



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la mort cellulaire induite par un anticorps trifonctionnel

Diane Goéré Goere

► **To cite this version:**

Diane Goéré Goere. Caractérisation de la mort cellulaire induite par un anticorps trifonctionnel. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T022 . tel-00870033

**HAL Id: tel-00870033**

**<https://theses.hal.science/tel-00870033>**

Submitted on 4 Oct 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

**THESE**  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Champ disciplinaire : Immunologie  
Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

**Présentée et soutenue publiquement par**  
**Diane Goéré**  
**le 29 Mai 2013**

**Caractérisation de la mort cellulaire induite  
par un anticorps trifonctionnel**

**Directeur de thèse : Pr. Laurence ZITVOGEL**

**Composition du jury**

Président	Pr. Christian AUCLAIR
Rapporteur	Pr. Christophe MARIETTE
Rapporteur	Pr. Marc POCARD
Examineur	Pr Olivier GLEHEN
Examineur	Pr Pierre LAURENT PUIG
Examineur	Pr Dominique ELIAS
Directeur de thèse	Pr Laurence ZITVOGEL

## RESUME

Le développement d'un cancer chez un individu immunocompétent témoigne, en partie, d'un échappement tumoral au système d'immunosurveillance. L'échappement tumoral est un phénomène complexe, multifactoriel, au cours duquel les cellules tumorales vont déjouer les mécanismes de défense de l'hôte en modifiant leur microenvironnement. Par conséquent, la restauration ou l'induction de ces mécanismes de défense anti-tumorale est une des stratégies thérapeutiques actuelles. Un des principes de l'immunothérapie est basé sur l'injection d'anticorps ayant pour cible la cellule tumorale ou les cellules effectrices de l'immunité. L'efficacité anti-tumorale de ces anticorps a été considérablement améliorée par une meilleure compréhension des modes d'action et des effets modulateurs de ces anticorps. Ainsi, afin d'optimiser l'action des effecteurs immunitaires sur les cellules tumorales, un anticorps bispécifique, trifonctionnel, le catumaxomab, capable de se lier à la molécule d'adhérence des cellules épithéliales (EpCAM) exprimée par les cellules tumorales et à l'antigène CD3 des lymphocytes T, a été développé, essentiellement en traitement intrapéritonéal des ascites néoplasiques réfractaires.

L'objectif de cette étude était de déterminer les effets immunomodulateurs du catumaxomab sur des cellules néoplasiques exprimant EpCAM, à partir de deux modèles expérimentaux (allogénique et autologue), de rechercher une cytotoxicité induite par la catumaxomab, et de la caractériser, notamment en analysant la présence ou non de signaux de stress inducteurs d'une mort immunogène tels que l'exposition membranaire de la calréticuline par les cellules tumorales pré-apoptotiques, la libération d'HMGB1 et d'adénosine triphosphate (ATP) dans le milieu extra-cellulaire, responsables d'une activation des lymphocytes T.

En présence de cellules EpCAM+, le catumaxomab entraînait une activation majeure des lymphocytes T (expression de CD69, CD107a, HLA-DR et PD1), stimulait une réponse inflammatoire de type Thelper 1(Th1), et provoquait la synthèse d'interféron-gamma par les lymphocytes T CD8. Le catumaxomab engageait le CD16 (FcR) des cellules monocytaires et NK. De plus, sur des modèles allogéniques, le catumaxomab, provoquait une mort cellulaire associée à la libération d'ATP et induisait une mort immunogène après pré-incubation dans de l'oxaliplatine.

Par conséquent, le catumaxomab permet de moduler l'environnement immunitaire dans les ascites néoplasiques, et de convertir une inflammation chronique et immunosuppressive (Th2) en une inflammation aiguë et immunogène (Th1). En revanche, dans ces conditions, l'administration seule de catumaxomab ne semble pas déclencher de mort immunogène.

Différents moyens pourraient permettre d'améliorer la cytotoxicité de cet anticorps bispécifique : (1) le combiner avec un agent anti-néoplasique tel que l'oxaliplatine afin de promouvoir une mort immunogène, (2) affiner son action sur le CD3 des lymphocytes en modifiant sa configuration spatiale (anticorps BiTE), (3) amplifier son affinité pour le récepteur Fcγ des cellules accessoires (Fc défucosylé), (4) augmenter sa cytotoxicité en modifiant la cible dirigée contre la molécule du système immunitaire (anti-PD-1...). Enfin, l'utilisation clinique pourrait être facilitée en humanisant cet anticorps chimérique murin afin d'éviter la formation d'anticorps anti-murins, dirigés contre le catumaxomab.

Un essai thérapeutique de phase II dont le but est d'évaluer l'efficacité du catumaxomab intrapéritonéal après chirurgie de cytoréduction complète d'une carcinose gastrique, chez des patients ayant reçu en préopératoire une chimiothérapie systémique à base d'oxaliplatine vient de débiter. Au cours de cette étude, nous allons valider la capacité du catumaxomab 1) à induire un stress cellulaire immunogène et la mort des cellules cancéreuses, 2) à modifier la polarisation des cellules effectrices vers une maladie inflammatoire Th1, 3) à promouvoir l'expression des molécules de costimulation et TRAIL sur les cellules NK et monocytes, et corréliser ces biomarqueurs immunitaires à l'efficacité du traitement.

## Summary

The development of cancer in an immunocompetent individual reflects, in part, a tumor escape from the immunosurveillance. The tumor escape is a complex, multifactorial, in which tumor cells will evade the defense mechanisms of the host by changing their microenvironment. Therefore, restoration or induction of these defense mechanisms is one of the therapeutic strategies against cancer. One of the principles of immunotherapy is based on the injection of antibodies that target tumor cells or effector cells of immunity. The anti-tumor efficacy of these antibodies has been greatly improved by a better understanding of modes of action and modulatory effects of these antibodies.

Thus, to optimize the action of immune effectors to tumor cells, a bispecific antibody, trifunctional: catumaxomab, capable of binding to the adhesion molecule of the epithelial cells (EpCAM), expressed by tumor cells and the CD3 antigen of T cells, has been developed mainly in intraperitoneal treatment of refractory malignant ascites.

The objective of this study was to determine the immunomodulatory effects of catumaxomab on tumoral cells expressing EpCAM, from two experimental models (allogeneic and autologous), evaluate and characterize cytotoxicity induced by catumaxomab, and analyze the presence of stress signals inducing immunogenic cell death such as membrane exposure of calreticulin by pre-apoptotic tumor cells, release of HMGB1 and of adenosine triphosphate (ATP) in the extracellular medium, inducing a T cell activation.

In the presence of EpCAM + cells, catumaxomab induced a major the activation of T cells (expression of CD69, CD107a, HLA-DR and PD1), stimulated an inflammatory response Thelper type 1 (Th1) and the synthesis of interferon-gamma by CD8 T cells. Catumaxomab committed CD16 NK cells and monocytes. More, in models allogeneic catumaxomab, caused cell death associated with ATP release and induced an immunogenic cell death after pre-incubation of oxaliplatin.

Therefore, catumaxomab modulates the immune environment in malignant ascites, and convert chronic and immunosuppressive inflammation (Th2) in acute and immunogenic inflammation (Th1). However, in these conditions, catumaxomab alone does not seem to trigger immunogenic cell death.

the cytotoxicity of this bispecific antibody could be enhance by different techniques: (1) combining with chemotherapy such as oxaliplatin to promote immunogenic cell death, (2) refining its action on CD3 lymphocytes by changing its spatial configuration (BiTE antibody), (3) increasing its affinity for the FcγR of accessory cells (Fc aglycosylated), (4) increasing its cytotoxicity by changing the target directed against the immune molecule (anti-PD-1 ...). Finally, the clinical use could be facilitated by this humanizing murine chimeric antibody to prevent the formation of anti-murine antibodies directed against catumaxomab.

A phase II clinical trial aimed to evaluate the efficacy of intraperitoneal catumaxomab after complete cytoreductive surgery of gastric carcinomatosis in patients who received preoperative systemic chemotherapy with oxaliplatin have just started. In this study, we will validate the ability of catumaxomab 1) to induce immunogenic cell stress and death of cancer cells, 2) to change the polarization of effector cells to Th1 inflammatory disease, 3) to promote the expression of costimulatory molecules and TRAIL on NK cells and monocytes, and we will correlate these immune biomarkers to treatment efficacy.

## ABREVIATIONS

- TILs : leucocytes infiltrant la tumeur (tumor-infiltrating leukocytes)
- CTL : lymphocytes T cytotoxique
- Th : lymphocytes T-helper
- CD : cluster de differentiation
- NK : natural killer
- Treg lymphocytes T régulateurs
- MDSCs : cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (myeloid-derived suppressor cells)
- DC : cellules dendritiques
- PRR : Pattern-Recognition Receptors
- PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
- DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns
- TLR : toll-like recepteur
- GM-CSF :
- IFN : Interféron
- TNF : tumor-necrosis factor
- IL : interleukine
- CMH : complexe d'histocompatibilité
- TCR : antigen specific T-cell receptor
- fragment Fc : fragment constant
- ADCC : cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante
- TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand)
- Fas (FasL),
- IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase
- TGF : Transforming Growth Factor
- ROR : retinoic acid receptor related orphan receptor
- STAT : signal transducer and activator of transcription
- CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4
- GITR : glucocorticoid-induced TNFR-related protein
- FOXP3 : transcription factor forkhead box P3

- ARN : acide ribonucléique
- VEGF : vascular endothelial growth factor
- TAMs : macrophages associés aux tumeurs
- CAFs : fibroblastes associés aux cellules tumorales
- AKT : protéine kinase
- LC3 : ubiquitin-like protein microtubule-associated protein 1 light chain 3
- MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1
- HLA : human leukocyte antigen
- PDL : programmed death ligand
- ADCP : phagocytose Anticorps-dépendante
- CDC : cytotoxicité complément- dépendante
- HMGB1 : high mobility group B1
- ATP : adénosine triphosphate
- CRT : calréticuline
- PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
- NLRP : NOD-like receptor
- ECM : matrice extracellulaire
- BM : membrane basale
- IP : intra-péritonéale
- Fab : fragment antigen binding
- EpCAM : molécule d'adhésion cellulaire épithéliale
- PBMC : peripheral blood mononuclear cells
- HAMAs human anti-mouse antibodies
- HARAs : human anti-rat antibodies
- CRP : protéine C réactive
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- FACS : cytométrie de flux
- TIA-1 : cytotoxic granule-associated RNA binding protein
- BiTE : bi-specific-Tcell engager
- TIM3 : T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3

# SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>CROISSANCE TUMORALE ET SYSTEME IMMUNITAIRE .....</b>	<b>9</b>
1.1.1	ACTION ANTI-TUMORALE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL .....	11
1.1.1.1	Effecteurs issus de l'immunité innée.....	12
1.1.1.2	Effecteurs issus de l'immunité adaptative ou spécifique.....	18
1.1.2	IMMUNITE ANTI-TUMORALE HUMORALE .....	26
1.1.3	IMMUNOTOLERANCE ET ECHAPPEMENT TUMORAL .....	27
1.1.3.1	Phénomène d'immunotolérance.....	29
1.1.3.2	Formation de néo-vaisseaux.....	29
1.1.3.3	Activité immunosuppressive du microenvironnement .....	30
1.1.3.4	La perte d'autophagie.....	31
<b>1.2</b>	<b>TRAITEMENTS ANTI-NEOPLASIQUES ET SYSTEME IMMUNITAIRE .....</b>	<b>34</b>
1.2.1	ACTION IMMUNO-STIMULATRICE DES AGENTS DE CHIMIOETHERAPIE .....	35
1.2.2	ACTION IMMUNO-STIMULATRICE DES THERAPIES CIBLEES .....	37
1.2.3	MORT IMMUNOGENE INDUITE PAR LES ANTI-NEOPLASIQUES .....	39
1.2.3.1	Exposition de la calréticuline : événement clé de la mort immunogène.....	40
1.2.3.2	Libération d'HMGB1 et induction d'une mort immunogène.....	43
1.2.3.3	Libération d'ATP et induction d'une mort immunogène .....	45
1.2.3.4	L'autophagie : condition nécessaire à la mort immunogène .....	48
<b>1.3</b>	<b>IMMUNOTHERAPIE ET CARCINOSE PERITONEALE .....</b>	<b>51</b>
1.3.1	TRAITEMENT ACTUEL DE LA CARCINOSE PERITONEALE .....	53
	CHIRURGIE DE CYTOREDUCTION ET CHIMIOHYPERTHERMIE INTRA-PERITONEALE .....	53
1.3.2	IMMUNOTHERAPIE INTRA-PERITONEALE .....	54
1.3.2.1	Immunothérapie et anticorps.....	54
1.3.2.2	Le péritoine : un microenvironnement immunocompétent.....	56
<b>1.4</b>	<b>ADMINISTRATION INTRA-PERITONEALE DE CATUMAXOMAB.....</b>	<b>61</b>
1.4.1	CATUMAXOMAB : UN ANTICORPS TRI-FONCTIONNEL, BI-SPECIFIQUE .....	61
1.4.2	EFFET CYTOTOXIQUE DU CATUMAXOMAB.....	64
1.4.3	INDUCTION D'UNE REPOSE IMMUNITAIRE PAR LE CATUMAXOMAB.....	65
1.4.3.1	Activation lymphocytaire T.....	65
1.4.3.2	Activation des cellules accessoires de l'immunité .....	66
1.4.3.3	Induction d'une réponse immune humorale.....	67
1.4.4	EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE POTENTIEL DU CATUMAXOMAB.....	69
1.4.5	RESULTATS PHARMACOCINETIQUES .....	70

1.4.6	RESULTATS DES ETUDES CLINIQUES – UNE AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE EUROPEEN.....	71
1.5	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L’ETUDE.....	75
<b>2</b>	<b><u>TRAVAIL EXPERIMENTAL.....</u></b>	<b>78</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>78</b>
2.1.1	MODELE ALLOGENIQUE ET MODELE AUTOLOGUE.....	78
2.1.2	ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE ET CELLULAIRE.....	79
2.1.3	PROFIL CYTOKINIQUE.....	80
2.1.4	VIABILITE CELLULAIRE ET MARQUEURS DE MORT IMMUNOGENE .....	80
2.1.5	CULTURE 3D D’ADENOCARCINOME GASTRIQUE.....	81
<b>2.2</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>82</b>
2.2.1	MODELE AUTOLOGUE .....	82
2.2.1.1	Activation des lymphocytes T par le catumaxomab.....	85
2.2.1.2	L'engagement de CD16 induit par le catumaxomab.....	94
2.2.1.3	Mort immunogène induite par le catumaxomab .....	96
2.2.2	MODELE ALLOGENIQUE .....	99
2.2.3	ANALYSE SUR DES TUMEURS SPHEROIDES.....	100
<b>3</b>	<b><u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</u></b>	<b>105</b>
<b>3.1</b>	<b>ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE .....</b>	<b>105</b>
3.1.1	INDUCTION D’UNE CYTOTOXICITE T-DEPENDANTE .....	105
3.1.2	ACTIVATION DU RECEPTEUR Fc $\gamma$ DES CELLULES ACCESSOIRES .....	108
3.1.3	INHIBITION DES EFFECTEURS IMPLIQUES DANS LA PROGRESSION TUMORALE .....	109
3.1.4	CYTOTOXICITE ET MORT IMMUNOGENE – SYNERGIE AVEC UN AGENT DE CHIMIOTHERAPIE CONVENTIONNEL .....	110
3.1.5	REPONSE IMMUNITAIRE A DISTANCE .....	111
<b>3.2</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>114</b>
3.2.1	MODIFIER LA CONFIGURATION SPATIALE : NOUVELLE CLASSE DES ANTICORPS BI-SPECIFIQUES	114
3.2.2	ASSOCIER UN CIBLAGE EpCAM A UNE AUTRE CIBLE, DIFFERENTE DE CD3 .....	116
<b>3.3</b>	<b>ESSAIS THERAPEUTIQUES.....</b>	<b>117</b>
3.3.1	ESSAIS THERAPEUTIQUES ACTUELS .....	117
3.3.2	CATUMAXOMAB DANS LE TRAITEMENT DE LA CARCINOSE PERITONEALE D’ORIGINE GASTRIQUE : ESSAI IIPPOP (NCT01784900) .....	117

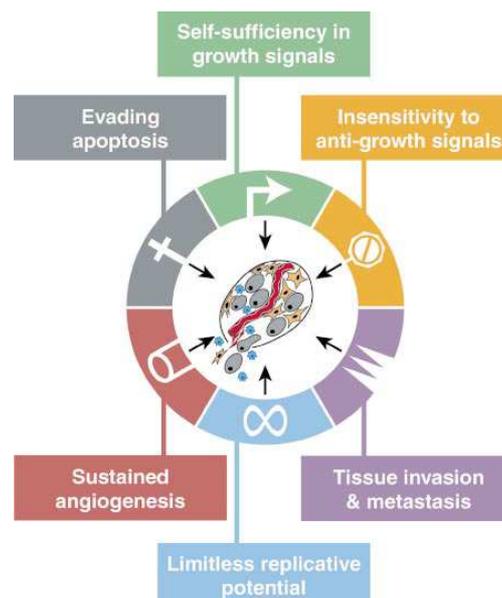
<b>4</b>	<b><u>REFERENCES.....</u></b>	<b><u>121</u></b>
<b>5</b>	<b><u>ANNEXES .....</u></b>	<b><u>143</u></b>
<b>6</b>	<b><u>PUBLICATIONS .....</u></b>	<b><u>147</u></b>
<b>7</b>	<b><u>REMERCIEMENTS .....</u></b>	<b><u>179</u></b>

# 1 Introduction

## 1.1 Croissance tumorale et système immunitaire

Jusqu'à la fin des années 1990, l'analyse du développement tumoral était axée sur la cellule tumorale et ses modifications génétiques, comme en témoigne le travail publié par Hanahan et Weinberg (*Hanahan D at al, 2000*) en 2000. Suite à l'analyse de nombreux travaux, les auteurs ont définis les caractéristiques d'une cellule cancéreuse, qui reposaient sur sa capacité (*Figure 1*) :

- de répondre à des signaux de prolifération
- de résister à la mort cellulaire
- d'induire une angiogénèse
- de se répliquer de façon illimitée
- d'échapper aux phénomènes d'apoptose
- de disséminer

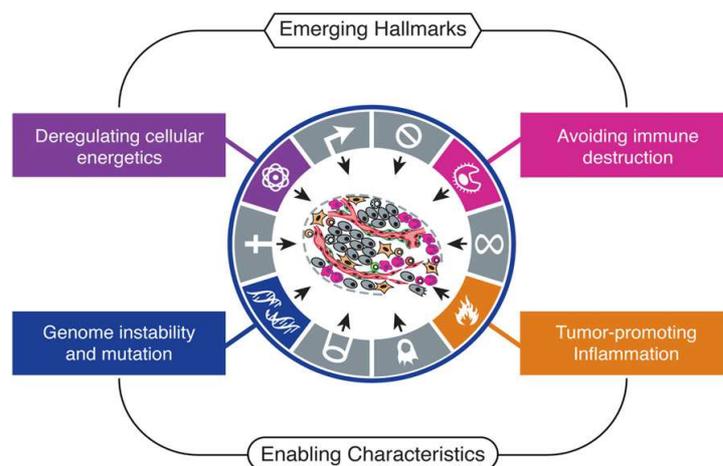


**Figure 1 – Caractéristiques de la cellule tumorale** (d'après Hanahan D at al, 2000).

Cependant, déjà en 1970 le concept d'immunosurveillance anti-tumorale, avait été décrit par Burnet (*Burnet FM, 1970*) en faveur de mécanismes de défense impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. Mais, malgré ce phénomène d'immunosurveillance, des tumeurs surviennent chez des patients immunocompétents, témoignant d'une défaillance du système de défense ou d'un échappement des cellules tumorales à ses mécanismes de défense.

