durée de suivi a été censurée à 5 ans.

III- Construction de Tissue Microarray

Treize Tissue Microarray (TMA) avaient d'ores et déjà été construits, 3 TMA ont été nouvellement réalisés. Les zones représentatives de chaque tumeur ont été sélectionnées à partir des coupes colorées à l'HES. Pour chaque patient, 3 carottes (1 mm de diamètre) de tissu tumoral, et 1 carotte de muqueuse colique normale ont été incluses dans un bloc de paraffine receveur.

Photographies d'un bloc de Tissue MicroArray et d'une lame HES obtenue à partir d'un bloc de TMA :



IV- Etude Immunohistochimique

4.1. Anticorps utilisés.

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur un automate (Dako, Autostainer Link 48) sur des coupes de 5 μ déparaffinées, issues des TMA avec les anticorps suivants :

- **HLA-E** (anticorps monoclonal de souris, clone MEM-E/02, 1/200^{ème}, Serotec),
- **β 2microglobuline** (anticorps monoclonal de souris, clone SC11.1, 1/200^{ème}, don de Mme Gaschet U892),
- **CD8** (anticorps monoclonal de souris, clone C8/144B, 1/50^{ème}, Dako), exprimé par les lymphocytes T cytotoxiques,

- **CD94** (anticorps monoclonal de souris, clone B-D49, 1/20^{ème}, Diaclone),
- **NKp46** (anticorps monoclonal de souris, clone 195314, 1/100^{ème}, R&D Systems) marqueur spécifique des cellules NK.

4.2. Evaluation de l'expression des anticorps.

L'expression de HLA-E et β 2m par les cellules tumorales a été évaluée de manière semi-quantitative en fonction de l'intensité du marquage d'au moins 5% de cellules tumorales par rapport à l'intensité de marquage des cellules épithéliales de la muqueuse colique normale appariée, selon le score utilisé dans notre étude précédente (Bossard et al, 2012) (Figure 10 et 11).

0 : pas d'expression de l'antigène par les cellules tumorales (avec témoin intrinsèque positif),

1 : expression de l'antigène par les cellules tumorales avec intensité de marquage identique à celle des cellules épithéliales normales,

2 : expression de l'antigène avec intensité de marquage des cellules tumorales supérieure à celle des cellules épithéliales normales.

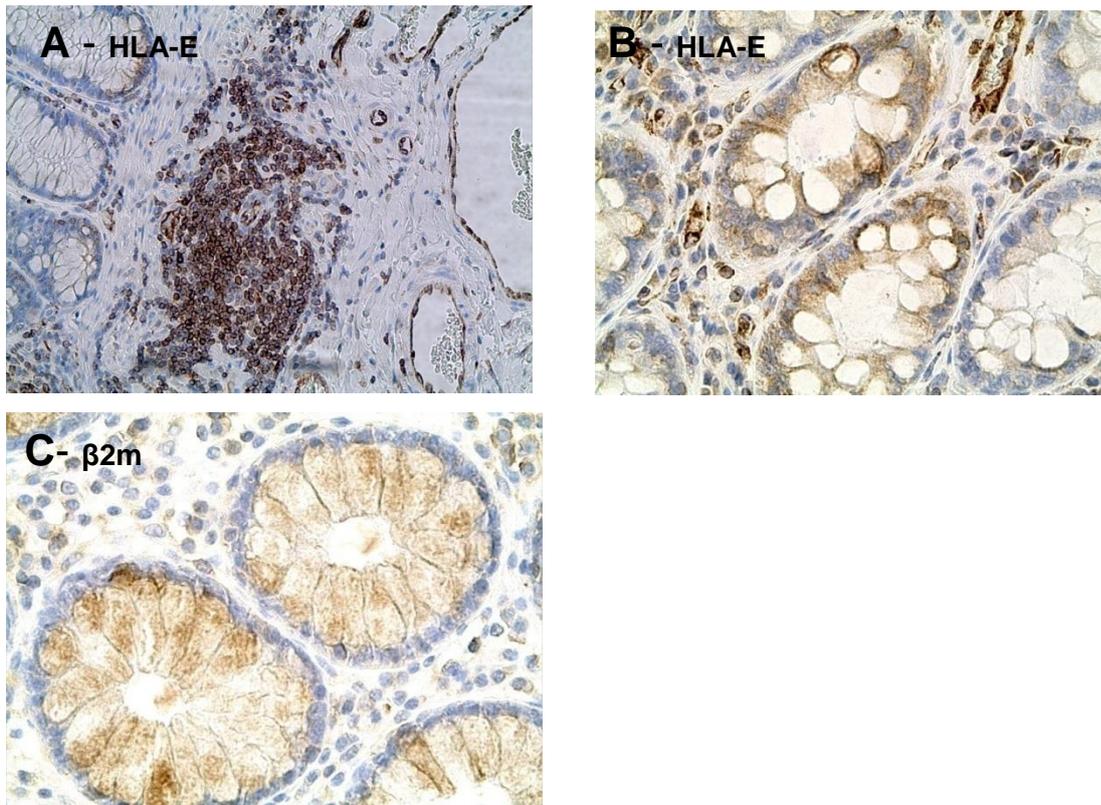
Les témoins intrinsèques positifs considérés pour l'expression de HLA-E étaient les cellules endothéliales et les lymphocytes du chorion. Notre étude précédente a permis de montrer que les cellules épithéliales de la muqueuse colique normale expriment pas ou peu HLA-E (score 0 ou 1). Le profil d'expression de β 2m est identique à celui de HLA-E dans la muqueuse colique normale.

Une surexpression de HLA-E/ β 2m était retenue quand les 2 antigènes étaient co-exprimés par les cellules tumorales, avec un score = 2 pour HLA-E et un score = 1 ou 2 pour β 2m.

		B2m		
		0	1	2
HLA-E	0			
	1			
	2			

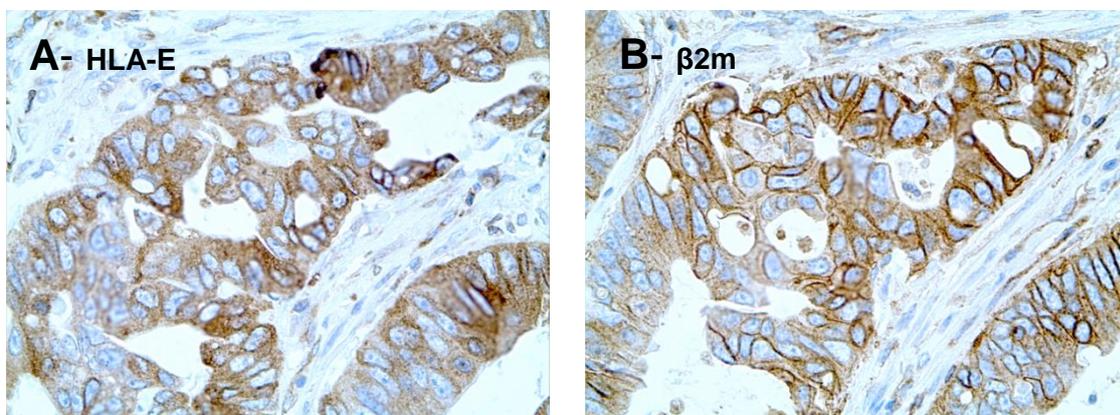
Cases grisées : cas retenu comme présentant une surexpression de HLA-E/ β 2

Figure 10. Expression tissulaire de HLA-E et β 2m dans la muqueuse colique normale.



Dans la muqueuse colique normale, les lymphocytes et les cellules endothéliales expriment toujours HLA-E (témoin intrinsèque positif) (A), alors que les cellules épithéliales n'expriment pas (A, score 0, x200) ou peu HLA-E (B, score 1, x400). L'expression de β 2m, dans la muqueuse colique normale, est parallèle à celle de HLA-E (C, score 1, x400).

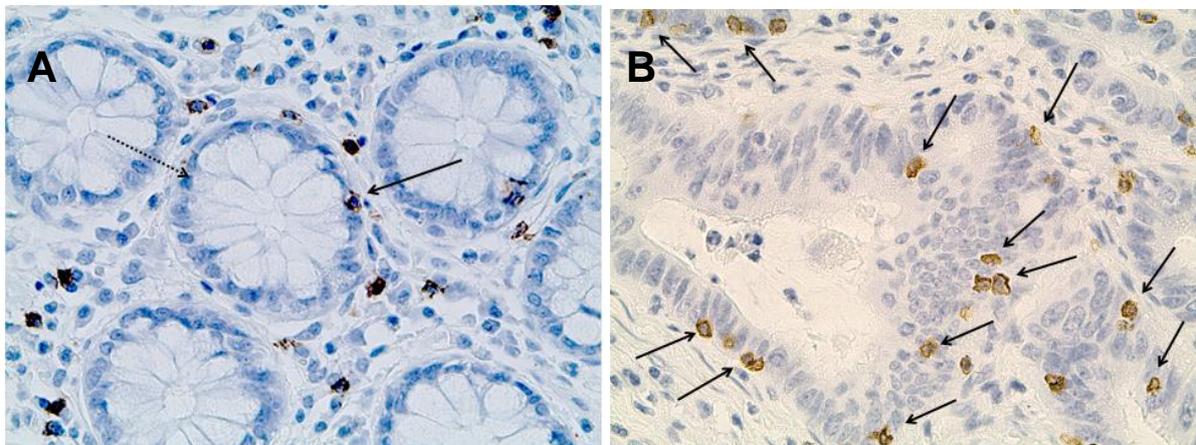
Figure 11. Exemple de surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales dans un CCR.



Exemple de CCR présentant une surexpression de HLA-E (A, score 2, x400) et de β 2m (B, score 2, x400) par les cellules tumorales.

Pour les TIL, seuls ceux en contact étroit avec les cellules tumorales (TIL-IEL) ont été pris en compte de la façon suivante : la densité en TIL-IEL CD8+, CD94+ et NKp46+ a été évalué en comptant le nombre de cellules marquées dans 3 champs différents à l'objectif 20 correspondant à la surface d'un spot de TMA, par rapport au nombre de cellules épithéliales (normales ou tumorales) comptées dans ces 3 mêmes champs (Figure 12). Ce nombre a ensuite été exprimé en pourcentage de cellules épithéliales.

Figure 12. Exemple de lymphocytes intra-épithéliaux CD8+ dans une muqueuse colique normale et dans un CCR.



A. *Flèche pointillée : cellule épithéliale normale au fond d'une crypte, flèche pleine : IEL CD8+ au contact des cellules épithéliales normales (x400)*

B. *Flèche pleine : TIL-IEL CD8+ au contact des cellules tumorales (x400) dans un CCR*

V- Dosage de HLA-E soluble

Le dosage de HLA-Es a été réalisé sur le sérum récupéré à partir du sang de 50 patients inclus prospectivement, et de 43 donneurs sains en tant que contrôle, issus de prélèvements de l'EFS (Etablissement Français du sang), après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes. Le dosage à proprement parlé a été réalisé par technique ELISA de type sandwich, en collaboration avec l'équipe 3 de l'U892 qui a mis au point cette technique (Allard et al, 2011). L'anticorps de capture était le MEM-E/08, l'anticorps primaire était le MEM-E/07 biotinylé (Exbio, Czech Republic). Le complexe enzymatique se fixant sur l'anticorps primaire biotinylé était streptavidine Horse Radish Peroxydase, le substrat était le

TMB (tétraméthylbenzidine). La réaction était stoppée à l'aide d'acide phosphorique. Enfin, l'absorbance était mesurée à 450 nm par un spectrophotomètre, et les résultats analysés à l'aide d'un logiciel (Prism 5 software).

Le dosage était considéré comme positif à partir de 5pg/mL.

VI- Détermination du statut MSI/MSS

La détermination du statut MSI/MSS a été réalisée par technique de biologie moléculaire. L'ADN tumoral a été extrait pour l'ensemble de la cohorte à partir d'une coupe tissulaire formolée et incluse en paraffine. La zone tumorale a été repérée sur lame colorée à l'HES, puis délimitée sur les lames blanches. Les coupes épaisses étaient alors macro-disséquées à l'aide d'un scalpel au niveau de la zone d'intérêt. Le matériel était digéré par 1 mL de tampon de lyse et 10 µL de protéinase K pendant au moins 5h à 55°. La paraffine était ensuite éliminée et l'extraction de l'ADN génomique était réalisée par un automate d'extraction iPrep avec le kit iPrep™ ChargeSwitch® Forensic (Invitrogen). On recueillait un tube d'ADN de 75µL.

Le statut MSI a été déterminé par analyse des séquences microsatellites par PCR pentaplex pour les marqueurs microsatellites BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22, NR-24 validés antérieurement (Suraweera et al, Gastroenterology, 2002) (sur thermocycleur DNA engine MJ research PTC 200) suivi d'un génotypage (séquenceur capillaire ABI3130xl). Les résultats étaient ensuite analysés à l'aide du logiciel GeneMapper v4.

Le statut MSS est défini par l'ensemble des 5 marqueurs stables alors que le statut MSI est défini par au moins 2 marqueurs instables (MSI-High), selon les critères internationaux de Bethesda (Boland et al, 1998).

VII- Analyses statistiques

L'ensemble des données anatomo-cliniques, immunohistochimiques et moléculaires a été inclus dans une base de données.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour étudier la relation entre la densité, le phénotype de l'infiltrat en TIL-IEL, la surexpression de HLA-E/β2m, le taux de HLA-Es et la voie

d'oncogénèse (MSI/MSS). Le test du Chi-2 ou le test exact de Fischer ont été utilisés pour étudier la relation entre les données anatomo-cliniques, la surexpression de HLA-E/ β 2m et la voie d'oncogénèse. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism v 4. Une valeur de p inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

Des analyses univariées et multivariées ont été effectuées selon le modèle de régression de Cox, incluant l'âge, le stade, la densité en TIL-IEL CD8+ et CD94+, en variable continue ou non continue, et le statut MSI/MSS. L'HR et l'intervalle de confiance à 95% étaient analysés pour chaque association.

Les courbes de survie ont été construites suivant la méthode de Kaplan-Meier. Le test du log-rank a été utilisé pour comparer les différents groupes. Dans le cas d'une corrélation statistiquement significative, la valeur séparant les 2 groupes permettant d'obtenir la différence de survie la plus grande a été choisie comme valeur seuil.

RESULTATS

I- **Caractéristiques anatomo-cliniques des patients inclus dans l'étude**

Nous avons identifié 47 CCR MSI (20 %) et 187 CCR MSS (80 %). Les caractéristiques anatomo-cliniques (tableau 2) des 2 cohortes de patients étaient superposables. Les patients ayant un CCR MSI étaient préférentiellement de sexe féminin, avaient une tumeur localisée le plus souvent au niveau du colon droit, un stade pT plus avancé mais un stade pM moins avancé. Ces CCR MSI étaient le plus souvent de sous type histologique médullaire ou mucineux.

II- **La surexpression de HLA-E/ β 2m était plus fréquente dans les CCR MSI que dans les CCR MSS**

Une surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales était retrouvée dans 23,9 % de la cohorte complète (56/234) et dans 23% (30/130) des patients de moins de 75 ans. Les CCR présentant une surexpression de HLA-E/ β 2m étaient dans 23,5 % des stades I (4/17), dans 22,3 % des stades II (17/26), dans 29,5% des stades III, dans 20,9% des stades IV (figure 13). Cette surexpression était plus fréquente dans les CCR MSI (n= 21/47 ; 44,6 %) que dans les CCR MSS (n= 35/187 ; 18,4 %) (test du chi² : p= 0,0001, figure 14) au sein de la cohorte complète. La même tendance était retrouvée au sein de la population de moins de 75 ans (7/21 ; 33 % dans les CCR MSI et 21/109 ; 19,2 % dans les CCR MSS).

Tableau 2. Caractéristiques anatomo-cliniques des patients MSI et des patients MSS.