Le concept selon lequel le développement tumoral dépendait aussi d'interactions entre la tumeur et l'hôte, et pas uniquement d'un dysfonctionnement cellulaire, s'est alors de plus en plus imposé. Par conséquent, l'hôte et l'environnement tumoral, au sein duquel, le système immunitaire, occupent une place prépondérante dans l'apparition et la progression de cellules cancéreuses. Ainsi, 11 ans plus tard, aux six caractéristiques définissant la cellule cancéreuse, ont été ajoutés deux nouveaux items (*Hanahan D et al, 2011*) (*figure 2*) :

- la capacité de déjouer le système immunitaire
- la capacité d'induire un état d'inflammation chronique qui favorise la croissance tumorale.



**Figure 2 – Caractéristiques d'une cellule tumorale : nouvelle génération**  
(d'après Hanahan D, Weinberg RA, 2011)

Par conséquent, la connaissance des différents acteurs impliqués dans le système immunitaire et leur action anti- ou pro-tumorale apparaît indispensable au développement de nouveaux traitements contre le cancer.

### **1.1.1 Action anti-tumorale du microenvironnement tumoral**

De nombreux indicateurs, reflets d'une activation du système immunitaire, ont été décrits comme pouvant être soit pronostiques, soit prédictifs de la réponse au traitement anti-tumoral (*Galluzzi et al, 2012*). Ces biomarqueurs peuvent être séparés en deux catégories : les indicateurs systémiques représentant une réponse humorale ou cellulaire contre la tumeur et les indicateurs locaux présents au niveau du microenvironnement tumoral et témoignant d'un engagement des effecteurs immunitaires localement, sur le site tumoral.

Les mécanismes de défense développés par le système immunitaire peuvent être séparés en deux types: l'immunité innée, basée sur une réponse immédiate non spécifique, responsable de la protection initiale, et l'immunité adaptative qui nécessite la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène. Ces mécanismes de défense sont activés en réponse à la reconnaissance d'un signal de danger d'origine exogène ou endogène. L'immunité anti-tumorale met en jeu ces deux types de défense qui vont pouvoir coopérer dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales.

**Les leucocytes infiltrant la tumeur** (tumor-infiltrating leukocytes (TILs)) sont essentiellement constitués d'éléments du système immunitaire dont le rôle est de lutter contre le développement tumoral. Ils sont représentés par les lymphocytes T cytotoxique (CTL) CD8+, les lymphocytes T-helper 1 (Th1) et T-helper 17 (Th17)

CD4+, les macrophages M1, les cellules NK (natural killer), les cellules dendritiques (DCs) et les neutrophiles N1. Certains TILs exercent un effet immunosuppresseur, il s'agit des lymphocytes T régulateurs (Treg), des lymphocytes T helper 2 (Th2) CD4+, des cellules suppressives dérivées de cellules myéloïdes (myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)), des macrophages M2 et des neutrophiles N2.

Les TILs peuvent être localisés au centre de la tumeur, au niveau du front d'invasion tumorale ou dans les structures lymphoïdes tertiaires. La présence de ces cellules est le reflet d'une activation de l'immunité innée, mais aussi de l'activation de l'immunité adaptative, secondaires à la sécrétion de cytokines, du recrutement d'effecteurs cellulaires de l'immunité et de l'expression d'immunorégulateurs par les cellules du stroma ou par les cellules tumorales elles-mêmes (*Gajewski TF et al, 2010 ; Galon J et al, 2006 ; Wang E et al, 2002*). L'analyse de la fonction et de la distribution de ces éléments au sein des tumeurs ont permis de déterminer leur impact pronostique, bénéfique ou délétère, comme nous allons le détailler plus avant (*Galon J et al, 2007, Fridman WH et al, 2012, Galon J et al, 2006*).

#### **1.1.1.1 Effecteurs issus de l'immunité innée**

**L'immunité innée** constitue la première ligne de défense de notre organisme. Elle est constituée d'un ensemble de barrières physiques et chimiques ainsi que d'acteurs cellulaires qui évitent l'entrée et la diffusion de pathogènes dans l'organisme. Les principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée sont les macrophages, les granulocytes, les cellules Natural Killer (NK) et les cellules dendritiques. Ils ne possèdent pas de récepteurs spécifiques d'un antigène mais expriment des récepteurs PRR (Pattern-Recognition Receptors) tels que les récepteurs Toll-like, Nod, scavengers, les récepteurs du complément, les lectines,

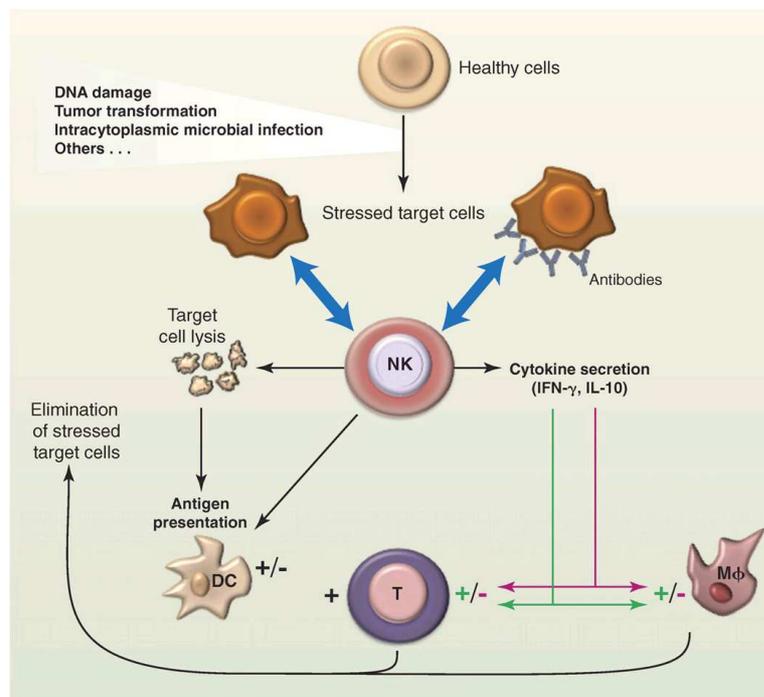
qui reconnaissent des signaux de danger exogènes liés à une infection, appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), et des signaux de danger endogènes. Ces derniers sont libérés par les cellules nécrotiques ou lors de la dégradation de la matrice extra-cellulaire et sont appelés DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) (*Chen GY et al, 2010*). Ces cellules ayant des fonctions immunitaires innées répondent rapidement à l'invasion en allant détruire les organismes étrangers par divers mécanismes dont la phagocytose. L'intégration de différents signaux de danger par ces cellules de l'immunité innée est déterminante pour leur activation, leur migration et leur fonction de présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative.

**Les macrophages** recrutés sur le site tumoral sont originaires de la lignée monocyttaire. Ce sont de grosses cellules ( $\varnothing = 20\text{--}80 \mu\text{m}$ ) caractérisées par leur expression membranaire, entre autre, de CD14 (le co-récepteur de TLR4), CD16 (Fc $\gamma$ RIII), CD31 (impliqué dans les phénomènes de phagocytose), CD40 (molécule présente sur les cellules présentatrices d'antigène). Ils ont un rôle essentiel de phagocytose. Activés par le GM-CSF et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ils acquièrent des fonctions cytotoxiques et vont sécréter du tumor-necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), de l'interleukine (IL)-1, des protéases, et des métabolites de l'oxygène. Ils sont aussi capables de présenter aux lymphocytes T des antigènes dérivés des tumeurs via les molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Les macrophages de type M1 peuvent aussi activer une réponse immune anti-tumorale par la sécrétion d'IL-12 responsable d'une réponse de type Th1. Mais, à côté de ce rôle anti tumoral, ils pourraient avoir un rôle activateur en stimulant la croissance et l'invasion tumorale par la production locale de facteurs de croissance, de cytokines et de facteurs

angiogéniques. Ainsi, les macrophages de type M2, caractérisés par une surexpression de CD163 et CD206, comparativement aux macrophages M1, favorisent une immuno-tolérance au développement tumoral, par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10. Il a ainsi été démontré par l'analyse du stroma de prélèvements issus cancers du sein (144 patientes), qu'un taux important de macrophages CD163 dans la tumeur était corrélé à un moins bon pronostic (*Medrek C et al, 2012*).

**Les cellules NK** regroupent un type cellulaire, dérivés de lignée lymphocytaire, CD3- et TCR- (antigen specific T-cell receptor). Elles jouent un rôle fondamental dans l'immunité innée, capables de reconnaître et de détruire spécifiquement les cellules infectées par des virus, de distinguer les cellules normales des cellules cancéreuses "modifiées". Les cellules NK expriment à leur surface le récepteur CD7, la molécule d'adhésion CD56, la glucuronosyl transferase CD57. Les cellules NK expriment également le récepteur CD16 (FcγRIII) pour le fragment Fc d'immunoglobuline, qui lorsque qu'il est activé, induit une réaction puissante appelée antibody-dependant cellular cytotoxicity (ADCC). Les principaux récepteurs activateurs des cellules NK sont NKG2D, les récepteurs de cytotoxicité naturelle NKp30 et NKp46, DNAM-1, CD2, NKP80, 2B4, NTBA. Activées, elles vont libérer des granules contenant des enzymes de type perforine et granzyme-B, provoquant ainsi l'apoptose des cellules tumorales (*Sun JC et al, 2011; Vivier E, et al, 2011*). D'autre part, elles peuvent interagir avec des récepteurs spécifiques exprimés par les cellules tumorales par l'intermédiaire de molécules telles que TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ou le ligand des récepteurs Fas (FasL), et entraîner ainsi l'apoptose des cellules tumorales.

Enfin, les cellules NK secrètent de nombreuses cytokines, dont l'IFN- $\gamma$  qui participe au recrutement des cellules de l'immunité spécifique (*Figure 3*). Elles ont un rôle protecteur anti-tumoral en participant au phénomène appelé « DC editing », c'est-à-dire, qu'elles sont capables de reconnaître et de détruire les cellules dendritiques qui n'auraient pas une réponse anti-tumorale adaptée, ce qui permet de solliciter de nouvelles cellules dendritiques non tolérantes (*Moretta A, 2002 ; Moretta L et al, 2006*). Par ailleurs, des études récentes ont montré que plusieurs molécules, notamment des facteurs inhibiteurs présents dans le microenvironnement tumoral, comme IDO1 et TGF- $\beta$ 1, peuvent fortement altérer les fonctions des cellules NK.



**Figure 3 – Action des cellules NK.** Les cellules NK reconnaissent une variété de cellules « stressées » en présence ou non de d'anticorps (flèche bleue). Les cellules NK activées reconnaissent leurs cibles et provoquent leur lyse par la production de cytokines. Les cellules NK sont aussi capables d'interargie avec les cellules dendritiques, en provoquant la destruction des cellules dendritiques immatures ou en participant à leur maturation.

L'impact pronostique des cellules NK a été étudié dans de nombreux types de cancer. L'analyse de l'infiltrat NK du stroma tumoral de tumeurs d'origine oesogastrique, colorectal, hépatocellulaire, épidermoïde ORL, a permis de montrer que la présence de cellules NK était corrélée à un meilleur pronostic (*Senovilla et al, 2012*).

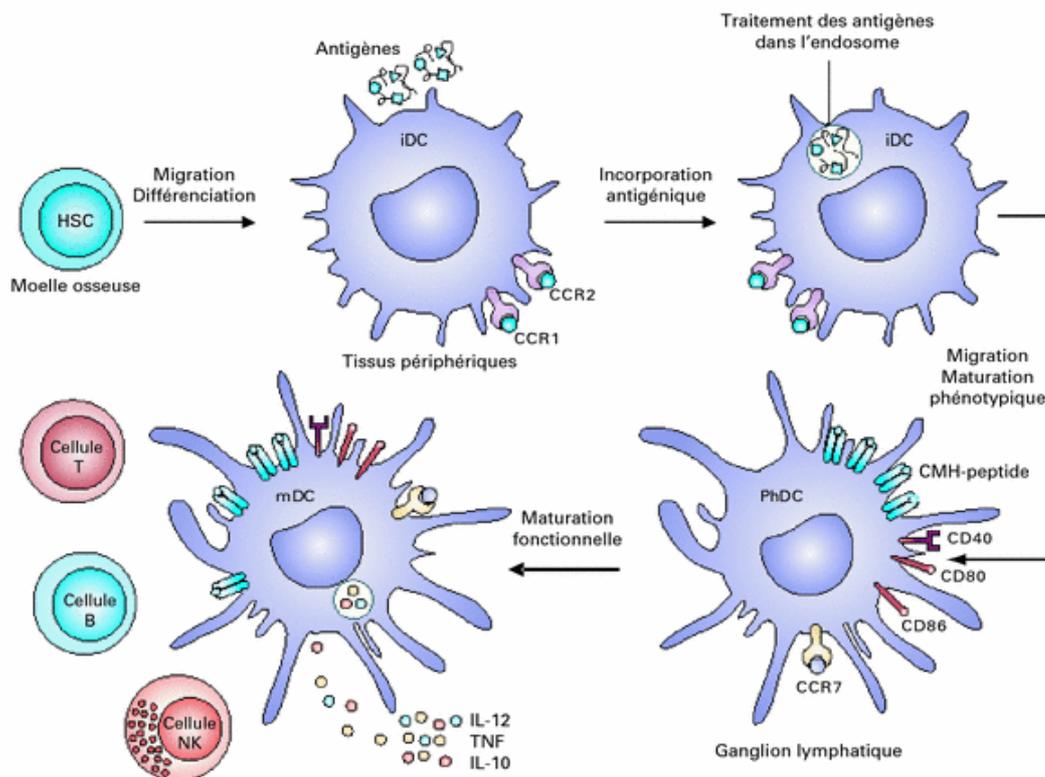
**Les lymphocytes NKT** partagent des caractéristiques communes aux lymphocytes T et aux cellules NK. Elles sont équipées d'un récepteur  $\alpha\beta$ TCR, peuvent exprimer le CD4 ou le CD8 et expriment aussi à leur surface le CD16 et le CD56. Leur activité anti-tumorale est liée à plusieurs mécanismes : la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 et de GM-CSF, et leur capacité à détruire des cellules aux fonctions immunosuppressives : les macrophages associés aux tumeurs et les MDSCs (*Song L et al, 2009 ; Mussai F et al, 2012*). Enfin, le développement et la progression tumorale pourraient être liés à une diminution du taux de NKT circulants et intra tumoraux, rapportée chez les patients atteints de cancer, ce qui a conduit au développement de traitement anti-tumoral ciblé sur l'action des NKT (*Giaccone G et al, 2002 ; Motohashi S et al, 2011 ; Yamasaki K et al, 2011*)

**Les cellules dendritiques (DCs)** sont des dérivés de précurseurs myéloïdes, et sont présentes dans presque tous les tissus, sous forme immature. Elles se caractérisent par leur grande capacité à présenter les antigènes aux cellules effectrices et jouent un rôle crucial dans l'activation d'une réponse de l'immunité adaptative (*Banchereau J et al, 1998*). Elles expriment les molécules du CMH-I/-II. Leur stimulation entraîne une cascade de réactions aboutissant à leur forme mature. Les DCs immatures peuvent être stimulées par les PAMPs, les DAMPs et par des médiateurs spécifiques. Ce phénomène de maturation s'accompagne de la

diminution d'expression de molécules impliquées dans l'incorporation des antigènes et de la surexpression de molécules de co-stimulations : CD40, CD80, CD86, CMH-II, fortement impliquées dans les interactions avec les lymphocytes T (Sallusto F et al, 1999). Ainsi, les cellules dendritiques matures vont exprimer le récepteur aux cytokines CCR7 impliqué dans la migration des DC matures vers les organes lymphoïdes où elles pourront activer les lymphocytes T (Sallusto F et al, 2000). La reconnaissance des antigènes présentés par les cellules dendritiques aux lymphocytes Th0 naïfs, va entraîner leur maturation en Th1 et Th2. Les phénomènes de maturation et le rôle des cellules dendritiques dans l'activation du système immunitaire adaptatif sont décrits sur la *figure 4*.

Des études ont montré que l'injection de cellules dendritiques matures, « préparées » ex vivo, ayant acquis une résistance aux facteurs inhibant, était capable de promouvoir une forte activation des lymphocytes T. Les réponses tumorales aux premières générations de DCs matures « préparées » ex vivo, et administrées chez les patients atteints de cancer (mélanome) étaient limitées, ce qui a conduit à modifier par conséquent les techniques de «préparation » des DCs ex vivo. Les dernières générations de DCs ont comme propriété de produire de façon importante de l'IL-12 et des facteurs activateurs des Th-1, des CTLs et des cellules NK. Ces DCs « polarisées type 1 » ont permis d'induire une réponse anti-tumorale des CTLs durable dans des modèles humains in vitro et des modèles murins in vivo.

En raison de ces fonctions et de l'activation d'une immunité spécifique, un infiltrat important de DCs dans le stroma tumoral est plus souvent associé à un meilleur pronostic (Senovilla L et al, 2012).



**Figure 4 – Maturation des cellules dendritiques et interaction avec les cellules effectrices T.**

Les cellules dendritiques immatures vont phagocyter les antigènes tumoraux, ce qui entraîne une phase de maturation et de migration vers les organes lymphoïdes secondaires, où les cellules dendritiques présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T, via le CMH-I. Il en résulte une activation des lymphocytes T CD8+ et CD4+, effecteurs activés contre la tumeur (d'après Calmels B. 2004).

### 1.1.1.2 Effecteurs issus de l'immunité adaptative ou spécifique

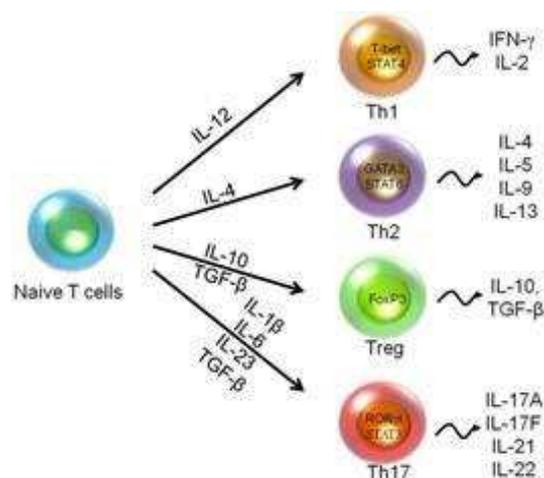
L'immunité adaptative ou spécifique est un mécanisme de défense acquis qui repose sur la reconnaissance d'antigènes : du « non soi » (sélection positive) et du « soi » (sélection négative), et sur la mémoire immunitaire. Elle repose sur les cellules lymphocytaires de type B et de type T (CD3+) comprenant différents types : les lymphocytes T CD4+, parmi les quels les T helper (Th) et les lymphocytes T

régulateurs (Treg), les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8+, les lymphocytes T Natural Killer (TNK), et les lymphocytes T $\gamma\delta$  qui sont des lymphocytes cytotoxiques dont les fonctions sont à la frontière des réponses spécifiques et non spécifiques.

**Les lymphocytes T** se caractérisent par la présence d'un récepteur TCR (antigen specific T-cell receptor) et reconnaissent ainsi les antigènes présentés par les molécules du CMH présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Les fonctions des lymphocytes T varient en fonction du type : on distingue les lymphocytes T auxiliaires ou helper (Th), les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui expriment le marqueur de surface CD8, alors que les Th expriment le marqueur CD4. Après activation, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ peuvent se différencier en cellules **mémoires**, caractérisées par l'expression positive de **CD45RO+** et négative de CD45RA-. Ces cellules mémoires occupent une place importante car elles peuvent provoquer une réponse immunitaire secondaire lors d'une nouvelle présentation de l'antigène connu.

Les lymphocytes T **cytotoxiques CD8+** reconnaissent les antigènes présentés par les molécules CMH-I. En réponse à des signaux d'activation, ces lymphocytes sont capables de sécréter l'IFN- $\gamma$  reconnue comme une cytokine majeure de l'immunité anti-tumorale naturelle, ayant une action antiproliférative ou pro-apoptotique directe sur les cellules tumorales. De plus, l'IFN- $\gamma$  augmente l'expression des molécules de CMH-I sur les cellules tumorales et facilite ainsi leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8+ effecteurs. Par ailleurs, l'IFN- $\gamma$  peut aussi activer les cellules NK ou les macrophages, en augmentant par exemple, l'expression de molécules cytotoxiques, comme TRAIL.

Classiquement, **les lymphocytes T helper CD4+** produisent un large répertoire de cytokines et reconnaissent le complexe Ag-CMH-II (*Figure 5*). Parmi, les lymphocytes Th, on distingue Les Th1 caractérisés par la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2. Ils se différencient à partir de Th0 naïfs sous l'influence du facteur de transcription T-BET et d'IL-12, dont la sécrétion par les cellules dendritiques est favorisée par l'IFN- $\gamma$ . Les cytokines produites par les Th1 ont comme propriétés d'activer les cellules phagocytaires, les NK et les lymphocytes T CD8+. Les lymphocytes Th2 se différencient sous stimulation par l'IL-4, IL-5, IL-10 et TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), ils produisent de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Les lymphocytes Th2 augmentent la production d'anticorps par les lymphocytes B, stimulent l'hypersensibilité et les réponses immunes dirigées contre les pathogènes extracellulaires (ex : les parasites).



**Figure 5 – Polarisation des lymphocytes T CD4+.**

Sous l'influence de différentes cytokines, les lymphocytes T CD4+ se différencient en lymphocytes T helper (Th), et T régulateur (Treg). Ces types lymphocytaires se différencient par leur production cytokinique et leur action au sein du système immunitaire.

Chez un individu sain, il existe un équilibre entre le taux de lymphocytes Th1 et Th2 (Becker Y et al, 2005) (Figure 6). Une augmentation du taux de Th2, induite par certains pathogènes, entraîne une diminution de la réponse adaptative contre l'agresseur. Ce phénomène a aussi été décrit parmi les mécanismes d'invasion tumorale, lié à un échappement au processus d'immunosurveillance. Les cellules tumorales seraient capables d'augmenter la synthèse de cytokines Th2, telles que l'IL-4, l'IL-10, par les cellules dendritiques, via la sécrétion de lymphopoïétin thymique par les fibroblastes associés aux cellules tumorales (De Monte L et al, 2011 ; Pedroza-Gonzalez A et al, 2011). Ainsi, il a été rapporté qu'un infiltrat immunitaire GATA-binding factor 3 Expression - qui reflète une expression lymphocytaire Th2, était un facteur pronostique négatif dans les cancers du pancréas (De Monte L et al, 2011).

Au total, la présence de lymphocytes Th1 et des cytokines qu'ils produisent (IFN- $\gamma$ , IL-2) sont associés à une meilleure survie, alors que la présence de lymphocytes Th2 est, le plus souvent, associée à des tumeurs agressives, en raison de la production de cytokines immunosuppressives tel que l'IL-10, et de l'activation des lymphocytes B.

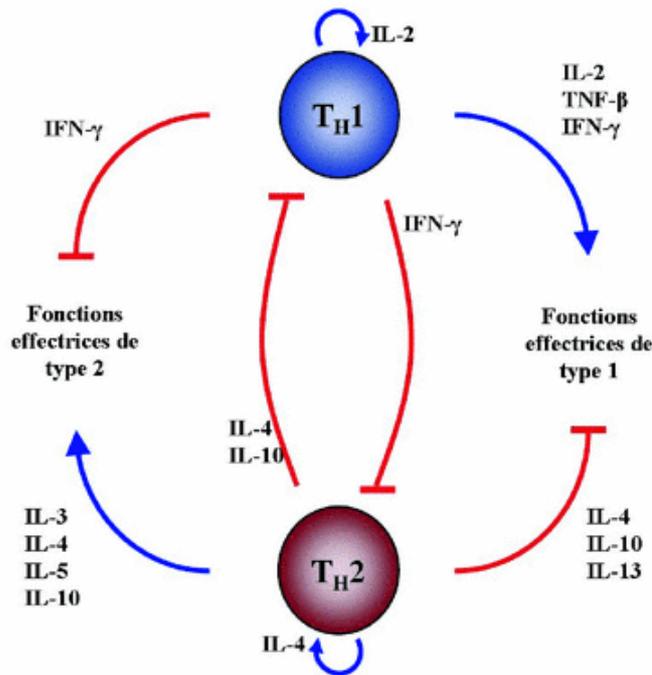


Fig. 9.

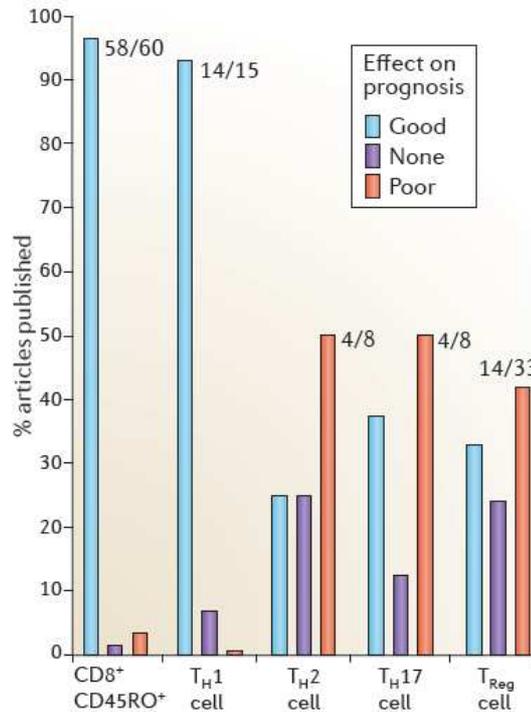
**Figure 6 – Balance lymphocytes Th1/Th2 (d’après Calmels B, 2004).**

L’action vis à vis du développement tumoral des **lymphocytes Th17** reste encore débattue. Ils se caractérisent par la sécrétion de cytokines telles que l’IL-17A, l’IL-17F, l’IL21 et l’IL-22. Les Th17 se différencient en présence de TGF-β, d’IL-6, et sous l’influence des facteurs de transcription RORαt (retinoic acid receptor related orphan receptor αt) et STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) nécessaires à leur développement. La présence de Th17 était associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs colorectales, pulmonaires et hépatocellulaires, (Liu J et al, 2011 ; Chen X et al, 2010 ; Zhang JP et al, 2009) ; mais à une meilleure survie dans les carcinomes oesogastriques (Chen J G et al, 2011).

**Les lymphocytes T régulateurs** sont caractérisés entre autre par une expression constitutive du CD25, du CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4) et du GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein). Leur marqueur

le plus spécifique est le facteur de transcription FoxP3. Leur fonction est essentiellement immunosuppressive. L'analyse de cohortes de patients a permis de montrer qu'un ratio élevé de lymphocytes Treg FoxP3+ sur les lymphocytes CD4+FoxP3- ou CD8+FoxP3- infiltrant la tumeur, était un facteur pronostique négatif (*Ladoire S et al, 2008 ; Senovilla L et al, 2012 ; Schreck S et al, 2009 ; Petersen RP et al, 2006 ; Gao Q et al, 2007 ; Leffers N et al, 2009 ; Sato E et al, 2005*).

De nombreux travaux ont permis d'analyser l'impact clinique de l'infiltrat lymphocytaire T au sein des tumeurs. Récemment, une large méta-analyse de 120 publications a rapporté l'impact pronostique de l'infiltrat cellulaire immunitaire, incluant les lymphocytes B, les macrophages, les MDSCs, les cellules NK, les sous-groupes de lymphocytes T, au sein des tumeurs de différents types histologiques. (*Fridman WH et al, 2012*). La présence de lymphocytes T (CD3+), de CTLs (CD8+), de T mémoire (CD45RO+) était associée à une survie globale et sans récurrence prolongée pour la plupart des types histologiques (mélanome, ORL, sein, vessie, tumeurs urothéliales, rein, prostate, ovaires, colorectal, poumon) (*figure 7*).



**Figure 7 –Analyse réalisée sur 124 études publiées visant à évaluer l’impact pronostique des TILs dans 20 types de cancer différents, en fonction de leur type : CD8+CD45RO+, Th1, Th2, Th17 et Treg (d’après Fridman WH et al, 2012).**

Au total, l’immunité adaptative exerce essentiellement un rôle d’immunosurveillance, et freine le développement des cellules tumorales ; la présence de lymphocytes CD3+ au niveau du site tumoral est prédictif de meilleur pronostic (Dunn GP et al, 2002 ; Dunn GP et al, 2004, Smyth MJ et al, 2001; Dalerba P et al, 2003, Zhang L et al, 2003).

En 2005, Pagès et al, (Pagès et al, 2005) ont démontré que les tumeurs colorectales de meilleur pronostic, c’est-à-dire ne présentant pas de facteurs histologiques péjoratifs, définies VELIPI négatives : pas d’embols veineux, pas d’envahissement lymphatique, pas d’engainement périnerveux, avaient un infiltrat lymphocytaire CD3+ significativement supérieur, par rapport aux tumeurs colorectales VELIPI positives. Les taux de lymphocytes T CD3+, CD3+CD4+ et CD3+CD8+, étaient augmentés d’un facteur 2,6 ; 2,5 et 4,9 respectivement (p<0.05)

dans les tumeurs VELIPI positives, en comparaison aux tumeurs VELIPI négatives. La caractérisation des lymphocytes T CD3+ au sein des tumeurs VELIPI négatives permettait d'identifier tous les sous-types de différenciation des lymphocytes T, avec un taux plus important de forme mature, représentée par les CD3+CD45RO+. La survie globale et sans récurrence des patients ayant une tumeur contenant une densité élevée de lymphocytes T CD3+CD45RO+ était significativement meilleure, en comparaison à celle des patients ayant des tumeurs à faible densité de T CD3+CD45RO+ ( $p < 0.001$ ). La présence de CD45RO+ était un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée. Par ailleurs, les taux d'ARNm témoins d'une polarisation des lymphocytes Th1, tels que T-BET, interferon regulatory factor 1, IFN- $\gamma$ , granulysin, granzyme B, étaient significativement supérieurs dans les tumeurs VELIPI négatives. Il a ainsi été proposé de définir un « Immunoscore » (*tableau 1*) basé sur la proportion de deux types lymphocytaires : CD3/CD45RO, CD3/CD8 ou CD8/CD45RO, au centre de la tumeur et au niveau du front d'invasion, qui serait un outil pronostique utilisable en pratique clinique (*Pagès F et al, 2009*).

**Tableau 1-** Procédures et étapes recommandées lors du calcul d'un « immunoscore » défini selon Pagès F et al, 2009.

Procédures	Etapes recommandées
Sélection de la tumeur	Faire un bloc de la zone tumorale contenant le plus de TILs, au niveau du centre de la tumeur et du front d'invasion
Préparation de l'échantillon	2 coups en paraffine de 4 $\mu$ du bloc
immunohistochimie	2 marquages simples avec des Anticorps IVD certifiés
Révélation antigénique	CC1-tris-based buffer pH8
Premier anticorps	CD3 (2GV6, Ventana) et CD8 (C8/144, DAKO)

**Au total, une infiltration tumorale avec des taux élevés de d'effecteurs immunitaires (lymphocytes CD8+, cellules myéloïdes CD16+ et cellules NK), associée des taux faibles de cellules immunosuppressives sont le plus souvent associés à un meilleur pronostic dans la majorité des types histologiques néoplasiques.**

**En conclusion, suite à leur activation, certaines cellules immunitaires, ont une activité cytotoxique directe sur les cellules tumorales (les cellules NK, les lymphocytes T $\gamma\delta$ , les lymphocytes T CD8, les macrophages). Ce mécanisme de lyse peut impliquer les granules cytotoxiques de perforine/granzyme ou bien des récepteurs de mort membranaires, tels que FasL, TRAIL ou TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, la production de nombreuses cytokines par les cellules NK, NKT et les lymphocytes T résulte en une action anti-tumorale plus ou moins directe. Les réponses cellulaires de type Th1/Tc1 visent à limiter le développement de tumeurs.**

### **1.1.2 Immunité anti-tumorale humorale**

Une réponse anti-tumorale humorale témoigne d'une immunogénicité naturelle des tumeurs. Ainsi, il est possible de détecter des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux dans le sérum des patients atteints de stades précoces de cancer (*Reuschenbach M et al, 2009*), à des taux supérieurs comparativement aux taux de sujets sains (hormis pour MUC1). Les antigènes tumoraux induisent une réponse immunitaire cellulaire et/ou humorale. Ils sont présents à la surface des cellules tumorales, sous forme d'épitopes ou fragments sur les molécules du CMH-I, capables de stimuler les lymphocytes CD8+. Ces épitopes peuvent aussi être liés à

des molécules du CMH-II des cellules présentatrices d'antigènes, reconnus par les lymphocytes CD4+.