	Cohorte complète			Population de moins de 75 ans		
	N = 234		P value	N = 130		P value
	MSI-H N = 47 (20%) (N, %)	MSS N = 187 (80%) (N, %)		MSI-H N = 21 (16%) (N, %)	MSS N = 109 (84%) (N, %)	
Age (années)						
Moyenne (extrêmes)	74,2 (48 – 89)	69,7(36 - 94)		64,1(48-74)	61,3(36- 94)	
Sexe						
Hommes	13 (27,7 %)	122 (65,3%)	3.10 ⁻⁶	7 (33,3%)	68 (62,4 %)	0,01
Femmes	34 (72,3 %)	65 (34,7%)		14 (66,7%)	41 (37,6 %)	
Localisation tumorale						
Colon droit	43 (91.5%)	86 (46%)	2.10 ⁻⁸	20 (95,3 %)	40 (36,7%)	8.10 ⁻⁷
Colon gauche	2 (4.25%)	92 (49,2%)		1 (4,7 %)	63 (57,8%)	
Colon transverse	2 (4.25%)	6 (3,2%)		0	3 (2,75%)	
Rectum	0	3 (1,6%)		0	3 (2,75%)	
Sous type histologique						
Adénocarcinome not otherwise specified (NOS)	26 (55,3%)	154 (82,4%)	8.10 ⁻⁵	14 (66,6%)	90 (82.5%)	0,03
Adénocarcinome mucineux	13 (27,7%)	20 (10,7%)	0,005	6 (28,6%)	12 (9%)	0,03
Adénocarcinome médullaire	4 (8.5%)	3 (1.6%)	0,03	1 (4,8%)	2 (1,5 %)	0,4
Mixte	2 (4,3%)	6 (3,2%)		0	1 (0,7%)	
Adénocarcinome à cellules indépendantes	1 (2,1%)	1 (0,5%)		0	1 (0,7%)	
Adénocarcinome peu différencié	1 (2,1%)	2 (1,1%)		0	2 (1,5 %)	
Adénocarcinome festonné	0	1 (0.5%)		0	1 (0,7%)	
Classification pT						
pT0	0	2 (1%)		0	2 (1.8%)	
pT1	0	10 (5.3%)		0	6 (5.5%)	
pT2	1 (2%)	13 (7%)		1 (4.7%)	6 (5.5%)	
pT3	30 (63.8%)	122 (65.2%)		14 (66.6%)	70 (64.2%)	
pT4	16 (34%)	40 (21.4%)	0,02	6 (28.5%)	25 (23%)	0,4
Classification pN						
inconnu	3 (6,4%)	7 (3,7%)			3 (2,8 %)	
pN0	21 (44,7%)	74 (39,6%)		11 (52,4%)	52 (49%)	
pN1-N2	23 (48,9%)	106 (56,7%)		10 (47,6%)	54 (51%)	
Métastase à distance						
Non	41 (87.2%)	133 (71,2%)	0.02	18 (85,7%)	70 (64,3%)	0,04
Oui	6 (12.8%)	54 (28,8%)		3 (14,3%)	39 (35,7%)	
Survie à 5 ans						
Taux (95% CI)	30 (63,8%)	128 (68,4%)		15 (71,4%)	76 (69,7%)	

Figure 13. Répartition des CCR présentant une surexpression de HLA-E/ β 2m en fonction du stade

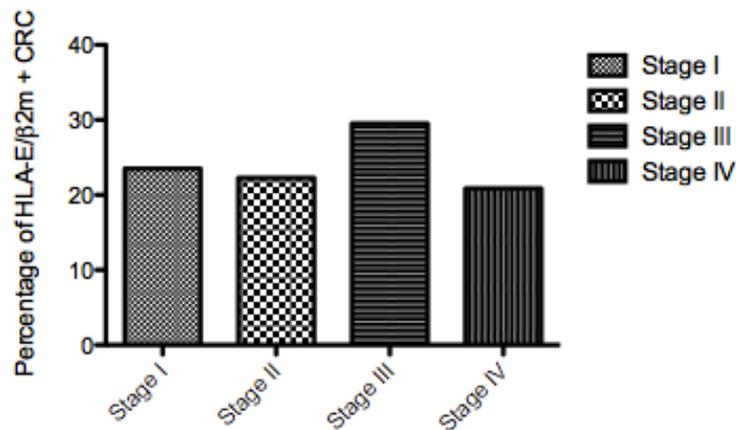
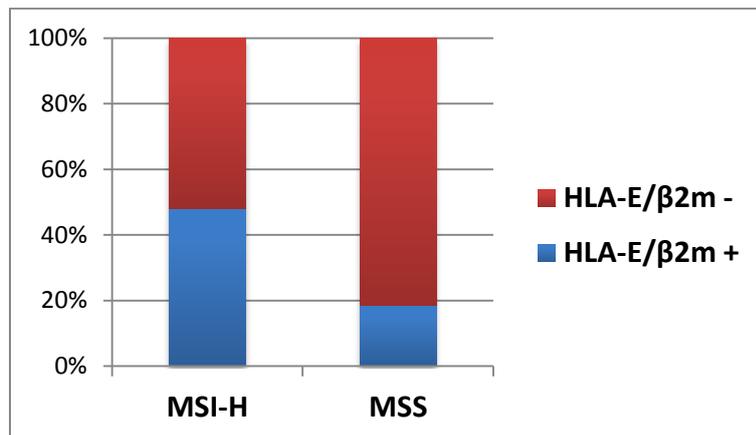


Figure 14. Relation entre la surexpression de HLA-E/ β 2m et le statut MSI/MSS dans les CCR.



III- La densité en TIL-IEL exprimant CD94/NKG2, le récepteur de HLA-E, était plus importante dans les CCR ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m

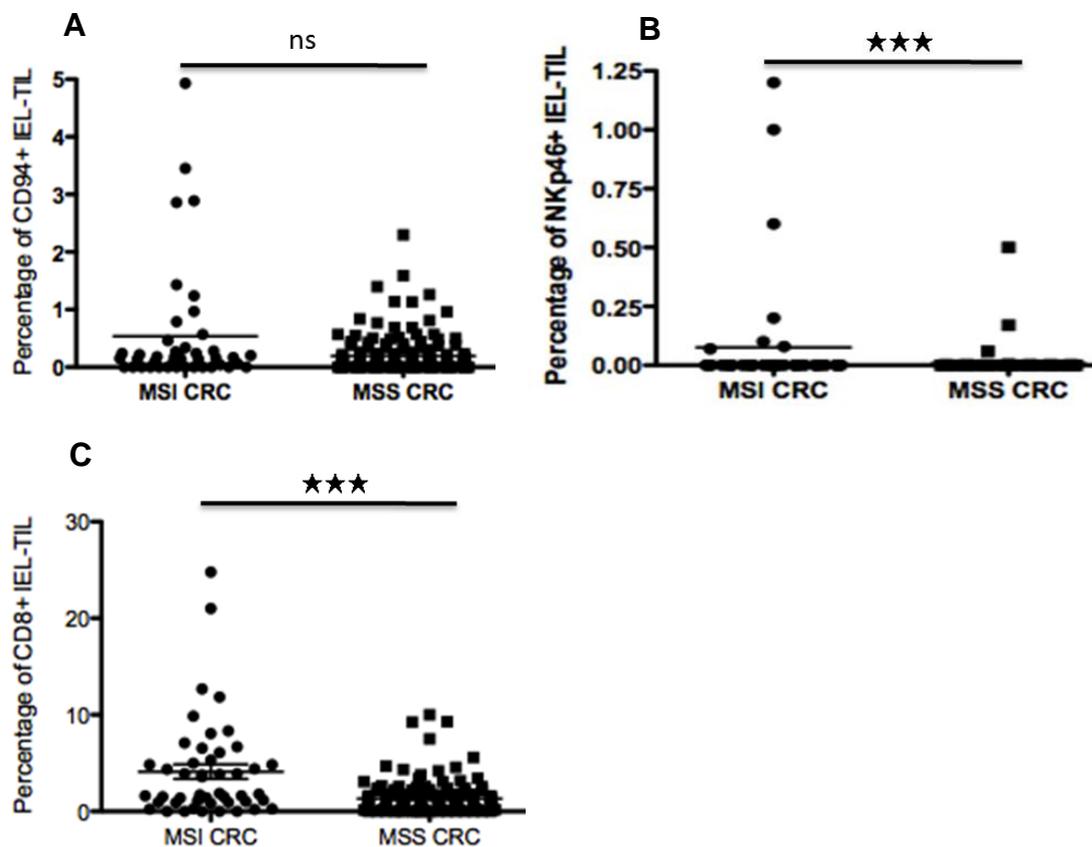
Etant donné que le récepteur CD94/NKG2 est préférentiellement exprimé par les cellules NK (Walzer et al, 2007), nous avons étudié la densité en cellules NK intra-épithéliales dans les CCR et dans la muqueuse colique normale, en utilisant un anticorps spécifique des cellules NK, NKp46. De plus, ce récepteur pouvant aussi être exprimé à la surface d'un

contingent de lymphocytes T CD8+ (van Hall T, 2010), nous avons donc également étudié la densité en TIL-IEL CD8+.

Les densités en cellules CD94+, en cellules NKp46+, en lymphocytes CD8+ intra-épithéliaux étaient très faibles dans la muqueuse colique normale (en moyenne 0,0015%, 0 et 0,04% respectivement). En revanche, leurs densités étaient plus élevées dans les CCR.

La densité en TIL-IEL CD94+ était plus élevée dans les CCR MSI ($0.5\% \pm 0.16$) que dans les CCR MSS ($0.19\% \pm 0.02$), mais cette différence n'était pas significative ($p=0,09$) (figure 15A). Seulement 3% des CCR comportait des cellules NKp46+ intra-épithéliales, et leur nombre était très faible ($0,03\%$ en moyenne $\pm 0,01$). Cependant, la majorité des CCR contenant des cellules NKp46+ intra-épithéliales était des CCR MSI (10,6% vs 2,7% de CCR MSS), et leur densité était significativement plus élevée dans les CCR MSI ($0,07\%$ en moyenne $\pm 0,03$) que dans les CCR MSS ($0,005\% \pm 0,004$) ($p=0.001$) (Figure 15B). De même, la densité en TIL-IEL CD8+ était plus élevée dans les CCR MSI comparativement aux CCR MSS ($4.2\% \pm 0.74$ vs $1.2\% \pm 0.12$; $p < 0.0001$) (Figure 15C).

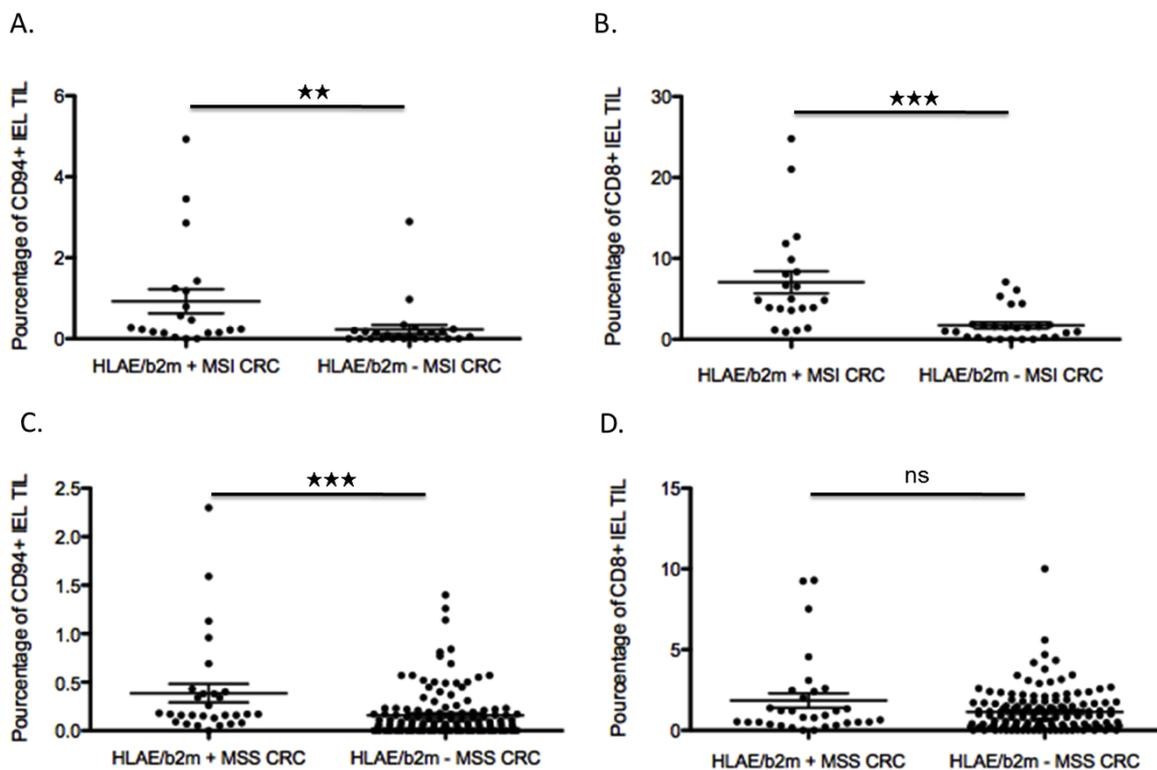
Figure 15. Densité des TIL-IEL CD94+, NKp46+ et CD8+ en fonction du statut MSI/MSS.



Lorsque l'on s'est intéressé à la densité en TIL-IEL en fonction de la surexpression de HLA-E/ β 2m dans chacun des groupes de CCR, il n'y avait pas de différence significative concernant les TIL-IEL NKp46+, probablement dû à leur faible nombre. Cependant, la densité en TIL-IEL CD94+ était plus élevée dans les CCR MSI ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m ($0.9\% \pm 0.2$) comparativement aux CCR MSI n'ayant pas de surexpression de HLA-E/ β 2m ($0.22\% \pm 0.11$) ($p = 0.001$) (Figure 16A). De même, la densité en TIL-IEL CD8+ était plus élevée dans les CCR MSI avec une surexpression de HLA-E/ β 2m ($7.05\% \pm 1.3$) que dans les CCR MSI sans surexpression de HLA-E/ β 2m ($1.7\% \pm 0.4$; $p = 0.0002$) (Figure 16B).

Dans les CCR MSS, nous avons observé la même tendance : la densité en TIL-IEL CD94+ était significativement plus élevée dans les CCR ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m ($0.38\% \pm 0.09$ vs $0.15\% \pm 0.02$; $p < 0.0001$) (Figure 16C), et la densité en TIL-IEL CD8+ était également plus élevée dans les CCR ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m ($1.83\% \pm 0.4$ vs $1.14\% \pm 0.1$; $p = 0.003$) mais de façon non significative ($p = 0.2$) (Figure 16D).

Figure 16. Densité des TIL-IEL CD8+ et CD94+ dans les CCR MSI et MSS en fonction de l'expression de HLA-E/ β 2m



IV- La forme soluble de HLA-E détectée dans le sérum était plus élevée chez les patients ayant un CCR de stade IV