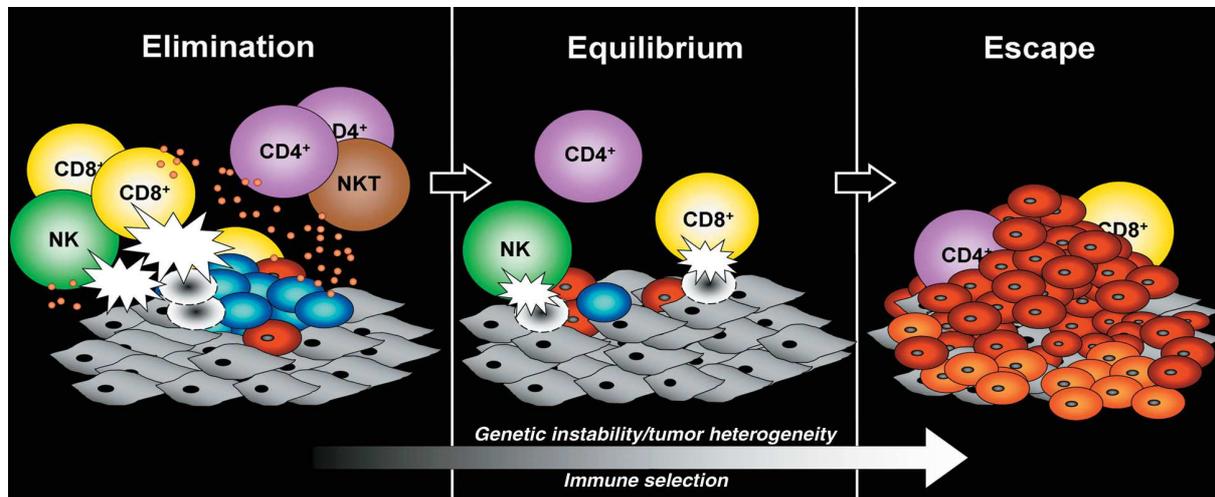
Plus de 100 antigènes tumoraux ont été identifiés, les plus étudiés sont cmyc, NY-ESO-1, MUC1, la cycline B1, p62 et la survivine. Des études ont montré que ces anticorps étaient détectables dès le stade initial de la maladie et que leurs taux augmentaient avec la progression tumorale. Cependant, leur valeur diagnostique et pronostique restent débattues. En effet, la présence d'anticorps contre MUC1 est associée à une meilleure survie des patients atteints de cancers du sein, de l'estomac, du poumon, de l'ovaire et du pancréas. En revanche, la détection d'anticorps contre p53 et NY-ESO- 1 dans les cancers du sein et de la prostate respectivement, est corrélée à un mauvais pronostic (*Reuschenbach M et al, 2009*).

### **1.1.3 Immunotolérance et échappement tumoral**

La croissance tumorale n'est pas uniquement liée à des modifications génétiques présentes au sein des cellules tumorales, mais aussi à des phénomènes locaux, environnementaux. Durant, ces vingt dernières années, il a été démontré que l'environnement tumoral : stroma tumoral, cellules endothéliales et cellules immunitaires, occupaient une place prépondérante dans le développement et la progression tumorale.

Le phénomène d'échappement tumoral a été rapporté à la sélection de variants tumoraux possédant une immunogénicité réduite, et est résumé par le modèle décrit par Dunn (*Dunn GP, 2002*) : il s'agit de la règle des 3 E : élimination – équilibre – échappement. Le concept d'immunosurveillance intervient dans la phase d'élimination, puis une phase d'équilibre dynamique se met en place entre le système immunitaire et les variants tumoraux, ensuite survient la phase

d'échappement durant laquelle les variants tumoraux insensibles au système immunitaire ont une croissance incontrôlée (*figure 8*).



**Figure 8– Principe d'échappement tumoral à l'immunosurveillance.**

*La règle des 3 E : élimination – équilibre – échappement (d'après Dunn et al, 2002)*

L'échappement tumoral au système d'immunosurveillance est un phénomène complexe, multifactoriel, au cours duquel les cellules tumorales vont déjouer les mécanismes de défense de l'hôte en modifiant leur microenvironnement, par la formation de néo-vaisseaux, par la modification de l'infiltrat cellulaire immunitaire, ou par l'activation de fibroblastes associés aux tumeurs (Hanahan D, Coussens LM, 2004). Les cellules tumorales sont aussi capables de produire des cytokines telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10, ayant un rôle immunosuppresseur. Ainsi, dans des études expérimentales, il a été démontré que le système immunitaire inné pourrait favoriser la croissance tumorale par la production locale de facteurs pro-inflammatoires (Coussens LM et al, 2004), tels que le TNF- $\alpha$ , par les cellules du stroma tumoral (Greten FR et al, 2004 ; Pikarsky E et al, 2004 ; Clevers H, 2004).

### **1.1.3.1 Phénomène d'immunotolérance**

Le système immunitaire est capable de réagir contre les antigènes tumoraux exprimés par les tumeurs, comme en témoigne la présence d'anticorps dirigés contre ces antigènes. Cependant, bien que la tumeur et les antigènes tumoraux puissent avoir été identifiés par le système immunitaire, les lymphocytes T stimulés en réponse et spécifiquement dirigés contre ces antigènes (*Zorn E et al, 1999*) peuvent ne pas être fonctionnels, autrement dit, ne pas présenter d'activité cytotoxique spécifique (*Lee PP et al, 1999*), ce qui conduit à une immunotolérance. Ce phénomène d'immunotolérance peut résulter de l'absence de reconnaissance de l'antigène (ignorance), ou de l'élimination (délétion) ou encore de l'inactivation (anergie) des lymphocytes spécifiques ayant rencontré l'antigène. Il a été montré qu'une immunotolérance pouvait être induite par délétion des lymphocytes T spécifiques (*Bogen B, 1996*) ou par induction de lymphocytes T anergiques (*Staveley-O'Carroll K et al, 1998, Willimsky G et al, 2005; Lyman MA et al, 2004*). Cette immunotolérance des lymphocytes T pourrait être liée à une quantité insuffisante de signaux de danger capables d'activer les cellules dendritiques au niveau de la tumeur. Ainsi il est possible de restaurer une immunité anti-tumorale par l'injection de signaux de danger tels que les ligands de TLR (*Rabinovich GA et al, 2007*).

### **1.1.3.2 Formation de néo-vaisseaux**

Un des processus du développement tumoral repose sur la formation de néo-vaisseaux afin d'alimenter le tissu tumoral et de permettre son développement. L'architecture anormale de ces néo-vaisseaux, caractérisée par une perte des connections entre les cellules endothéliales, empêche le passage vers le site tumoral des cellules NK, des CTLs et des lymphocytes T NK, nécessaires à l'élimination des

cellules tumorales (*Onrust et al, 1996; Manzur et al, 2008*). Ainsi, l'inhibition de l'angiogénèse, par le blocage du vascular endothelial growth factor (VEGF), pourrait permettre, entre autre, de restituer une architecture vasculaire normale, et d'augmenter l'afflux de CTLs sur le site tumoral (*Goel et al, 2011; Manzur et al, 2008*).

### **1.1.3.3 Activité immunosuppressive du microenvironnement**

Le microenvironnement tumoral contient de nombreux types de cellules immunitaires ayant une activité immunosuppressive, capables de bloquer l'action des CTLs ou des lymphocytes T NK. Au sein de cet infiltrat, sont présents des lymphocytes Treg, des cellules suppressives dérivés de myéloïdes (MDSCs), des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) activés par des cytokines de type Th2, des neutrophiles et des mastocytes qui protègent les cellules tumorales contre la destruction par les lymphocytes T (*Ruffell B et al, 2010*).

Comme nous l'avons vu précédemment, les lymphocytes Treg marqués CD4+CD25+FOXP3, recrutés sur le site tumoral par l'action de cytokines telles que CCL2 et TGF- $\beta$ , exercent une action immunosuppressive et sont généralement associés à un mauvais pronostic (*Curiel et al, 2004*).

Par ailleurs, au sein de cet infiltrat du microenvironnement, sont présentes des **cellules suppressives dérivées de myéloïdes (MDSCs)** caractérisées par l'expression du CD11b et de Gr1 (Ly-6G/C). Les MDSCs entraînent une suppression de la prolifération des lymphocytes T par le biais de l'arginase I et augmente le taux de lymphocytes Treg (*Ostrand-Rosenberg S, 2008*).

Après stimulation par différentes cytokines (IL4, IL-13...), des précurseurs macrophagiques se différencient sous forme de **macrophages associés aux tumeurs (TAMs)**, caractérisés par leur absence d'activité cytotoxique (*Qian BZ, Pollard*

*JW, 2010*), par leur capacité à bloquer la prolifération des lymphocytes CD8+, par leur production de facteurs immunosuppresseurs (*Denardo et al, 2011; Doedens et al, 2010; Kryczek et al, 2006; Movahedi et al, 2010*). Les TAMs exercent aussi une action immunosuppressive en recrutant sur le site tumoral des lymphocytes Treg par la production de la chimiokine CCL22 (*Curiel et al, 2004*). Aussi, l'analyse de tissus issus de carcinome mammaire a permis de montrer que la présence de TAMs exprimant des marqueurs immunosuppresseurs était associée à un moins bon pronostic, et était inversement corrélée au taux de lymphocytes CD8+ (*Denardo et al, 2011*).

Par ailleurs, **les fibroblastes associés aux cellules tumorales (CAFs)** sont capables de produire des cytokines responsables du recrutement de cellules immunitaires « permissives », mais aussi d'inhiber l'action cytotoxique des lymphocytes T et des T NK en sécrétant du TGF- $\beta$ , ce qui contribue au blocage d'une réponse inflammatoire locale qui pourrait freiner la progression tumorale (*Stover et al, 2007*). De plus, les CAFs sont pro-angiogéniques par la production de VEGF.

#### **1.1.3.4 La perte d'autophagie**

Le phénomène d'autophagie est un processus homéostatique qui a lieu chez tous les éléments cellulaires eucaryotes. L'autophagie consiste en la dégradation de composants cytoplasmiques. Ces derniers sont enfermés dans des vésicules à double membrane, formant ainsi des autophagosomes. Ces structures vont ensuite fusionner avec les lysosomes, afin d'être dégradés et recyclés (*Figure 9*) (*Choi AM et al, 2013*).

L'autophagie pourrait avoir une influence multifactorielle sur l'initiation et la progression tumorale. En effet, la perte de l'autophagie dans les cellules cancéreuses pourrait leur permettre de survivre au stress oxydatif, à l'hypoxie et au

stress induits par les anti-néoplasiques. Des études cliniques rapportent que les tumeurs ayant une expression anormale de la protéine autophagique Beclin 1, ont un moins bon pronostic (*Ravikumar B et al, 2010 ; Giatromanolaki A et al, 2011 ; Koukourakis MI et al, 2010*). Aussi, il a été montré que la perte mono allélique du gène BECN1 situé sur le chromosome 17q21, qui code pour la protéine Beclin 1, était présente chez 40 à 75% des carcinomes mammaires, ovariens et prostatiques (*Ravikumar B et al, 2010 ; Rubinsztein DC et al, 2012 ; Liang XH et al, 1999*). De plus, les fonctions autophagiques liées à l'expression de Beclin 1 dans les tissus tumoraux pourraient être supprimées par l'activation de la voie AKT (*Wang RC et al, 2012*). Enfin d'autres données sont en faveur d'une autophagie diminuée dans les cancers humains, tels que l'altération de l'expression de protéines liées aux fonctions autophagiques (*Kim MS et al, 2011*) et la présence d'aberrations chromosomiques de gènes de l'autophagie dans les tumeurs (*Levine B, Kroemer G, 2008*).

La formation des vésicules autophagosomes nécessite la conversion de la forme libre d'une protéine du microtubule (ubiquitin-like protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3, ATG8) en forme conjuguée LC3-II par la phosphatidyléthanolamine lipidique cellulaire. Ainsi, la présence de dépôts intracellulaires de LC3, révélés par des techniques d'immunohistochimie, permet d'authentifier le processus d'autophagie. Il a été montré dans des études expérimentales de modèle murin, qu'une augmentation du marquage intracellulaire de LC3 dans les cellules tumorales autophagiques-compétentes survenait en réponse aux traitements anti-néoplasiques, comparativement aux cellules déficientes. L'intensité du marquage était liée à la réponse à la chimiothérapie (*Ladoire S et al, 2012*).

Au total, le phénomène d'autophagie et surtout la perte de la capacité à l'autophagie sont impliqués dans la progression tumorale, mais aussi dans la réponse aux agents de chimiothérapie.



**Figure 9 –Phases de l'autophagie**

*La première phase correspond à la formation d'un pré-autophagosome : élongation de la vésicule et formation de l'autophagosome puis séquestration du matériel. La deuxième phase correspond à la fusion entre le lysosome et l'autophagosome. Au cours de la dernière phase, le contenu de l'autophagosme est détruit par les hydrolases lysosomales (d'après Choi AM et al, 2013).*

**En conclusion, au sein du microenvironnement tumoral cohabitent des effecteurs immunitaires qui exercent un rôle protecteur, visant à freiner le développement et la progression tumorale, et des éléments ayant une action immunosuppressive, permissive au développement tumoral. La connaissance de ces différents acteurs est indispensable en recherche thérapeutique anticancéreuse, afin de cibler des mécanismes d'action pouvant soit intensifier le rôle des effecteurs anti-néoplasique, soit freiner l'action des éléments immunosuppresseifs.**

## **1.2 Traitements anti-néoplasiques et système immunitaire**

Le but des traitements anti-cancéreux était majoritairement basé sur la destruction de ces cellules ayant une capacité proliférative élevée (*Chabner BA, Roberts TG Jr, 2005; Hanahan D, Weinberg RA, 2000*). Cependant, le développement des traitements anti-néoplasiques et l'analyse de la réponse à ces traitements ne peuvent s'appuyer uniquement sur ces données cellulaires intrinsèques. En effet, nous avons vu qu'il était clairement établi que le microenvironnement tumoral participait à la progression tumorale, et pouvait ainsi être une cible thérapeutique (*Blankenstein et al, 2005*).

Les agents de chimiothérapie conventionnels ont un effet cytotoxique direct et entraînent la mort des cellules cancéreuses. Cependant, l'efficacité des agents de chimiothérapie tels que les anthracyclines et l'oxaliplatine est supérieure chez des modèles murins immunocompétents, en comparaison à des modèles immunodéficients (*Casares J et al, 2005; Apetoh L et al, 2007*). De plus, il a été démontré que la réponse aux agents de chimiothérapie était diminuée en cas de lymphopénie (*Ray-Coquard I et al, 2009*), et que l'immunosuppression était un facteur prédictif de réponse moindre aux anthracyclines et à l'oxaliplatine (*Apetoh L et al, 2007; Ghiringhelli F et al, 2009; Tesniere A et al, 2010*). Ceci est en faveur d'une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur, induite par les agents de chimiothérapie.

Les agents anti-néoplasiques peuvent déclencher une réponse immunitaire de l'hôte contre sa tumeur par différents mécanismes, tels que :

- l'activation indirecte des effecteurs immuns (imatinib mesylate ou inhibiteurs des histone déacétylases et NK)

- l'inhibition de fonctions immunosuppressives (lymphocytes Treg (comme le cyclophosphamide), MDSCs (comme la gemcitabine ou l'ATRA),
- l'induction d'une mort tumorale immunogène (anthracyclines et RT).

La réponse d'une tumeur à la chimiothérapie pourrait être liée au taux d'infiltrat inflammatoire présent au sein de cette tumeur, comme il l'a été démontré dans les cancers du sein (*Desmedt C et al, 2008 ; Iwamoto T et al, 2011 ; Sotiriou C et al, 2009 ; Andre F et al, 2010 ; Denkert C et al, 2010*). Un ratio élevé entre les lymphocytes CD8+ et les Treg FOXP3+ était corrélé à une réponse histologique augmentée, et à une survie sans récurrence et globale prolongées ; ce ratio était un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée (*Ladoire S et al, 2008; Ladoire S et al, 2011*). Il a aussi été rapporté qu'un infiltrat riche en lymphocytes CD8+ au niveau du front d'invasion de métastases hépatiques d'origine colorectale, était corrélé à un meilleur taux de réponse à la chimiothérapie et à une survie prolongée (*Halama N et al, 2011*).

Cependant, il est actuellement difficile de savoir si la survie est prolongée en raison de la réponse immunitaire du patient qui le protège d'une récurrence tumorale, ou du fait d'une meilleure réponse à la chimiothérapie.