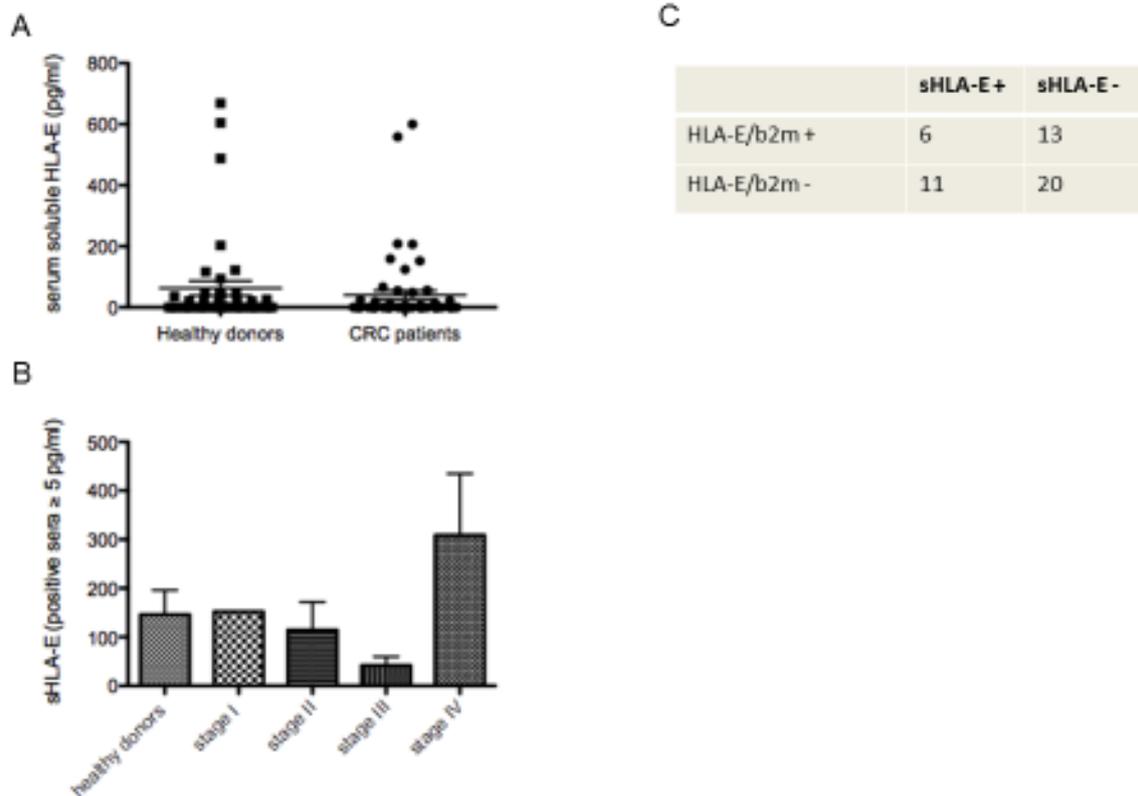
Nous avons pu effectuer le dosage de HLA-Es dans le sérum de 50 patients inclus prospectivement dans cette étude. Comparativement aux 43 donneurs sains, nous n'avons pas retrouvé de différence significative en terme de nombre de sérums positifs, de concentration moyenne de HLA-Es globale, ou de concentration moyenne de HLA-Es parmi les sérums positifs (Tableau 3, Figure 17A). Prenant en compte un seuil de positivité à 5pg/mL, nous avons détecté la forme soluble de HLA-E dans le sérum de 16 patients (16/50, 32 %) : 14% (1/7) avaient un CCR de stade I, 43% (10/23) un CCR de stade II, et 30% (3/10) un CCR de stade III ou un CCR de stade IV (3/10).

Parmi les patients pour lesquels la forme soluble de HLA-E était détectée dans le sérum, le taux moyen de HLA-E était plus élevé dans les stades IV comparativement aux autres stades : 152 pg/ml dans les stades I, 60 pg/ml dans les stades II ; 41,3 pg/ml dans les stades III and 308 pg/ml dans les stades IV (figure 17B). Et, le taux moyen de HLA-Es au sein des patients de stade IV était environ deux fois plus élevé que celui des donneurs sains (308 pg/ml vs 146 pg/mL ; $p=0,07$) (figure 17B). Enfin, chez les patients atteints de CCR, bien qu'il n'y ait pas de corrélation significative entre le taux de HLA-Es et l'expression tissulaire de HLA-E/ $\beta 2m$ (test du χ^2 , $p = 0,7$), il semblait néanmoins exister une relation inverse entre le taux de HLA-Es et l'expression tissulaire de HLA-E/ $\beta 2m$. Ainsi, HLA-Es était plus fréquemment détectable chez les patients ayant un CCR ne surexprimant pas HLA-E/ $\beta 2m$, et vice versa (Figure 17C).

Tableau 3. Analyse de HLA-E soluble : caractéristiques des patients et donneurs sains.

	Patients atteints de CCR N=50	Donneurs sains N=43	p
Age Moyenne (extrêmes)	71,8 (34-91)	42,5 (21-67)	
Sexe Masculin Féminin	33 17	23 20	
Concentration moyenne des sérums (pg/ml)	47 pg/ml	61 pg/ml	
Nombre de sérums positifs (> 5 pg/ml)	16 (32%)	18 (41,8%)	0.1
Concentration moyenne des sérums positifs (> 5pg/ml)	146,2 pg/ml	146 pg/ml	

Figure 17.



V- La densité en TIL-IEL CD94+ était un facteur de mauvais pronostic indépendant du stade chez les patients de moins de 75 ans

Comme attendu, les analyses de survie sur la cohorte complète montrait que l'âge apparaît significativement comme un facteur pronostic péjoratif en terme de survie globale (SG) (HR=1.04, CI 95% [1.01;1.06], p 0.0014) et de survie sans progression (SSP) (HR=1.02, CI 95% [1.00;1.04], p 0.03) en analyse multivariée. Nous avons donc restreint les analyses ultérieures de survie aux patients âgés de moins de 75 ans. Le résultat de ces analyses est résumé dans le tableau 4. A la fin du suivi censuré à 5 ans, 39 patients (30%) étaient décédés.

En analyse univariée, les patients ayant un CCR MSI avaient une meilleure SSP que les patients ayant un CCR MSS, et les patients ayant une densité élevée en TIL-IEL CD8+ avaient une meilleure SSP et SG à 5 ans. A l'inverse, les patients ayant une densité élevée en TIL-IEL

CD94+ avaient une moins bonne SG à 5 ans. En analyse multivariée, prenant en compte l'influence du stade, du statut MSS/MSI et la densité en TIL-IEL CD8 et CD94 (en tant que variables continues), seule la densité en TIL-IEL CD94+ apparaissaient comme un facteur pronostic, et de façon indépendante par rapport du stade (Tableau 4). En retirant le stade de cette analyse multivariée, une densité élevée en TIL-IEL CD8+ était associée à une meilleure SG (HR 0.7, CI 95% [0.5;0.97], log rank test p= 0.03) et SSP (HR 0.72, IC 95% [0.54 ; 0.97], log rank test p=0.03).

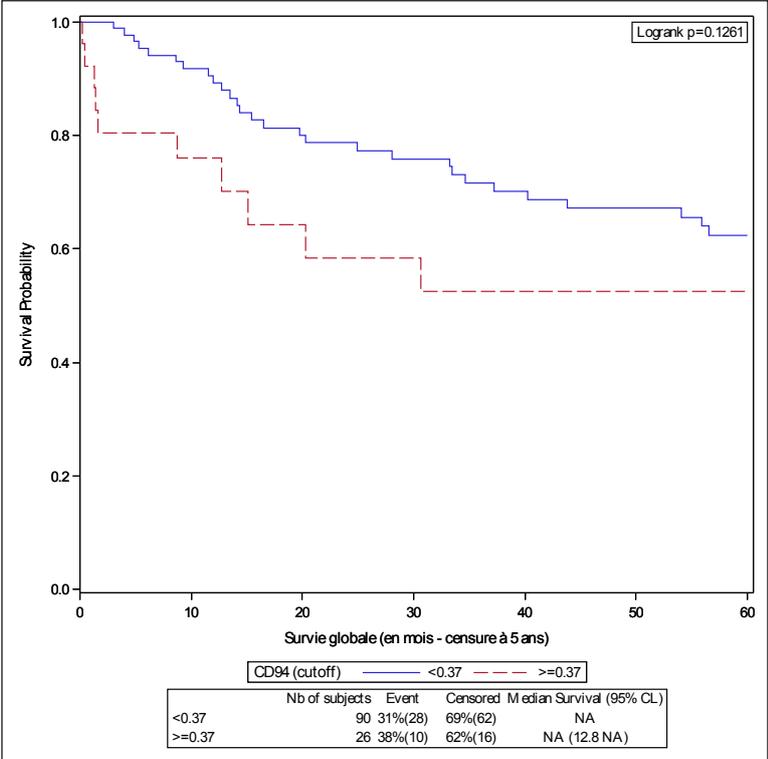
Tableau 4. Résultats des analyses univariée et multivariée sur la SG de la cohorte de patients de moins de 75 ans (n=130).

Survie Globale				
	Univariate Cox analysis		Multivariate Cox analysis	
	Hazard ratio	p-value	Hazard ratio	p-value
	(95% CI)		(95% CI)	
Stage III/IV vs I/II	5.08 (1.8-14.3)	0.002	4.55 (1.58-13.1)	0.005
CD8 (variable continue)	0.75 (0.55-1.03)	0.07	0.78 (0.57-1.07)	0.12
CD94 (variable continue)	1.46 (0.96-2.2)	0.07	1.67 (1.03-2.71)	0.03
MSI vs MSS	0.79 (0.33-1.9)	0.6	0.82 (0.32-2.15)	0.69
Survie Sans Progression				
	Univariate Cox analysis		Multivariate Cox analysis	
	Hazard ratio	p-value	Hazard ratio	p-value
	(95% CI)		(95% CI)	
Stage III/IV vs I/II	4.91 [2.09;11.5]	0.0003	1.63 [1.63;9.41]	0.0023
CD8 (variable continue)	0.77 [0.60;1.00]	0.052	0.79 [0.60;1.05]	0.10
CD94 (variable continue)	1.30 [0.85;1.98]	0.22	1.48 [0.92;2.39]	0.10
MSI vs MSS	0.66 [0.30;1.46]	0.30	0.85 [0.36;2.00]	0.71

Comme la densité en TIL-IEL CD94+ en tant que variable continue influençait significativement la SG à 5 ans, nous avons cherché à déterminer le meilleur seuil

permettant de stratifier les patients en 2 groupes en fonction de la densité en TIL-IEL CD94+. Pour ce faire, la plateforme de Biométrie du CHU a proposé d'utiliser un modèle statistique graphique (graphical diagnostic plot) et estimé la significativité du seuil ainsi déterminé par une méthode proposée par Contal et O'Quigley (Mandrekar JN, 2003 ; Williams C, 2006). Ainsi, le seuil de 0,37 % de TIL-IEL CD94+ a été individualisé, et après dichotomisation, une densité en TIL-IEL CD94+ $\geq 0,37$ % était associée à une survie globale plus courte, mais sans que la différence ne soit statistiquement significative ($p=0,12$) (figure 18).

Figure 18. Survie globale chez les patients de moins de 75 ans en fonction de la densité en TIL-IEL CD94+



DISCUSSION

Cette étude permet pour la première fois dans les CCR de montrer l'influence pronostique négative des TIL CD94+ en contact étroit avec les cellules tumorales. Nous avons récemment montré dans ce type de CCR que la surexpression par les cellules tumorales de HLA-E/ β 2m, le ligand de ce récepteur inhibiteur, était associée à une densité élevée de TIL-IEL CD94+ et à un pronostic défavorable (Bossard et al, 2012). Cette étude complète et précise ces résultats en montrant que ; 1) HLA-E/ β 2m est préférentiellement surexprimée dans les CCR de type MSI, 2) la densité en TIL-IEL CD94+ est plus élevée dans les CCR présentant une surexpression de HLA-E/ β 2m quelque soit le statut MSI ou MSS, 3) les TIL-IEL CD94+ correspondent majoritairement à des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques plutôt qu'à des cellules NK, et 4) la densité en TIL-IEL CD94+ est un facteur de mauvais pronostic, indépendant du stade.

Nous montrons pour la première fois dans cette étude que la surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales est subordonnée à la voie d'oncogénèse. En effet, HLA-E/ β 2m surexprimée de façon préférentielle dans les CCR MSI plutôt que dans les CCR MSS. Cette surexpression préférentielle dans les CCR MSI peut trouver une explication dans le fait que les CCR MSI sont associés à un micro-environnement immunitaire plus dense et un environnement cytokinique spécifique par rapport aux CCR de type MSS. En effet, une étude récente montre que les CCR MSI surexpriment, entre autre et de façon significative, le gène codant pour l'interferon gamma (IFN- γ), cytokine définissant la réponse immunitaire de type Th1 (Llosa et al, 2015). Or, des études *in vitro* réalisées sur différentes lignées de cellules tumorales ont montré que l'IFN- γ est capable d'induire l'expression de HLA-E par les cellules tumorales (Malmberg KJ, J Clin Invest, 2002). L'ensemble de ces données suggère donc que cette surexpression préférentielle de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales dans les CCR MSI pourrait être liée à une plus forte concentration d'IFN- γ dans le micro-environnement tumoral de ces cancers. Les CCR MSS ayant une surexpression de HLA-E/ β 2m pourraient correspondre à un sous-groupe minoritaire de CCR associé à une signature immunologique de type TH1 décrite par Llosa et al (Llosa et al, 2015).

D'autre part, cette surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales est associée de façon significative à une augmentation de la densité en TIL-IEL au contact des cellules

tumorales exprimant le récepteur de HLA-E, CD94/NKG2, quelque soit le phénotype MSI ou MSS des CCR. Etant donné l'affinité plus grande de HLA-E pour le récepteur inhibiteur, les TIL-IEL CD94+ identifiés expriment plus probablement la chaîne inhibitrice NKG2A. D'ailleurs, nos études préliminaires en cytométrie en flux à partir de TIL totaux dissociés d'une tumeur colorectale ne retrouvent pas d'expression du récepteur activateur CD94/NKG2C. Une étude de co-expression du CD94 et de la chaîne NKG2A en immunofluorescence est actuellement en cours pour vérifier précisément que la fraction des TIL CD94+ au contact des cellules tumorales (TIL-IEL) exprime la chaîne NKG2A. Cette association entre la surexpression de HLA-E et la richesse en TIL-IEL CD94/NKG2A a été rapportée dans le cancer de l'ovaire et le cancer du col utérin (Gooden et al, 2011, 2012). L'expression de ce récepteur CD94/NKG2A peut être induite par des cytokines du micro-environnement tumoral, telles que IL-15 et le TGF- β (Sheu et al, 2005). Or, ces deux cytokines sont connues pour être également présentes dans le micro-environnement tumoral des CCR (Calon et al, 2012 ; Mlecnik et al, 2014), et IL-15 peut être produite par les cellules tumorales des CCR (Mlecnik et al, 2014). Ceci suggère donc que les cellules tumorales des CCR pourraient directement moduler les fonctions biologiques des TIL-IEL en sécrétant de l'IL-15. Il serait intéressant de corrélérer les niveaux d'expression de l'IL-15 par les cellules tumorales dans le micro-environnement et la densité en TIL-IEL/CD94+ en fonction du statut MSI ou MSS.

Etant donné l'expression préférentielle des récepteurs de HLA-E par les cellules NK, nous avons cherché à identifier ces cellules NK en utilisant un anticorps dirigé contre un récepteur exprimé spécifiquement par les cellules NK, le récepteur NKp46. De façon surprenante, nous n'avons mis en évidence que de très rares cellules NK. Cependant, la majorité des CCR qui contenait des cellules NK était des CCR MSI, et la densité en cellules NK était plus élevée dans les CCR MSI que dans les CCR MSS. La rareté des cellules NK dans les CCR a également été rapportée dans une étude antérieure (Halama et al, 2011). Par conséquent, nous pouvons supposer que la majorité des TIL-IEL CD94+ correspondent préférentiellement à des lymphocytes T CD8+ (une partie d'entre eux étant donné la densité plus élevée de TIL CD8+ que de TIL CD94+) ou à des cellules NKT plutôt qu'à des cellules NK, puisque ce récepteur peut également être exprimé à la surface d'un sous-type de lymphocytes T CD8+ et NKT (van Hall T, 2010, *Microbes infect*). De plus, plusieurs études concernant des cancers

gynécologiques ont clairement montré que ces TIL-IEL CD94+/NKG2A correspondaient à des TIL CD8+ (Chang et al, 2005 ; Sheu et al, 2005 ; Gooden et al, 2011).