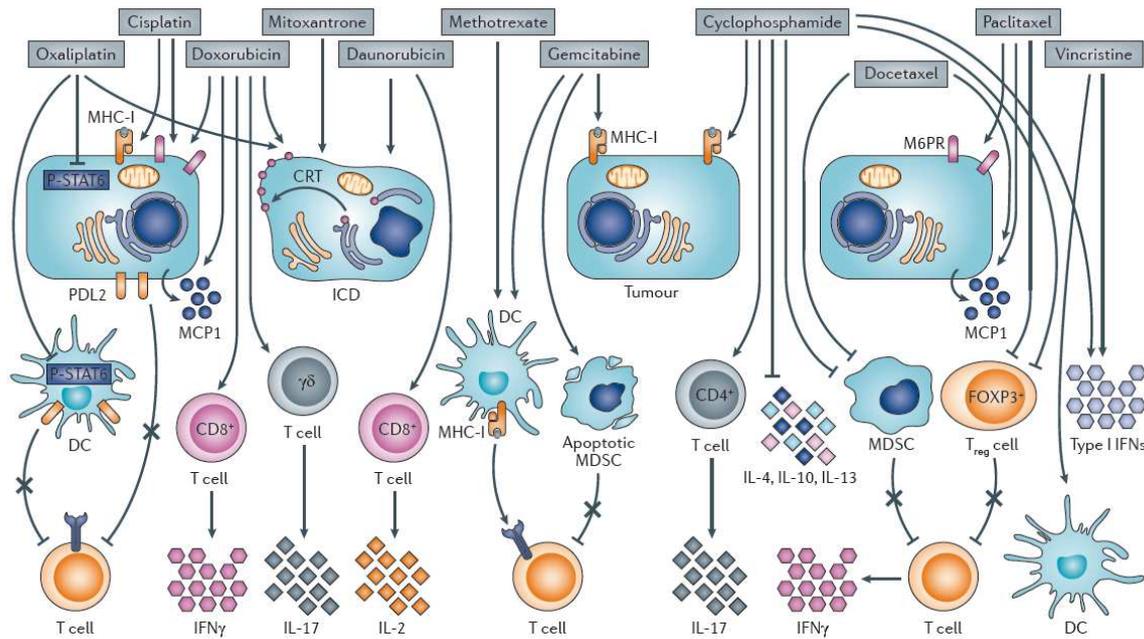
### **1.2.1 Action immuno-stimulatrice des agents de chimiothérapie**

Les chimiothérapies conventionnelles ont un effet immunosuppressif, mais parallèlement, il a été démontré que leur action anti-néoplasique pouvait être rapportée, au moins en partie, à une action immuno-stimulatrice, par différents mécanismes (*figure 10*) :

- l'activation directe des lymphocytes CD4+, CD8+ et les T $\gamma\delta$ , ce qui entraîne la production d'IL-2, IFN $\gamma$  et d'IL-17

- l'activation des cellules dendritiques,
- l'inhibition des cellules immunosuppressives : MDSCs et lymphocytes Treg
- l'inhibition de la phosphorylation de STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6),
- l'augmentation de l'expression des molécules du CMH-I par les cellules tumorales
- l'augmentation de la perméabilité des cellules tumorales au granzyme B
- l'inhibition de la production locale d'IL-4, IL-10 et IL-13
- la libération de la protéine attractive de monocytes (monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1))
- l'augmentation de l'expression d'IFN de type I
- l'induction d'une mort immunogène

Les différentes actions immuno-stimulatrices d'agents de chimiothérapie conventionnels sont décrits sur la *figure 10*. Brièvement, la gemcitabine augmente l'expression des antigènes HLA (human leukocyte antigen) de classe I par les cellules malignes, majore la présentation des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques aux lymphocytes, tue sélectivement les cellules MDSCs, et favorisent ainsi la réponse immunitaire T dépendante contre la tumeur (*Liu WM et al, 2010; Nowak AK et al, 2003; Nowak AK et al, 2003; Mundy-Bosse BL. AI, 2011; Vincent J et al, 2010*). L'oxaliplatine augmente l'expression de HLA-I, mais aussi inhibe STAT6 qui régule l'expression de PDL2 (programmed death ligand 2), ce qui permet de limiter l'immunosuppression induite par les cellules tumorales et les cellules dendritiques (*Lesterhuis WJ et al, 2011*). De plus, l'oxaliplatine, la doxorubicine (et la radiothérapie) sont capables de provoquer une mort immunogène (détaillée plus loin).



**Figure 10 – Mécanismes d'action potentiels des agents de chimiothérapie « conventionnels » sur les effecteurs immunitaires conduisant à une immuno-stimulation dirigée contre les cellules néoplasiques (d'après Galluzzi et al, 2012).**

interleukin-2 (IL-2), interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) IL-17; dendritic cells (DCs); immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); regulatory T (Treg) cells; signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6); programmed death ligand 2 (PDL2)-mediated immunosuppression; immunogenic cell death (ICD); class I major histocompatibility complex (MHC-I) molecules; mannose-6-phosphate receptor (M6PR); monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1); CRT, calreticulin; FOXP3, transcription factor forkhead box P3; P-STAT6, phosphorylated STAT6.

### 1.2.2 Action immuno-stimulatrice des thérapies ciblées

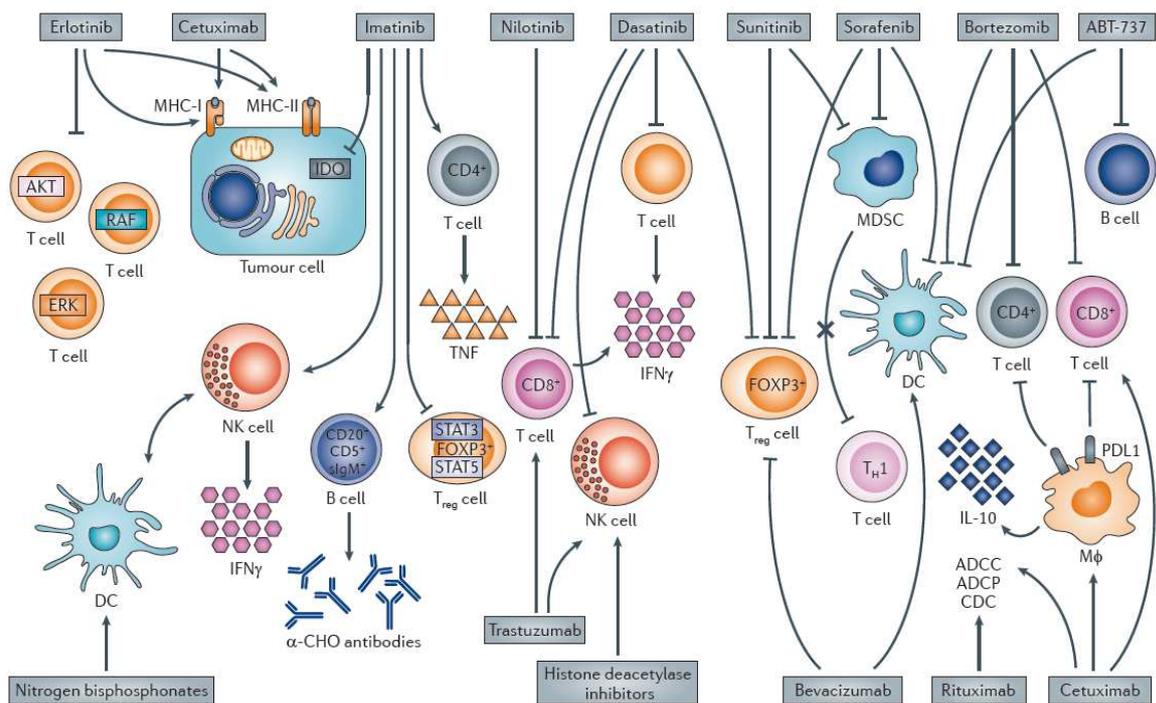
Les thérapies ciblées ont une action plus spécifique que les chimiothérapies dites conventionnelles; cependant, des effets secondaires de ces traitements peuvent être rapportés à différentes modes d'action sur le système immunitaire, comme il l'a été décrit dans de nombreux travaux. Il a ainsi été démontré que l'effet thérapeutique obtenu après l'administration de ces molécules était en partie du à leur

action sur le système immunitaire. En effet, les thérapies ciblées peuvent stimuler une réponse immunitaire par différentes voies (*figure 11*) :

- l'activation directe des CD4+, CD8+, entraînant ainsi une production de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$
- la stimulation des fonctions des cellules NK, des cellules dendritiques et de leur interaction
- l'inhibition des cellules MDSCs et des lymphocytes Treg
- l'augmentation de l'expression CHM-I et -II par les cellules néoplasiques, entraînant une réponse ADCC, une phagocytose Anticorps-dépendante (ACDP) ou une cytotoxicité complément- dépendante (CDC)
- l'inhibition indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)
- la stimulation des lymphocytes B CD20+CD5+sIgM+ producteurs d'anticorps anti-carbohydate ( $\alpha$ -CHO) ayant une activité anti-tumorale.

Les différentes actions des thérapies ciblées sur le système immunitaire sont décrites sur la *figure 11*.

Cependant, les thérapies ciblées peuvent aussi inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale en altérant les fonctions des lymphocytes B, T CD4+ et CD8+, cellules NK et DCs, en augmentant le recrutement de macrophages, ou en stimulant les fonctions immunosuppressives de ces-derniers.



**Figure 11 – Mécanismes d'action potentiels des thérapies ciblées sur les effecteurs immunitaires conduisant à une immuno-stimulation dirigée contre les cellules néoplasiques (d'après Galluzzi et al, 2012).**

*CD20+CD5+slgM+; B lymphocytes expressing at their surface CD5, CD20 and immunoglobulin M (IgM) molecules; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FOXP3, transcription factor forkhead box P3 (FOXP3); IL-10, interleukin-10; PDL1, programmed death ligand 1; slgM, surface immunoglobulin M; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TH1, T helper cell type 1.*

### 1.2.3 Mort immunogène induite par les anti-néoplasiques

Il a été récemment démontré que certains agents anti-néoplasiques avaient un effet stimulateur sur le système immunitaire inné et acquis, secondaire au stress qu'ils engendraient sur les cellules tumorales. Ce phénomène est défini sous le terme de mort immunogène (*Zitvogel L. et al, 2008*).

En effet, il est généralement admis que la mort cellulaire peut provoquer une réponse immunitaire si les cellules mourantes émettent un signal « eat me » et un signal « danger », responsables de leur phagocytose par les cellules dendritiques,

provoquant la maturation de ces cellules dendritiques. En provoquant la mort cellulaire des cellules tumorales, les chimiothérapies conventionnelles pourraient ainsi déclencher une réponse immunitaire de l'hôte contre la tumeur. Le concept de «chimiothérapie immunogène» a récemment été démontré, notamment par les travaux expérimentaux réalisés dans des modèles de cancer colique chez les rongeurs, par l'équipe de G. Kroemer (*Casares N et al, 2005*). Ainsi, après traitement par anthracyclines (doxorubicine, idarubicine, mitoxantrone), les cellules tumorales sont capables d'activer les effecteurs immuns : phénomène dénommé « mort immunogène ». Différents signaux « eat me » ont été décrits ; il s'agit de l'exposition sur la membrane cytoplasmique de la calréticuline, de la libération d'une protéine high mobility group B1 (HMGB1) et d'ATP dans le milieu.

Ainsi, l'induction d'une mort cellulaire « immunogène », c'est-à-dire capable de déclencher une réponse immunitaire de l'hôte contre sa propre tumeur, est également un objectif des traitements anticancéreux (*Lake RA et al, 2006 ; Zitvogel L et al, 2006 ; Zitvogel L et al, 2004*).

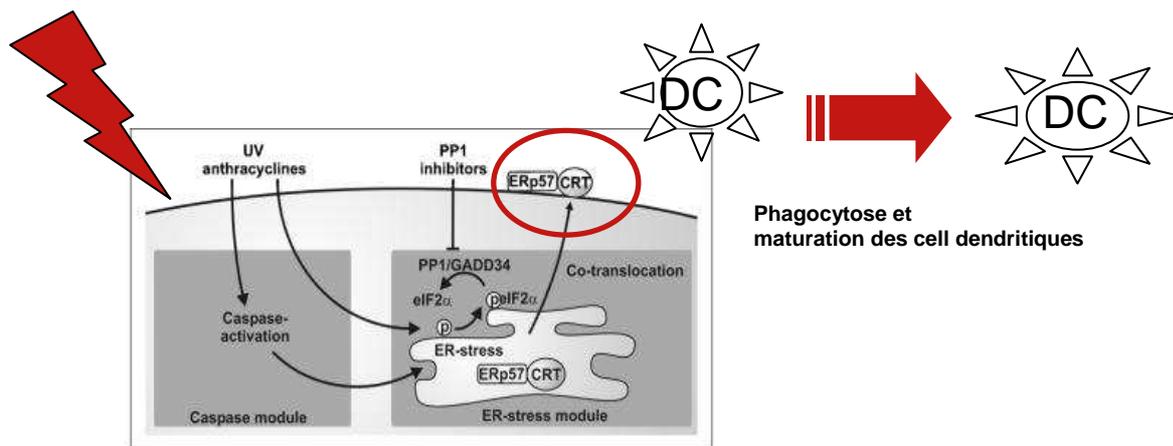
### **1.2.3.1 Exposition de la calréticuline : événement clé de la mort immunogène**

La calréticuline (CRT) est une protéine très conservée chez tous les organismes vivants, principalement localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique. Elle est responsable du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique et joue également un rôle de protéine chaperon en cas de stress cellulaire (*Sadasivan B et al, 1996; Bedard K et al, 2005*).

Sous l'effet du stress cellulaire, au niveau du réticulum endoplasmique, induit par l'agent de chimiothérapie, les cellules pré-apoptotiques exposent la CRT sur la face extracellulaire de la membrane plasmique (*Panaretakis T et al, 2009*). Cette-

dernière interagit avec le récepteur CD91 des cellules dendritiques, provoquant ainsi la phagocytose des corps apoptotiques provenant des cellules tumorales « stressées », puis la maturation des cellules dendritiques. La phagocytose des cellules tumorales mourantes par les cellules dendritiques est l'événement clé responsable de l'immunogénicité des cellules cancéreuses, elle est dépendante de l'apoptose des cellules tumorales induites par l'agent de chimiothérapie (Obeid M et al, 2006). Les cellules dendritiques matures sont alors capables de présenter les antigènes tumoraux aux cellules effectrices du système immunitaire les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Ces derniers deviennent alors cytotoxiques et producteurs d'IFN- $\gamma$ , ces deux propriétés étant corrélées à la fonte tumorale. L'exposition de la CRT au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules tumorales est le « eat me » signal,

Contrairement à la mort cellulaire induite par des agents apoptotiques standards (tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase, la staurosporine, ou les inhibiteurs de la topoisomérase et l'étoposide camptothécine), la mort cellulaire induite par les anthracyclines est précédée par l'exposition pré-apoptotique de la CRT au niveau de la membrane cytoplasmique (Obeid et al, 2007). Ce phénomène d'exocytose de la CRT appartient à une voie de transduction complexe qui comprend : la réponse au stress du réticulum endoplasmique, l'activation de PERK, le clivage de la Caspase-8, l'activation de Bax/Bak, la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  et enfin l'exocytose conjointe de la CRT et d'une autre protéine du réticulum endoplasmique : ERp57 (Laane E et al, 2009) (figure 12).



**Figure 12 – Exposition membranaire de la calréticuline suite au stress du réticulum endoplasmique induite par les anthracyclines ou les irradiations, conduisant à la maturation des cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes (d'après Kepp et al, 2009).**

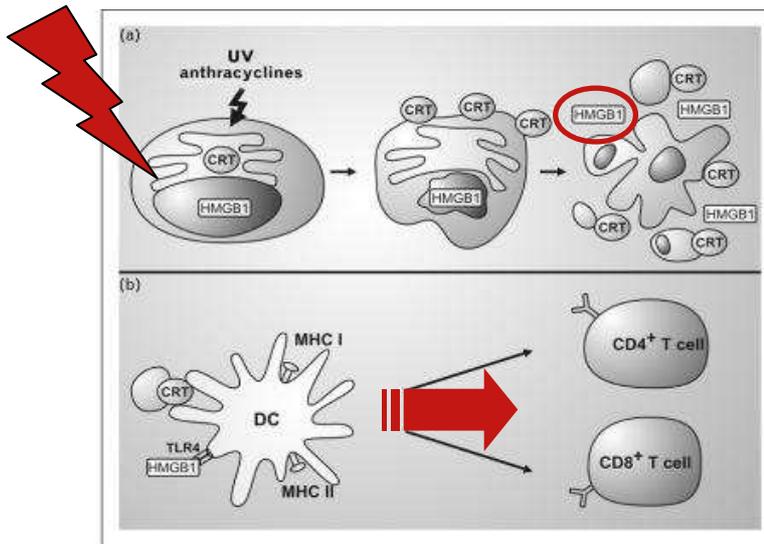
La calréticuline exposée au niveau de la membrane cellulaire peut être mise en évidence par immunofluorescence en cytométrie de flux, à la surface des cellules apoptotiques. Dans le travail rapporté par Obeid et al, (Obeid M et al, 2006), la CRT était détectable au niveau des membranes cellulaires des cellules tumorales viables, 1 heure après traitement par les anthracyclines. Par ailleurs, il existait une forte corrélation entre l'exposition de la CRT et l'immunogénicité induite par les agents apoptotiques.

Au total, certains agents de chimiothérapie (anthracyclines, oxaliplatine) provoquent l'exposition membranaire de la CRT par les cellules tumorales pré-apoptotiques. L'exposition de la CRT correspond à un « eat-me » signal, provoquant la maturation des DCs capables d'activer les effecteurs T.

### 1.2.3.2 Libération d'HMGB1 et induction d'une mort immunogène

Cependant, l'exposition de la CRT ne peut être le mécanisme d'induction d'une mort immunogène, puisque des cellules vivantes exprimant la CRT sur leur membrane cytoplasmique, ne sont pas pour autant capables d'entraîner la maturation des cellules dendritiques et la présentation d'antigènes, ce qui signifie qu'elles ne sont pas immunogènes. Par conséquent, d'autres phénomènes ou signaux interviennent dans l'induction d'une mort immunogène.

Les récepteurs Toll-like (TLRs) reconnaissent des molécules dérivées d'agents pathogènes, et également des signaux de danger intrinsèques (*Medzhitov R, Janeway CA Jr, 1997; Medzhitov R, 2001*). Apetoh et al, (*Apetoh L et al, 2007*) ont récemment démontré que la présence du récepteur TLR4 à la surface des cellules dendritiques était un pré requis, nécessaire à la présentation des antigènes issus des cellules tumorales aux lymphocytes T. En effet, les cellules tumorales mourantes post-apoptotiques libèrent la protéine HMGB1, qui se fixe au TLR4 des cellules dendritiques, capables alors de présenter les antigènes tumoraux aux cellules effectrices T. La libération de HMGB1 représente un autre « eat me » signal émis par les cellules tumorales mourantes, traités par anthracyclines ou irradiation (*figure 13*).

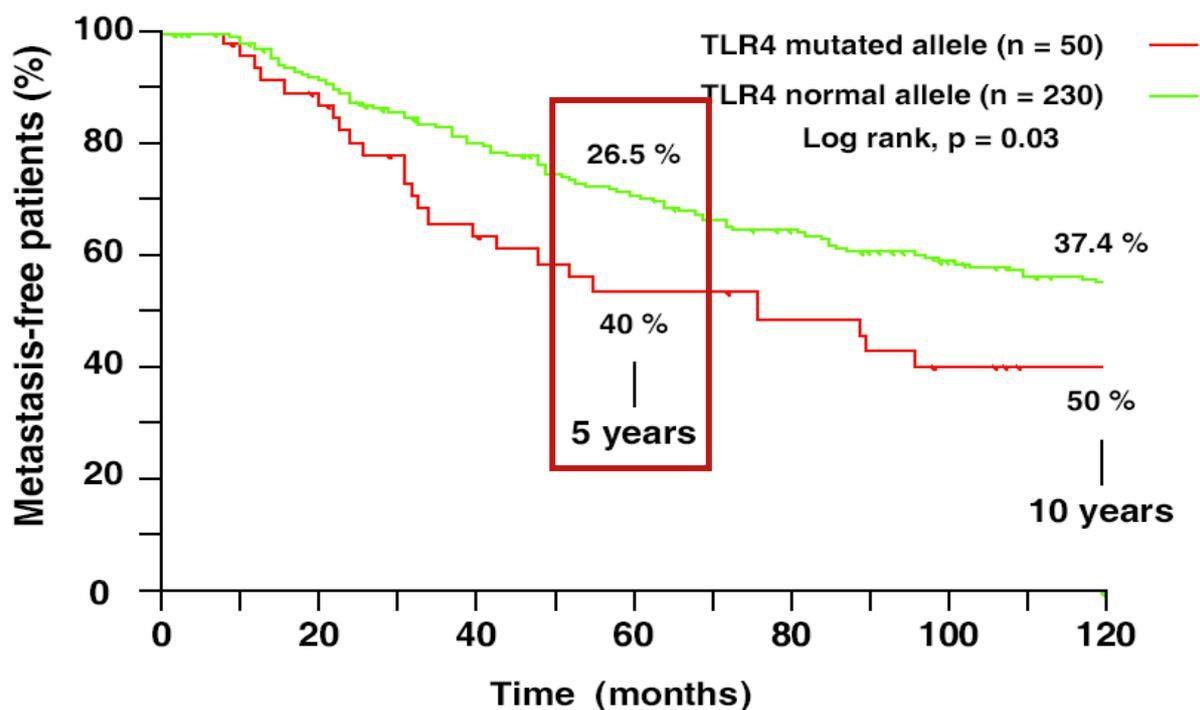


**Libération de HMGB1**

**Présentation Ag tumoral par DC  
Activation CD8+ spécifique**

**Figure 13 – Exposition de la calréticuline et libération d’HMGB1** par les cellules tumorales apoptotiques, traitées par anthracyclines ou irradiation. La fixation de l’HMGB1 sur le récepteur TLR4 des cellules dendritiques entraîne la maturation de ces cellules, capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T CD3+CD4+ et CD3+CD8+ (d’après Kepp et al, 2009).

Il a ainsi été montré, au sein d’une cohorte de 280 patientes opérées d’un cancer du sein non métastatique, que la présence d’un polymorphisme (Asp299Gly) de TLR4 (n=50/280), responsable d’un défaut d’expression de ce récepteur, était associé de façon significative à une diminution de la survie sans récurrence métastatique (26,5% versus 40% à 5ans, p=0,003) (figure 14) (Apetoh L et al, 2007).



**Figure 14 – Coures de survie sans récidive métastatique des patientes traitées par anthracyclines pour cancer du sein, en fonction du polymorphisme de TLR4.** La survie sans récidive métastatique des patientes ayant une mutation d'un des allèles du gène codant pour TLR4 ont une survie significativement diminuée par rapport à celle des patientes n'ayant pas de mutations (d'après Apetoh L et al, 2007)

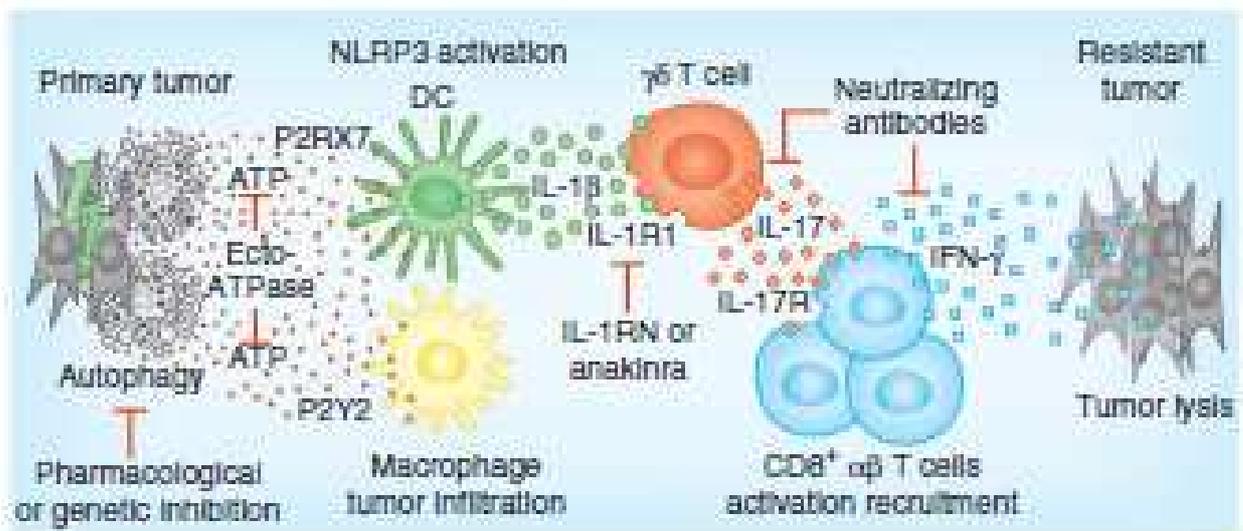
### 1.2.3.3 Libération d'ATP et induction d'une mort immunogène

Lors de la mort cellulaire les cellules tumorales libèrent dans le milieu de l'ATP (Selzner N et al, 2004). Il a été montré que lors de la mort cellulaire induite par différents types de chimiothérapie, la phase d'apoptose s'accompagnait d'une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP, alors que lorsque la cellule entrait en nécrose, les taux d'ATP intracellulaires devenaient indétectables (Martins I et al, 2009). Par conséquent, la libération d'ATP est un phénomène associé à la mort cellulaire par apoptose provoquée par les cytotoxiques. L'ATP extracellulaire se lie au récepteur

purinergique P2Y2 des macrophages et stimule ainsi l'infiltration des effecteurs immunitaires au niveau du site tumoral.

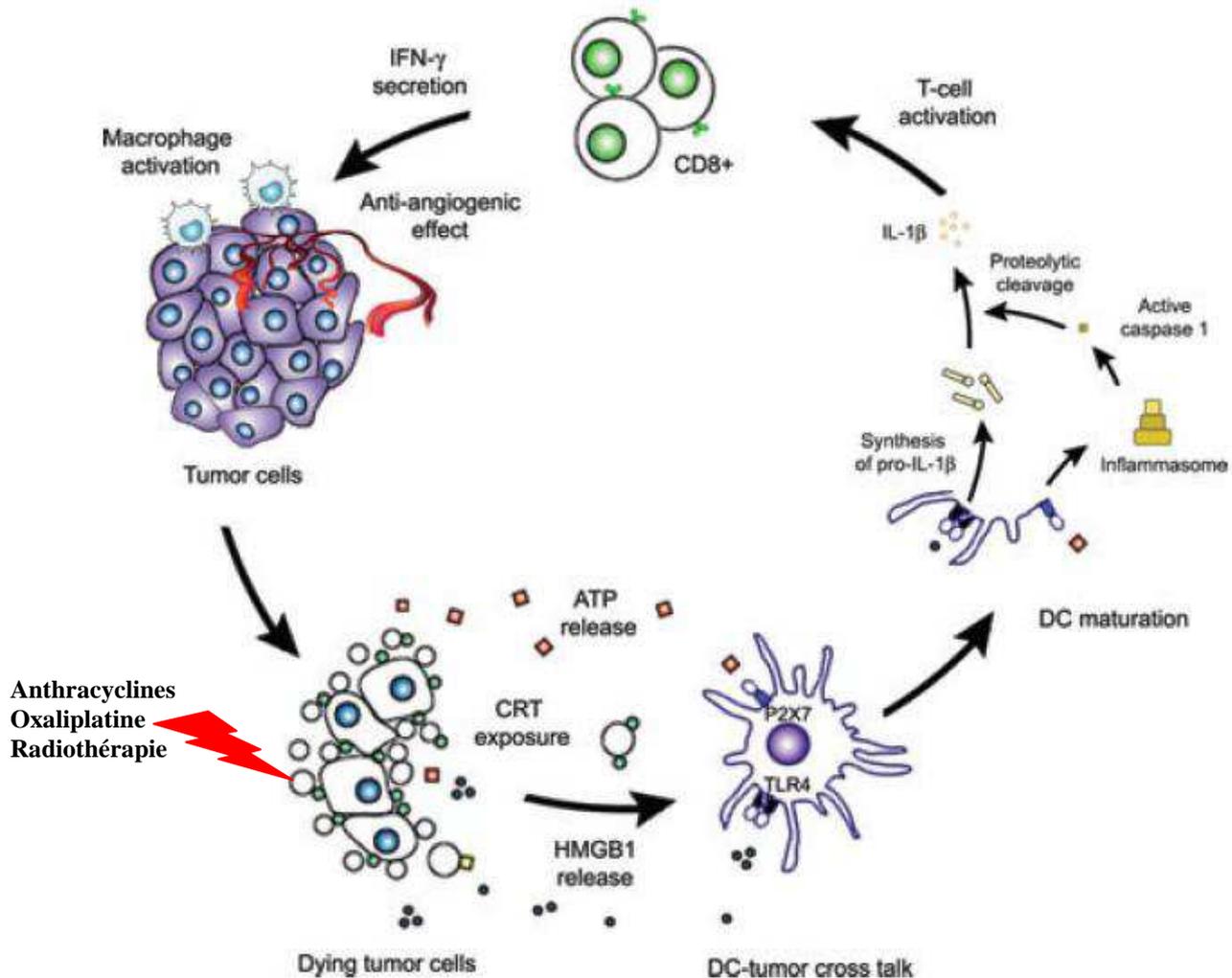
Par ailleurs, il a été démontré que l'ATP libéré lors de la mort cellulaire induite par les agents de chimiothérapie, se fixait sur le récepteur P2RX7 des cellules dendritiques (récepteur pour lequel l'ATP est le ligand endogène ayant le plus d'affinité), ce qui provoquait ensuite une activation du complexe inflammasome (NLRP3/ASC). Ceci entraînait une activation de la caspase -1, et aboutissait à la production d'IL-1 $\beta$  et à l'activation des lymphocytes T CD8+ (*figure 15*) (Ghiringhelli F et al, 2009 ; Mutini C et al, 1999). En se liant au récepteur IL-1R1, IL-1 $\beta$  attire les lymphocytes T $\gamma\delta$ , ce qui provoque la production d'IL-17, le recrutement de lymphocytes T CD8+ produisant de l'IFN- $\gamma$ , puis la destruction des cellules tumorales résiduelles. Ainsi, les inhibiteurs de l'autophagie : ATPases extracellulaires, antagonistes de l'IL-R1 récepteur (anakinra) et les anticorps capables de neutraliser l'IL17, le récepteur de l'IL-17, ou l'IFN- $\gamma$  sont capables d'inhiber ce mécanisme d'immunité anti-tumorale induite par la libération d'ATP.

Par conséquent, la présence d'ATP dans le milieu est un autre « eat me » signal, nécessaire à l'induction d'une mort immunogène.



**Figure 15- Mécanismes d'activation de l'inflammasome provoquée par la libération d'ATP dans le milieu extra-cellulaire par les cellules tumorales mourantes.** L'ATP présent dans le milieu extra-cellulaire (qui peut être digéré par des ectoATPase) se fixe sur les récepteurs P2RX7 des cellules dendritiques et P2Y2 des macrophages. La fixation au P2RX7 entraîne une cascade de réactions conduisant au recrutement de lymphocytes T CD8 cytotoxiques (d'après Zitvogel L et al, 2012).

Au total, certaines chimiothérapies (anthracyclines, oxaliplatine) et la radiothérapie, par le stress qu'ils provoquent au niveau du réticulum endoplasmique, peuvent induire une mort dite immunogène caractérisée par trois événements : l'exposition membranaire de la calréticuline par les cellules tumorales pré-apoptotiques, la libération d'HMGB1 et d'ATP dans le milieu extra-cellulaire, responsables de l'activation d'une activation des lymphocytes T (figure 16).

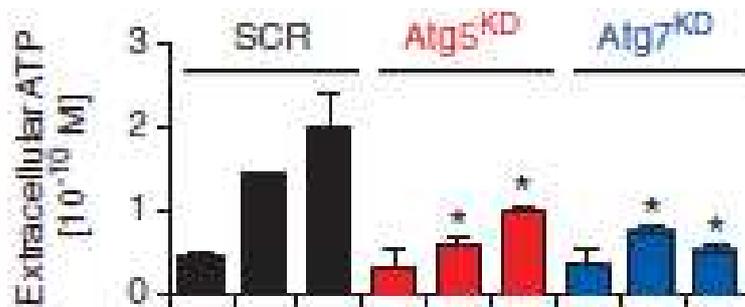


**Figure 16 - Schéma récapitulatif des mécanismes moléculaires nécessaires au dialogue entre cellules tumorales et cellules dendritique et induction d'une mort immunogènes (d'après Locher C et al, 2010)**

#### 1.2.3.4 L'autophagie : condition nécessaire à la mort immunogène

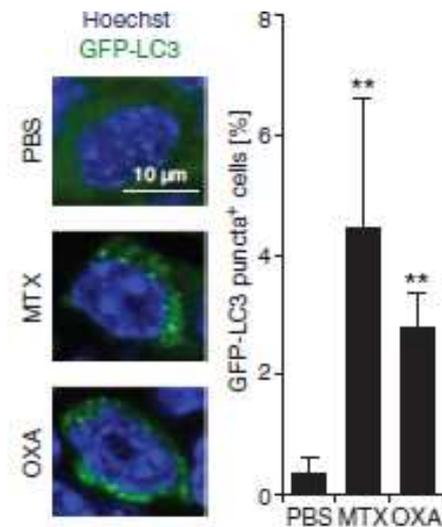
L'autophagie n'est pas indispensable à la mort cellulaire induite par la chimiothérapie, mais elle pourrait être nécessaire pour déclencher une mort immunogène en réponse à la chimiothérapie. En effet, dans un travail rapporté par Michaud et al, (Michaud et al, 2012), des cellules de cancer du colon (CT26) rendues autophagiques déficientes ( $Atg5^{KD}$  ou  $Atg7^{KD}$ ), traitées par mitoxantrone ou

oxaliplatine libéraient un taux inférieur d'ATP, en comparaison à des cellules CT26 autophagiques compétentes traitées de façon similaire (*figure 17*).



**Figure 17 – Concentration d'ATP extracellulaire libéré après traitement par mitoxantrone.** La concentration d'ATP est significativement supérieure pour les cellules autophagiques compétentes (SCR), comparée à celle des cellules autophagiques déficientes : *Atg5*<sup>KD</sup> ou *Atg7*<sup>KD</sup> (d'après Michaud et al, 2012).

Quelque soit le « statut autophagique », l'exposition au mitoxantrone ou à l'oxaliplatine entraînait une apoptose, l'extériorisation de la CRT et la libération d'HMGB1. Après traitement par mitoxantrone, la protéine de fusion LC3 était détectable uniquement dans les cellules tumorales autophagiques compétentes, et non dans les cellules déficientes. Ainsi, l'accumulation d'autophagosomes contenant la protéine LC3 était liée à un phénomène d'autophagie, en réponse au traitement par mitoxantrone ou oxaliplatine (*figure 18*).



**Figure 18 – Induction d’une autophagie *in vivo*, par administration d’une chimiothérapie intra-péritonéale chez un modèle murin ayant des tumeurs sous-cutanées dérivées de CT26 exprimant la GFP-LC3. 48 h après le traitement, le pourcentage de cellules tumorales ayant un marquage LC3 intra-cytoplasmique était augmenté après traitement par mitoxantrone et oxaliplatine, témoignant d’une autophagie (d’après Michaud et al, 2012).**

Dans un modèle murin immunocompétent, l’exposition au mitoxantrone entraînait l’accumulation intra-cellulaire de la protéine LC3 dans les cellules tumorales CT26 autophagiques compétentes, témoignant de l’induction *in vivo* d’une autophagie par le mitoxantrone. De plus, l’injection sous-cutanée à des souris immuno-compétentes, de cellules tumorales CT26 autophagiques compétentes traitées par mitoxantrone *in vitro*, suivie de l’injection de cellules tumorales de la même lignée et non traitées, entraînait une réponse anti-tumorale chez la souris, en l’absence de traitement, témoignant d’une vaccination obtenue par les CT26 traitées *in vitro*. En revanche, ce phénomène de vaccination anti-tumorale n’était pas obtenu après injection de cellules CT26 autophagiques déficientes. Par ailleurs, les cellules autophagiques déficientes perdaient leur capacité d’attraction des cellules dendritiques et d’activation des lymphocytes CD4+, CD8+ et T $\gamma$  $\delta$ . Par conséquent, le

« statut autophagique » des cellules tumorales était indispensable au déclenchement d'une mort immunogène induite par les agents de chimiothérapie.