Enfin, nous avons montré pour la première fois qu'une densité élevée en TIL-IEL CD94+ est un facteur de mauvais pronostic, significativement associée à une survie globale à 5 ans défavorable, et quelque soit le stade du CCR. A l'inverse, nous montrons qu'une densité élevée en TIL-IEL CD8+ est significativement associée à une meilleure survie, en accord avec des études précédentes (Guidoboni et al, 2001 ; Chiba et al, 2004 ; Bossard et al, 2012). Ces résultats suggèrent donc que l'effet bénéfique de l'infiltrat en TIL-IEL CD8+ sur la survie est affecté par l'expression du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A interagissant avec son ligand HLA-E/ β 2m. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Gooden et al dans les cancers ovariens montrant que l'expression de HLA-E par les cellules tumorales entrave le bénéfice de survie associé aux TIL-IEL CD8+, exprimant préférentiellement le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A dans ce contexte (Gooden et al, 2011). Les résultats de notre étude confirment donc que la surexpression de HLA-E/ β 2m par les cellules tumorales correspond à un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire, et favorise la progression tumorale en induisant une « paralysie » des lymphocytes cytotoxiques effecteurs. Le fait que nous ayons détecté la forme soluble de HLA-E préférentiellement chez les patients avec un CCR de stade IV est en accord avec cette hypothèse de rôle facilitateur de HLA-E sur la progression tumorale.

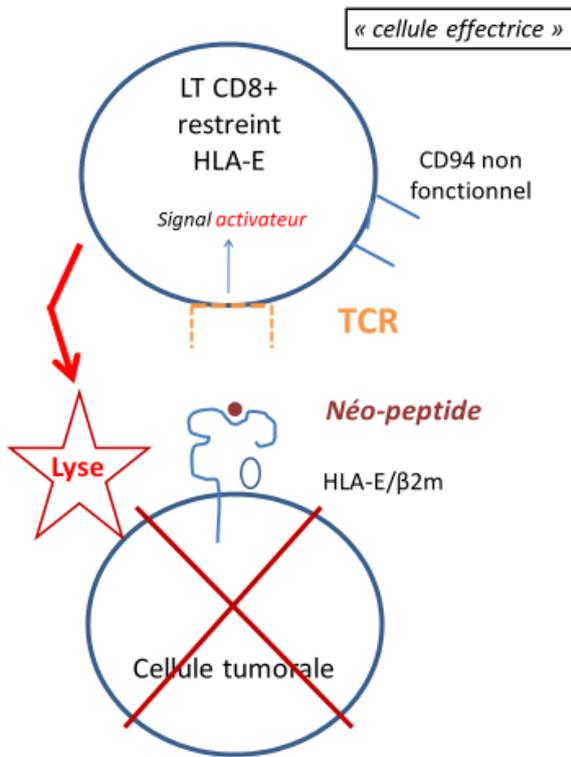
Compte tenu du faible nombre de CCR MSI incluables dans notre étude statistique, il n'a pas été possible d'identifier une association significative entre la survie et ces paramètres immunitaires en fonction de la voie d'oncogénèse. Cependant, compte tenu de, 1) la surexpression préférentielle inattendue de HLA-E/ β 2m ainsi que de la densité plus élevée en TIL-IEL CD94+ dans les CCR de type MSI et 2) la valeur pronostique péjorative à la fois de HLA-E/ β 2m, rapportée dans notre étude précédente (Bossard et al, 2012) et de l'infiltrat en TIL-IEL CD94+, la question du rôle biologique de HLA-E et des TIL-IEL CD94+ dans les CCR MSI reste posée. En effet, il a été montré que HLA-E/ β 2m peut présenter une grande variété de peptides et interagir avec le TCR de lymphocytes T CD8+, ces lymphocytes non conventionnels nommés « lymphocytes T CD8+ restreints HLA-E » ayant été récemment identifiés et caractérisés dans des contextes d'infection virale (Pietra et al, 2003 ; Salerno-Gonçalves et al, 2004 ; Hoare et al, 2006). Ces « lymphocytes T CD8+ restreints HLA-E »,

dans un contexte d'infection à CMV, expriment le récepteur CD94 mais celui-ci s'avère non fonctionnel, et présentent une forte activité cytolytique (Allard et al, 2012). Dans les CCR, la plus grande immunogénicité des CCR MSI est supposée être liée à la synthèse accrue de néoantigènes tumoraux secondaire à l'accumulation de mutations frameshift (Schwitalle Y, 2004 ; Garbe et al, 2011). On peut donc supposer que HLA-E/ β 2m, préférentiellement exprimé dans les CCR MSI, pourrait présenter ces néo-peptides et interagir avec les « lymphocytes T CD8+ restreints HLA-E » efficaces qui induiraient une lyse de la cellule tumorale. Cette hypothèse pourrait alors expliquer le meilleur pronostic associé aux CCR MSI. Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires dans les CCR MSI pour mieux définir le rôle biologique de HLA-E/ β 2m. Ces études sont actuellement en cours dans le but d'identifier notamment dans ces cancers des lymphocytes T CD8+ restreints HLA-E spécifiques de certains néopeptides en fonction du type de mutation frameshift.

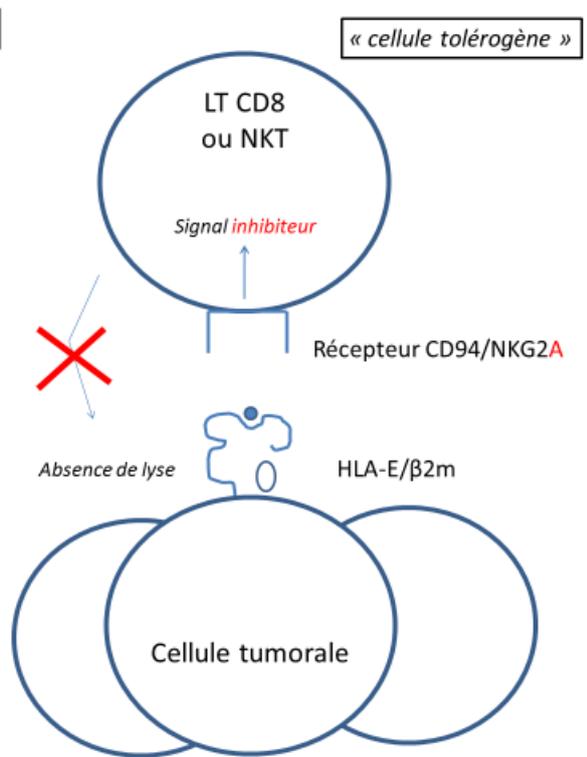
En conclusion, nos résultats suggèrent que les cellules tumorales de CCR, via l'expression aberrante de HLA-E/ β 2m, peuvent interagir avec les TIL-IEL CD94+ et contribuer à paralyser la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces interactions entre les cellules tumorales et les TIL-IEL peuvent favoriser l'échappement tumoral au système immunitaire et la progression tumorale. D'un point de vue clinique, ces résultats participent à une meilleure compréhension des réponses anti-tumorales et des mécanismes d'échappement au système immunitaire dans les CCR dans le but de développer et / ou définir de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Plus précisément, l'identification de ce nouveau « checkpoint » inhibiteur pourrait être la cible de nouveaux protocoles d'immunothérapie, et en particulier du nouvel anticorps anti-NKG2A développé par InnatePharma, et en cours d'essais cliniques dans différentes tumeurs solides actuellement. Nos résultats suggèrent que cet anticorps pourrait être efficace dans les CCR, notamment ceux surexprimant HLA-E/ β 2m.

HYPOTHESES

CCR MSI



CCR MSS



ANNEXES

Tableau 1. Classification OMS 2010 des CCR

<i>Carcinomas</i>	
Adenocarcinoma	8140/3
Cribriform comedo-type adenocarcinoma	8201/3*
Medullary carcinoma	8510/3
Micropapillary carcinoma	8265/3*
Mucinous adenocarcinoma	8480/3
Serrated adenocarcinoma	8213/3*
Signet ring cell carcinoma	8490/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Undifferentiated carcinoma	8020/3

Stade pTNM

Tumeur primitive (T)

Tx Tumeur non évaluable

T0 Pas de tumeur primitive décelable

Tis Carcinome *in situ* : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la *lamina propria* (intramuqueuse) sans extension à la sous-muqueuse à travers la *muscularis mucosae*

T1 La tumeur envahit la sous-muqueuse sans la dépasser

T2 La tumeur envahit la musculature sans la dépasser

T3 La tumeur envahit, à travers la musculature, la sous-séreuse (sans atteinte du revêtement mésothélial) et les tissus péricoliques non péritonisés ou le tissu péirectal

T4 La tumeur perce le péritoine viscéral et/ou envahit les organes de voisinage

Ganglions régionaux (N)

Nx Statut ganglionnaire non évaluable

N0 Absence de métastase ganglionnaire

N1 1 à 3 adénopathies régionales métastatiques

N2 4 ou plus adénopathies régionales métastatiques

Métastases (M)

Mx Statut métastatique inconnu

M0 Absence de métastase

M1 Métastases à distance

BIBLIOGRAPHIE

Alemayehu A, Sebova K, Fridrichova I. (2008) Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 906-14.

Allard M, Oger R, Vignard V, Percier JM, Fregni G, Périer A, Caignard A, Charreau B, Bernardeau K, Khammari A, Dréno B, Gervois N. (2011). Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer. *PLoS One*. 6, e21118.

Allard M, Tonnerre P, Nedellec S, Oger R, Morice A, Guilloux Y, Houssaint E, Charreau B, Gervois N. (2012) HLA-E-restricted cross-recognition of allogeneic endothelial cells by CMV-associated CD8 T cells: a potential risk factor following transplantation. *PLoS One*. e50951.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. (1998) A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 58, 5248-57.

Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisse CL, Jotereau F, Mosnier JF. (2012). HLA-E/ β 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer*. 4, 855-63.

Braud V, Jones EY, McMichael A. (1997) The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*. 27, 1164-9.

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 391, 795-9

Brostjan C, Bellón T, Sobanov Y, López-Botet M, Hofer E. (2002) Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. *J Immunol Methods*. 109-19.

Chang WC, Huang SC, Torng PL, Chang DY, Hsu WC, Chiou SH, Chow SN, Sheu BC. (2005) Expression of inhibitory natural killer receptors on tumor-infiltrating CD8+ T lymphocyte lineage in human endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 1073-80.

Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, Ohuchi A, Ohuchi K, Shiiba K, Kurokawa Y, Satomi S. (2004) Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer*. 1711-7.

Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L. (2007) Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev* 215:243-53.

Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B, Stenling R, Oberg A, Rutegård J, Palmqvist R. (2011) Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Mod Pathol.* 24, 671-82

Derré L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, Jotereau F, Gervois N. (2006). Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol.* 5, 3100-7.

Derre L, Corvaisier M, Pandolfino MC, Diez E, Jotereau F, Gervois N. (2002) Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. *J Immunol*168, 4864-70.

Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F, Vermorken JB. (2010) Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* 11:19.

Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macrì E, Fornasarig M, Boiocchi M. (1999). High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 6, 1805-13.

Fang SH, Efron JE, Berho ME, Wexner SD. (2014). Dilemma of stage II colon cancer and decision making for adjuvant chemotherapy. *J Am Coll Surg.* 1056-69. Review.

Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis.,*Cell.* 61, 759-67

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 5795, 1960-4.

Garbe Y, Maletzki C, Linnebacher M. (2011) An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PLoS One.* e26517.

Gooden M, Lampen M, Jordanova ES, Leffers N, Trimbos JB, van der Burg SH, Nijman H, van Hall T. (2011). HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 26, 10656-61.

Gooden MJ, van Hall T. (2012). Infiltrating CTLs are bothered by HLA-E on tumors. *Oncoimmunology.* 1, 92-93.

Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macrì E, Lanza G, Boiocchi M, Dolcetti R. (2001). Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol.* 1, 297-304.

Halama N, Braun M, Kahlert C, Spille A, Quack C, Rahbari N, Koch M, Weitz J, Kloor M, Zoernig I, Schirmacher P, Brand K, Grabe N, Falk CS. (2011) Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin Cancer Res.* 17, 678-89.

Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G, Clements CS, Lee EJ, Ely LK, Beddoe T, Falco M, Kjer-Nielsen L, Reid HH, McCluskey J, Moretta L, Rossjohn J, Brooks AG. (2006). Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response. *Nat Immunol.* 256-64.

Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougnot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. (2000) Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology.* 867-79.

Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B. (1998) Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut.* 42, 673-9.

Kronenberg M. (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 877-900. Review.

Kunisawa J, Takahashi I, Kiyono H. (2007) Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol Rev.* 136-53.

Levy EM, Bianchini M, Von Euw EM, Barrio MM, Bravo AI, Furman D, Domenichini E, Macagno C, Pinsky V, Zucchini C, Valvassori L, Mordoh J. (2008). Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 3, 633-41.

Mingari MC, Pietra G, Moretta L. (2005) Human cytolytic T lymphocytes expressing HLA class-I-specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol.* 17, 312-9.

Mandrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. 2003. Cutpoint determination methods in survival analysis using SAS®. (Paper 261-28). Proceedings of the 28th SAS Users Group International Conference (SUGI 28).

Mittelbronn M, Simon P, Löffler C, Capper D, Bunz B, Harter P, Schlaszus H, Schleich A, Tabatabai G, Goepfert B, Meyermann R, Weller M, Wischhusen J. (2007) Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells. *J Neuroimmunol.* 50-8.

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J.(2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 610-8.

Ota T¹, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K (2005)

IFN-gamma-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood*. 184-92.

Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 25, 2654-66.

Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 35,5944-51.

Peltomäki P, Vasen HF. (1997) Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 113, 1146-58

Peltomäki P. (2005) Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. 4, 227-32.

Pietra G, Romagnani C, Falco M, Vitale M, Castriconi R, Pende D, Millo E, Anfossi S, Biassoni R, Moretta L, Mingari MC. (2001). The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur J Immunol*. 31, 3687-93.

Salerno-Gonçalves R, Fernandez-Viña M, Lewinsohn DM, Szein MB. (2004) Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *Immunol*. 5852-62

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML. (2001) Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10, 917-23.

Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J, von Knebel Doeberitz M. (2004) Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immun*. 4:14.

Sheu BC, Chiou SH, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Ho HN, Hsu SM. (2005). Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res*. 2921-9.

Sullivan LC, Clements CS, Rossjohn J, Brooks AG. (2008) The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*. 415-24

Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. (2002). Evaluation of tumor microsatellite instability using five

quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 6, 1804-11.

Thomas G, Muleris M, Salmon RJ. 1988. La génétique du cancer colorectal. *Médecine sciences*. 2747-280.

Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J*. 4250-60.

Vasen HF¹, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1453-6.

Vilar E, Gruber SB. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 153-62.

Waldhauer I, Steinle A. (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 5932-43.

Wang R, Wang MJ, Ping J. (2015) Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly: A Population-Based Cohort Study of SEER 9 Registries Data (1988-2011). *Medicine (Baltimore)*. e1402.

Williams C, Mandrekar J, Mandrekar S, et al. (2006) Finding optimal cutpoints for continuous covariates with binary and time-to-event outcomes. Mayo Foundation Technical Report Series, No. 79. Rochester, MN: Department of Health Sciences Research, Mayo Clinic.

Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, von Knebel Doeberitz M. (2001) Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer*. Jul 12-9.

NOM : EUGENE LAMER

PRENOM : Juliette

Titre de Thèse :

Interactions cellules tumorales – micro environnement immunitaire dans les cancers colorectaux : étude de l'influence pronostique de l'expression aberrante de HLA-E et de son récepteur CD94/NKG2 en fonction du mode d'oncogénèse.

RESUME

Le but de ce travail était d'étudier les interactions entre les cellules tumorales et le micro-environnement immunitaire dans les cancers colorectaux (CCR), et leur influence pronostique, en fonction du mode d'oncogénèse. L'expression de HLA-E/ β 2m et de son récepteur CD94/NKG2 a été étudiée dans une cohorte de 234 patients atteints d'un CCR. Nous avons montré que HLA-E/ β 2m est préférentiellement surexprimée dans les CCR MSI, et est associée à une densité élevée de TIL-IEL CD94+. Le pronostic défavorable associé aux TIL-IEL CD94+ suggère que les cellules tumorales, via l'expression aberrante de HLA-E/ β 2m, et l'interaction avec les TIL-IEL CD94+ contribuent à paralyser la réponse immunitaire anti-tumorale. L'identification de ce nouveau « checkpoint » inhibiteur permet donc d'envisager une nouvelle immunothérapie ciblée dans les CCR.

MOTS-CLES

CANCER COLORECTAL – HLA-E/ β 2M – LYMPHOCYTES INTRA-TUMORAUX INTRA-EPITHELIAUX – CD94 – STATUT MSI/MSS