L'inhibition de la dégradation de l'ATP extracellulaire, par l'injection d'un inhibiteur d'ecto-ATPase (ARL67156) (*Mandapathil M et al, 2010*) dans le milieu tumoral, permettait de restituer les fonctions autophagiques des cellules tumorales et donc d'induire une mort immunogène.

Ainsi, l'autophagie est essentielle pour la libération immunogène d'ATP à partir des cellules mourantes. L'augmentation des concentrations d'ATP extracellulaire permet d'améliorer l'efficacité des chimiothérapies lorsque le « statut autophagie » de ces cellules est désactivé, et pourrait en ce sens représenter une voie de recherche pour améliorer l'efficacité des traitements anti-tumoraux.

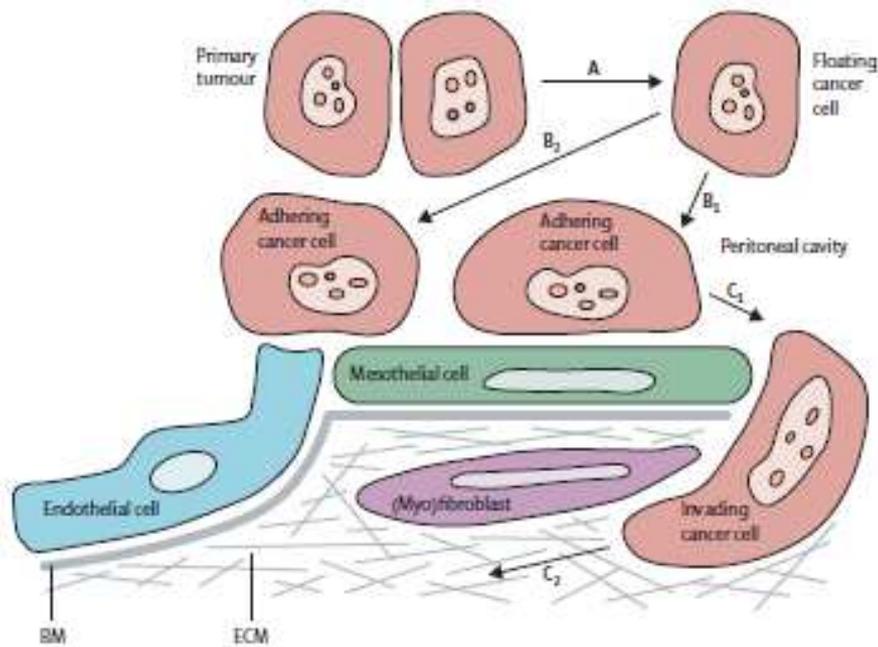
### **1.3 Immunothérapie et carcinose péritonéale**

La cavité péritonéale est recouverte d'une couche de cellules épithéliales (appelées également mésenchymateuses) solidement adhérentes les unes aux autres, formant une véritable barrière contre l'envahissement du tissu sous-péritonéal. D'une surface de 1,7m<sup>2</sup>, le péritoine a comme fonction principale l'absorption et la sécrétion de liquide péritonéal, ayant un rôle de lubrifiant, et dont la quantité varie de 50 à 100 mL chez un sujet sain. Le liquide péritonéal contient des protéines et des leucocytes essentiellement représentés par des monocytes et macrophages qui participent aux défenses immunitaires. Ainsi, l'homéostasie intrapéritonéale est régulée en grande partie par les cellules mésenchymateuses, capables de participer et d'activer la réponse immunitaire intrapéritonéale.

## **Carcinose péritonéale**

La carcinose péritonéale est définie par l'extension au péritoine de cellules cancéreuses issues de différentes origines. Elle est le plus souvent secondaire à des cancers d'origine digestive (colorectal, gastrique, pancréatique, vésiculaire...), ou gynécologique.

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'adhésion et de l'invasion du péritoine par les cellules tumorales : (1) le processus transmésothélial, (2) le processus trans-lymphatique. Lors du processus transmésothélial, les cellules tumorales libres dans la cavité péritonéale sont capables de se fixer, par l'intermédiaire du CD44 présents à leur surface, aux constituants de la matrice extracellulaire, de la membrane basale, de l'acide hyaluronique présent dans le surfactant sécrété par les cellules mésenchymateuses. Les cellules tumorales sécrètent des cytokines qui induisent une contraction des cellules mésenchymateuses, créant des espaces entre les cellules et ainsi, favorisent l'accès à la membrane basale (*figure 19*). Ces phénomènes seraient favorisés par la sécrétion de TGF- $\beta$  par les fibroblastes tumoraux, qui augmente l'expression du CD44 par les cellules tumorales (*Kotanagi H et al, 1998, Koyama T et al, 2000*).



**Figure 19 - Pathogénie de la carcinose péritonéale (voie péritonéale)**

(A) Détachement des cellules cancéreuses de la tumeur primitive. (B) Adhérence d'une sous-population de ces cellules aux cellules mésothéliales ou endothéliales par l'intermédiaire direct (B1) ou indirecte par des interactions fibrine médiée (B2). (C) Invasion à travers la couche de cellules mésothéliales et (D) dans le stroma. Pendant l'invasion des cellules cancéreuses peuvent traverser la membrane basale mésothéliales (BM), et interagir par la suite avec le collagène interstitiel de la matrice extracellulaire (ECM) et les cellules stromales, comme fibroblasts (myo) (d'après Wim P Ceelen, Marc E Bracke, 2009).

**1.3.1 Traitement actuel de la carcinose péritonéale**

**Chirurgie de cytoréduction et chimiohyperthermie intra-péritonéale**

Malgré l'instauration d'un traitement par chimiothérapie systémique, le pronostic de la carcinose péritonéale, indépendamment de son origine, reste sombre. Depuis une vingtaine d'années, une nouvelle approche thérapeutique de la carcinose péritonéale a été développée. Ce traitement consiste en une chirurgie de cytoréduction complète des nodules péritonéaux macroscopiques suivie de

chimiothérapie intra-péritonéale dont le but est de traiter la maladie microscopique résiduelle. L'objectif principal de l'administration intra-péritonéale (IP) de la chimiothérapie est d'augmenter la concentration et la quantité totale du produit administré, en réduisant les concentrations plasmatiques. Ce traitement a permis d'augmenter la survie des patients atteints de carcinomes d'origine colorectale, de pseudomyxomes et de mésothéliomes (*Elias D et al, 2009 ; Chua T et al, 2012 ; Yan TD et al, 2009*). En ce qui concerne les carcinomes d'origine gastrique, les résultats de la chimiothérapie intra-péritonéale, avec des agents « classiques » tels que la mitomycine C, l'oxaliplatine, et le 5FU, restent décevants, avec une survie globale à 5 ans de moins de 15% (*Glehen O et al, 2010*).

En raison du pronostic sombre des carcinomes péritonéaux et des résultats décevants d'un traitement associant une chirurgie de cytoréduction complète suivie de chimiothérapie intra-péritonéale à base d'agents cytotoxiques dans certains types de carcinome (notamment d'origine gastrique), de nouvelles thérapies chirurgicales doivent être développées, telle que l'immunothérapie intra-péritonéale en postopératoire immédiat, après chirurgie de cytoréduction complète.

## **1.3.2 Immunothérapie intra-péritonéale**

### **1.3.2.1 Immunothérapie et anticorps**

Les anticorps à visée thérapeutique représentent actuellement la classe à plus forte croissance de l'immunothérapie. Au cours des trois dernières décennies, plus de 30 anticorps monoclonaux thérapeutiques et leurs dérivés ont été approuvés et appliqués avec succès dans divers domaines thérapeutiques, notamment le cancer,

les transplantations d'organes, les maladies auto-immunes et les maladies cardiovasculaires.

Les anticorps sont des protéines ayant une structure bien particulière qui est responsable de leur fonction. Ils sont constitués de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) reliées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes sont formées de trois ou quatre domaines constants (CH) et d'un domaine variable (VH). Les chaînes légères sont formées d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). Le domaine variable de la chaîne légère et le domaine variable de la chaîne lourde forment le site de reconnaissance de l'antigène : le paratope (Fab : fragment antigen binding). L'anticorps peut donc lier deux molécules d'antigène. Le fragment constant (Fc) de l'anticorps permet la fixation du complément et la liaison aux récepteurs Fc (FcR) des cellules immunocompétentes.

Dans les années 1970, les techniques de fabrication (hybridoma technology) ont permis d'élaborer des anticorps dirigés contre les cellules tumorales qui expriment des cibles antigéniques à des niveaux plus élevés que les cellules normales. Les anticorps utilisés en immunothérapie contre le cancer peuvent neutraliser des cellules cancéreuses, ils se fixent par leur paratope sur les épitopes des antigènes situés à la surface des cellules cancéreuses et peuvent déclencher la cascade du complément. Les cellules cancéreuses sont perforées et la phagocytose est facilitée. L'élément pathogène est alors lysé. Les anticorps après avoir reconnu un antigène peuvent également se fixer aux récepteurs Fc des cellules immunocompétentes: macrophages, lymphocytes Natural Killer (NK), afin de déclencher la phagocytose ou le phénomène de cytotoxicité des lymphocytes NK.

La recherche s'est appliquée à apporter de nombreuses modifications à ces anticorps dans le but d'améliorer leur efficacité. Ainsi, les anticorps monoclonaux

peuvent être conjugués à un agent cytotoxique (toxine, enzyme...), l'anticorps se conduisant comme un vecteur permettant de délivrer l'agent cytotoxique au niveau de la cellule cible. D'autres approches ont été développées tels que les anticorps monoclonaux bi-spécifiques, les anticorps à action intracellulaire ou encore les fragments d'anticorps recombinants.

### **1.3.2.2 Le péritoine : un microenvironnement immunocompétent**

Le péritoine représente un microenvironnement immunocompétent, capable de recruter des cellules sanguines et de générer une défense immunitaire (*Kubicka U et al, 1996 ; Broche F et al, 2001*). Dans la cavité péritonéale saine, sont présents des monocytes et macrophages (45%), des lymphocytes T (CD3+, 45%), des cellules NK (8%) et de cellules dendritiques (2%). Plus des trois-quarts des lymphocytes T CD4+ et CD8+ présents dans la cavité péritonéale, expriment le marqueur CD45R0+, ce qui confirme le caractère immunocompétent du péritoine.

En effet, les cellules mésenchymateuses sont capables de stimuler une réponse immunitaire par différents mécanismes : (1) après stimulation, elles sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires tel que l'IL-1, l'IL-6, les cellules mésenchymateuses sont également capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T, provoquant ainsi leur activation et prolifération, en réponse à une agression, qui peut être bactérienne, traumatique ou néoplasique.

Lors d'une agression bactérienne, les populations cellulaires présentes dans la cavité péritonale, sont véritablement modifiées. Durant la première phase, le taux de granulocytes augmente, afin de combattre l'infection bactérienne. Ensuite, après éradication de l'infection, survient la seconde phase, correspondant à un état d'inflammation péritonéale. Le liquide péritonéal est alors majoritairement composé

de cellules monoclées : macrophages et lymphocytes. Cette phase marque le passage d'une réponse immunitaire innée à une réponse acquise.

Afin d'étudier l'état d'inflammation péritonéale, les liquides péritonéaux des patients traités par dialyse péritonéale au long cours ont été analysés (*Glik et al, 2006*). Au cours du premier mois de traitement, le pourcentage de lymphocytes augmente, avec un ratio de lymphocytes T CD4+/CD8+ inversé par rapport au sang : mesuré à 1,7-2 dans le sang, contre 0,5 dans le péritoine. La majorité des lymphocytes CD4+ (92%) et CD8+ (73%) expriment le marqueur CD45RO, témoin d'une activité mémoire, alors que dans le sang, ce marqueur est présent sur la moitié des CD4+ et 30% des CD8+. Enfin, la majorité des lymphocytes T du péritoine sécrètent des cytokines de type Th1 (IL-2 et INF $\gamma$ ). Tout ceci est le reflet d'une réponse inflammatoire du péritoine, marquée par un recrutement de cellules immunitaires.

Après une chirurgie gastrointestinale, une diminution des effecteurs de l'immunité innée (monocytes, NK, NK-T) dans le liquide péritonéal prélevé à J1 et J2 chez 25 patients, a été rapportée (*Decker et al, 2005*). Elle était associée à une augmentation des taux d'INF $\gamma$ , IL-2, IL-4, et IL-13 dans le liquide péritonéal, et à une augmentation de l'expression de HLA-DR par les monocytes. De plus, les concentrations intrapéritoineales de TNF $\alpha$  et d'IL-6 étaient supérieures dans le liquide péritonéal postopératoire par rapport à celles sanguines. Tout ceci était en faveur d'une réponse immunitaire spécifique, avec recrutement de cellules immunes et production de cytokines, après chirurgie abdominale.

**Dans les ascites malignes**, l'environnement immunitaire péritonéal a été essentiellement étudié chez des patientes atteintes de carcinome ovarien. Il a ainsi été montré que de nombreux effecteurs immunitaires (cellules présentatrices d'antigènes, macrophages et monocytes, cellules NK, lymphocytes CD3+ activés)

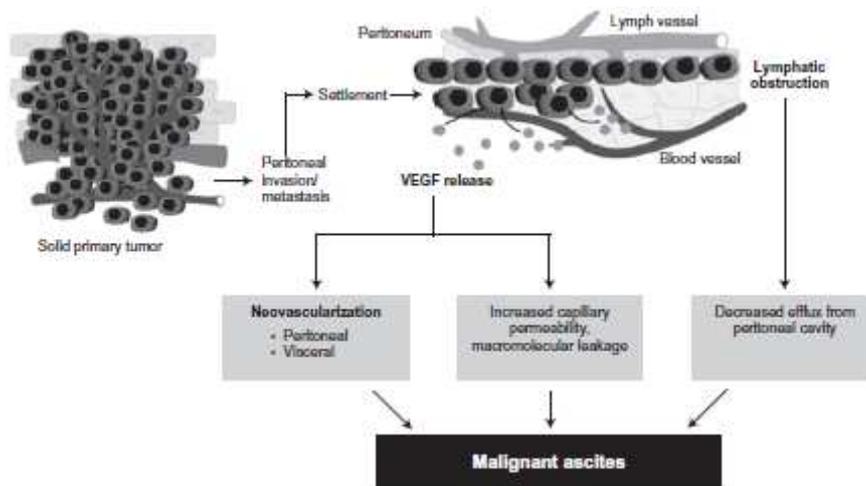
étaient présents dans les ascites néoplasiques (*Wertel et al, 2011*). Cependant, des effecteurs ayant un rôle immunosuppresseur étaient également présents dans les ascites néoplasiques, pouvant correspondre à des systèmes d'échappement tumoral. Parmi ceux-ci, des monocytes (CD14+/CD16+/CD54+/CD80-/CD86-) capables de produire de l'IL10 et ainsi d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et la production d'IFN $\gamma$  ont été décrits (*Loercher AE et al, 1999*) ainsi que des macrophages B7-H4+ (molécule inhibitrice) ayant un effet inhibiteur sur l'activation et la prolifération des lymphocytes T (*Kryczek I et al, 2007*), dont la présence dans le liquide péritonéal était corrélée à une survie diminuée. Un taux élevé des lymphocytes Treg (10-17% des lymphocytes T) chez les patientes ayant une ascite maligne de carcinome ovarien, responsables d'une inhibition de la réponse immunitaire locale par contact cellulaire direct ou par sécrétion de cytokines (TGF $\beta$ , IL-10) (*Curiel TJ et al, 2004*). Les lymphocytes Treg étaient localement recrutés par la chemokine CCL22 produite par les cellules tumorales ovariennes et par les TAMs, et la présence de ces lymphocytes Treg était associée à une survie diminuée.

Toutes ces études confirment que le péritoine est un environnement immunocompétent, capable de recruter des effecteurs immunitaires en réponse à une agression bactérienne, traumatique ou néoplasique. Aussi, des mécanismes d'échappement tumoraux décrits pour les tumeurs solides ont été également décrits dans les ascites néoplasiques et représentent des cibles thérapeutiques potentielles.

Par conséquent, en raison de ses capacités de présentation antigénique et d'activation T, le péritoine est un site privilégié pour une immunothérapie locale. L'autre argument en faveur d'un traitement local IP par immunothérapie, repose sur la distribution isolée ou sous forme de nodules des cellules néoplasiques dans la

cavité péritonéale, en faisant une cible privilégiée. Actuellement, le concept d'immunothérapie intrapéritonéale a été essentiellement développé en utilisant un anticorps monoclonal trifonctionnel : **le catumaxomab**.

Cependant, récemment, l'administration intrapéritonéale d'un autre anticorps monoclonal a été étudiée, il s'agit du **bevacizumab**. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le VEGF, dont un des effets est de diminuer la perfusion tumorale, la formation de néo-vaisseaux et d'optimiser l'action des agents anti-mitotiques (*Jain RK et al, 2001 ; Zondor SD et al, 2004 ; Gerber HP et al, 2004*). Son administration systémique a permis d'augmenter les survies sans progression et globale des patients atteints de cancer colorectal métastatique et ovarien (*Hurwitz H et al, 2004; Cao Y et al, 2009; Burger RA et al, 2007; Cannistra SA et al, 2007; Burger RA et al, 2007*). En raison de la présence de VEGF dans la cavité péritonéale et de son rôle potentiel dans le développement et la progression de la carcinose péritonéale (*Mesiano S et al, 1998*) l'administration IP de bevacizumab a été évaluée chez des patients atteints d'ascite maligne réfractaire d'origine ovarienne (*Kobold S et al, 2009; Hamilton CA et al, 2008*). En effet la sécrétion de VEGF favorise la formation de néo-vaisseaux et augmente la perméabilité des capillaires au niveau des nodules tumoraux et du péritoine, ce qui contribue au passage et à l'accumulation de liquide riche en protéines dans la cavité péritonéale (*figure 20*)



**Figure 20 – Facteurs contribuant à la formation de l’ascite néoplasique (d’après Seimetz et al, 2010).**

Des travaux expérimentaux ont démontré que le traitement par bevacizumab IP était faisable, bien toléré et qu’il permettait de réduire le volume d’ascite et la progression des nodules péritonéaux (Yagi Y et al, 2011 ; Imaizumi T et al, 2010 ; Ninomiya S et al, 2009).

Récemment, un travail expérimental réalisé sur des modèles de carcinose péritonéale d’origine colorectale chez des lapins, a été rapporté par l’équipe de Lyon (Passot G et al, 2012). Après chirurgie de cytoréduction de la carcinose, dix lapins recevaient une perfusion IP de bevacizumab à la dose de 25mg/kg, dilué dans 10 ml de solution saline à 0.9%. Ils étaient comparés à 10 lapins ayant eu une chirurgie identique de cytoréduction, suivie de l’injection de 10 ml de solution saline sans bevacizumab (groupe contrôle). Après une surveillance de 12 jours, l’évolution postopératoire était similaire entre les 2 groupes, notamment le taux de complications postopératoires n’était pas supérieur pour le groupe traité par bevacizumab. Un passage plasmatique du bevacizumab après perfusion IP n’était observé que chez les lapins opérés (et non chez 3 lapins traités uniquement par perfusion IP sans chirurgie), avec un pic plasmatique à 24 heures de la chirurgie.

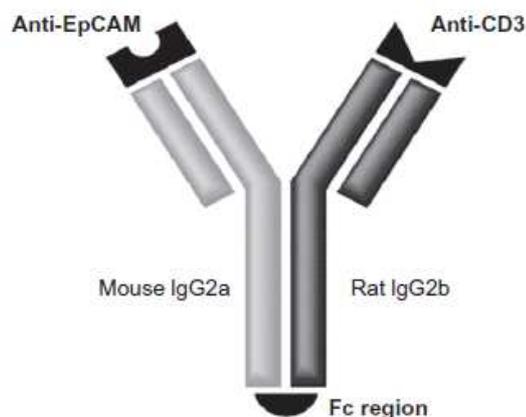
Ainsi, chez des patients atteints de carcinose péritonéale, l'administration IP de bevacizumab permet de diminuer la quantité d'ascite et pourrait avoir un effet anti-tumoral. Enfin, dans un modèle animal, le bevacizumab administré en IP, après chirurgie de cytoréduction d'une carcinose péritonéale, est faisable et pourrait permettre de diminuer le risque de récurrence péritonéale.

#### 1.4 Administration intra-péritonéale de catumaxomab

##### 1.4.1 Catumaxomab : un anticorps tri-fonctionnel, bi-spécifique

Le catumaxomab (Removab®, Fresenius Biotech GmbH, Munich, Allemagne) est un anticorps chimérique non humanisé, constitué d'un fragment Fab (fragment, liaison à l'antigène) murin anti-EpCAM (IgG2a de souris), d'un Fab anti-CD3 (IgG2b de rat) et d'un fragment Fc (fragment cristallisable) intact (*figure 21*). Il est spécifiquement dirigé :

- contre la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM),
- contre l'antigène CD3.



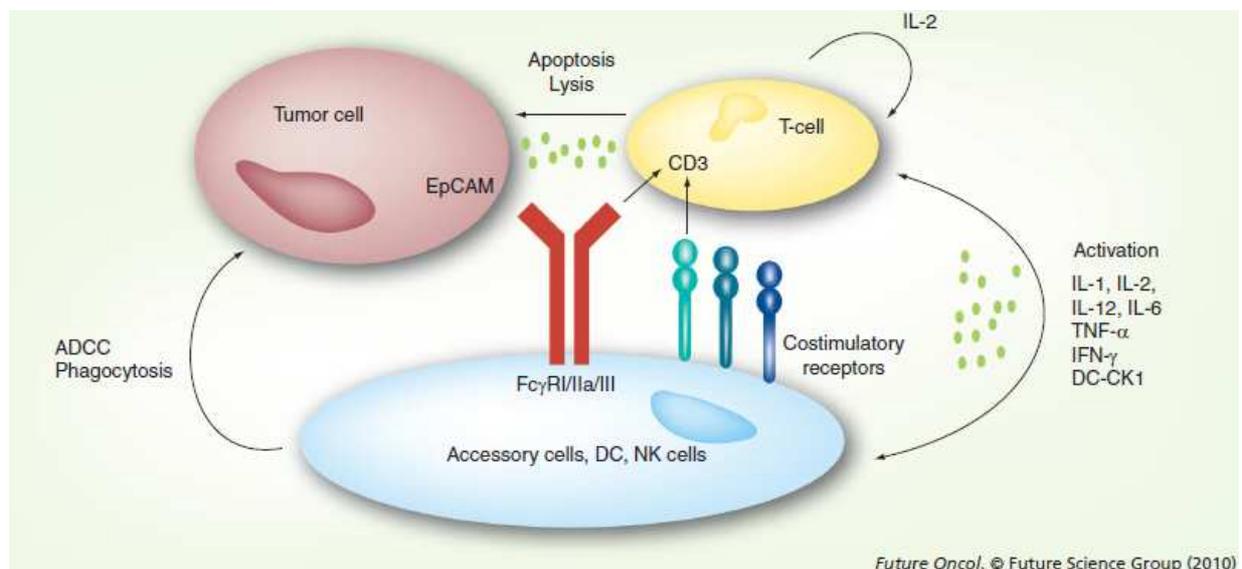
**Figure 21 - Structure du catumaxomab**

*EpCAM = epithelial cell adhesion molecule, Ig = immunoglobulin.*

Par sa région Fc, le catumaxomab est capable de se fixer aux récepteurs Fc- $\gamma$  de types I, II, III exprimés par les cellules accessoires (macrophages, cellules dendritiques) et par les cellules NK.

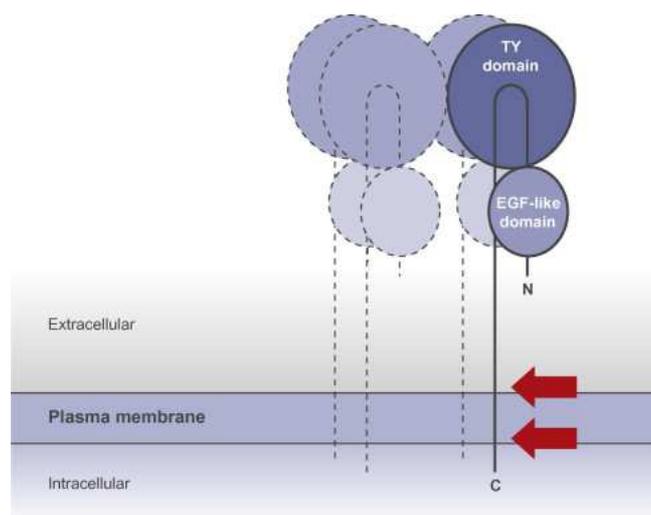
Par conséquent, le catumaxomab est un anticorps trifonctionnel, bispécifique, caractérisé par sa capacité unique à se lier à trois types de cellules: les cellules tumorales exprimant la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EpCAM positif), les lymphocytes T (CD3 positifs) et par son fragment Fc aux cellules accessoires de l'immunité (macrophages, monocytes), aux cellules dendritiques et aux cellules NK exprimant les récepteurs Fc- $\gamma$  de types I, II, III (figure 22) (Zeidler R et al, 1999).

Cette triple fonction a pour but de provoquer la mort cellulaire des cellules EpCAM+ de manière CMH-indépendante.



**Figure 22 - Mode d'action du catumaxomab :** anticorps bi-spécifique, trifonctionnel. Un fragment Fab est spécifiquement dirigé contre l'antigène EpCAM et l'autre Fab contre la molécule CD3 des lymphocytes T ; le fragment Fc se fixe sur le récepteur Fc $\gamma$  des cellules accessoires (d'après Ströhlein et al, 2010)

**L'antigène EpCAM (CD326)** est une glycoprotéine trans-membranaire, qui génère des phénomènes d'adhésion entre les cellules épithéliales (*figure 23*). De récentes études ont rapportés qu'il serait aussi impliqué dans des phénomènes de signalisation, de migration, de prolifération et de différenciation cellulaire. EpCAM est exclusivement exprimé par les cellules et les tumeurs épithéliales. La plupart des adénocarcinomes expriment EpCAM, qu'ils soient d'origine mammaire, prostatique, ovarienne, pulmonaire, colique, gastrique ou rénale. De plus, au sein d'un tissu épithélial, le processus de dysplasie s'accompagne d'une surexpression d'EpCAM. EpCAM n'est pas exprimé dans les tissus mésenchymateux, musculaire, neuroendocrine, par les cellules d'origine lymphoïde, et par les mélanomes. Ces propriétés font de l'antigène EpCAM un outil diagnostique, et dans certains cas pronostique. De plus, EpCAM serait impliqué dans la progression tumorale et le pouvoir métastatique des cellules néoplasiques, ce qui en fait une potentielle cible thérapeutique (*Patriarca C et al, 2012*). Une expression de novo a été décrite au cours du processus de dysplasie.

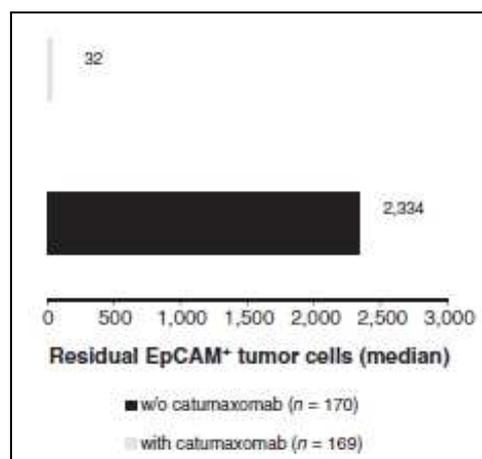


**Figure 23 – Configuration de l'antigène EpCAM au niveau de la membrane cellulaire (d'après Patriarca C et al, 2012).**

L'antigène EpCAM est généralement détecté par immunohistochimie, sur coupes tissulaires, ou au sein de prélèvements biologiques liquides après centrifugation, sur tissue micro-array. Il n'y a pas de consensus quant au seuil minimal nécessaire de cellules EpCAM+ au sein d'un prélèvement permettant d'affirmer le caractère EpCAM+ de la tumeur. Cependant, actuellement, la définition la plus communément utilisée pour définir une ascite néoplasique EpCAM+ est un taux de cellules EpCAM+  $\geq 400$  pour  $10^6$  cellules analysées (soit 0,04%) (Jäger M et al, 2012). Pour certains, la présence, même en faible quantité de l'antigène, suffit à déterminer le statut EpCAM+ (Spizzo G et al, 2011).

#### 1.4.2 Effet cytotoxique du catumaxomab

Au cours d'études expérimentales, réalisées sur des prélèvements d'ascite néoplasique EpCAM+ (n=170), une activité cytotoxique authentifiée par une diminution du taux de cellules EpCAM+ a été obtenue après incubation en milieu contenant du catumaxomab (Jäger M et al, 2012) à la dose de 10 ng/mL pendant 11 jours (figure 24).



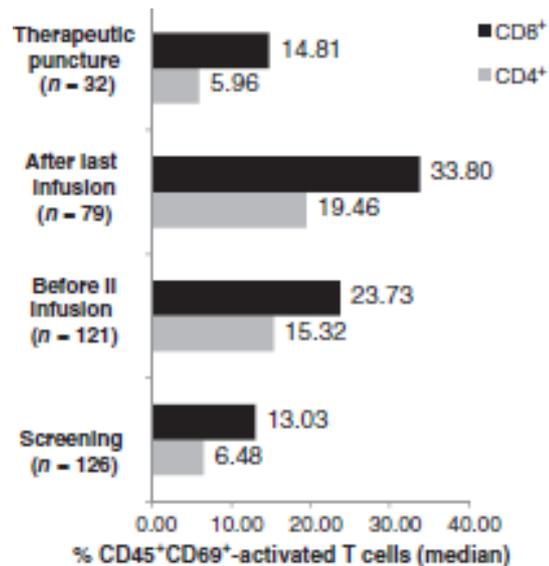
**Figure 24- Activité cytotoxique du catumaxomab sur les cellules tumorales EpCAM+ présentes dans des ascites malignes (d'après Jager M et al, 2012).**

Cette activité cytotoxique était confirmée lors de la caractérisation cellulaire des ascites des patients traités par catumaxomab IP (Jager M et al, 2012) par 4 injections à doses croissantes (Heiss MM et al, 2010). Le nombre médian de cellules EpCAM+ avant traitement était de 6510/10<sup>6</sup> cellules analysées (n=165), il chutait à 27 après la première injection IP (J3) chez 133 patients analysables, puis à 0 après la dernière injection (J11), ce taux ré augmentait à 2090 EpCAM+/10<sup>6</sup> cellules analysées (n=43) lors de la première ponction d'ascite réalisée à visée symptomatique après le traitement par catumaxomab (délai médian de 77 jours). Chez les patients du groupe contrôle (n=85), le taux initial de cellules EpCAM+ était de 9373, puis de 18929 (p=0,0012, en comparaison au groupe traité) sur la ponction évacuatrice suivante réalisée dans un délai de 13 jours (p<0,0001).

### **1.4.3 Induction d'une réponse immunitaire par le catumaxomab**

#### **1.4.3.1 Activation lymphocytaire T**

Après administration IP de catumaxomab, une activation des lymphocytes CD45+/CD4+ et CD45+/CD8+, révélée par la présence du marqueur d'activation CD69, impliqué dans la prolifération lymphocytaire, a été rapportée (Jager M et al, 2012). Le taux médian de CD45+CD4+CD69+ augmentait de 6,5% à 19,5% entre J0 et J11 (n=79) (*figure 25*), puis revenait au taux initial lors de la ponction évacuatrice suivante, réalisée à visée symptomatique dans un délai médian de 77 jours après traitement.



**Figure 25 –Analyse par cytométrie de flux de l’activation in vivo des CD4+ et CD8+ présents dans les ascites malignes chez des patients traitées par catumaxomab IP (d’après Jager M et al, 2012).**

De plus, une augmentation de la concentration de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 et IL-6), dans les surnageants d’ascites néoplasiques incubées avec du catumaxomab pendant 24h, a été observée (Jager M et al, 2012), témoignant d’une activation des lymphocytes T par le catumaxomab.

#### **1.4.3.2 Activation des cellules accessoires de l’immunité**

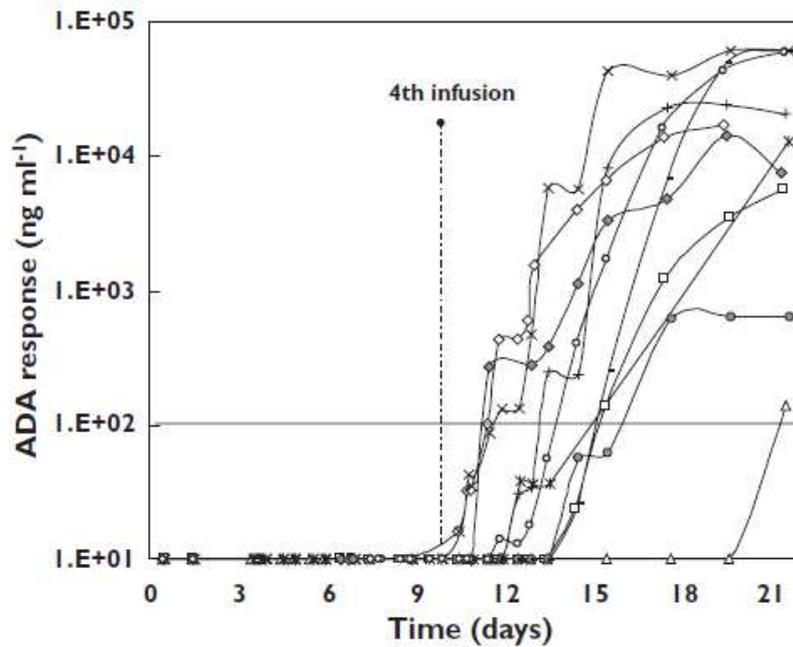
Par la présence de son fragment Fc, le catumaxomab aurait la capacité de déclencher une activation du CD16 des cellules accessoires et des NK. En effet, il a été démontré dans des études in vitro que l’action cytotoxique d’un anticorps bi-spécifique (anti-EpCAM/ anti-CD3), le BiUI1, était augmentée en présence de PBMC, par rapport à une incubation avec des lymphocytes T seuls, suggérant une action cytotoxique exercée par les cellules accessoires (Ziedler R et al, 1999). Par la suite, la même équipe a montré, toujours à partir de cultures cellulaires, que l’anticorps BiUI1 induisait une activation des monocytes CD14+, capables de phagocyter les cellules

tumorales, et une augmentation de la concentration dans le milieu d'enzymes tels que la neopterin et la bioptérine, témoignant d'une activation des monocytes, macrophages et des lymphocytes T (Ziedler R et al, 2000). Une activation des cellules dendritiques (augmentation des taux de CD83+ et CD86+) et des NK (augmentation du taux de CD95+ et de la cytotoxicité) était aussi observée après incubation dans du BiUI1. Ainsi le fragment Fc des anticorps bi-spécifiques est capable d'activer les cellules accessoires, dendritiques et NK, de déclencher une cytotoxicité perforine-dépendante, ADCC-dépendante et l'activation des lymphocytes T. Cependant aucune étude n'a analysé directement l'activation de ces effecteurs par le catumaxomab.

#### **1.4.3.3 Induction d'une réponse immune humorale**

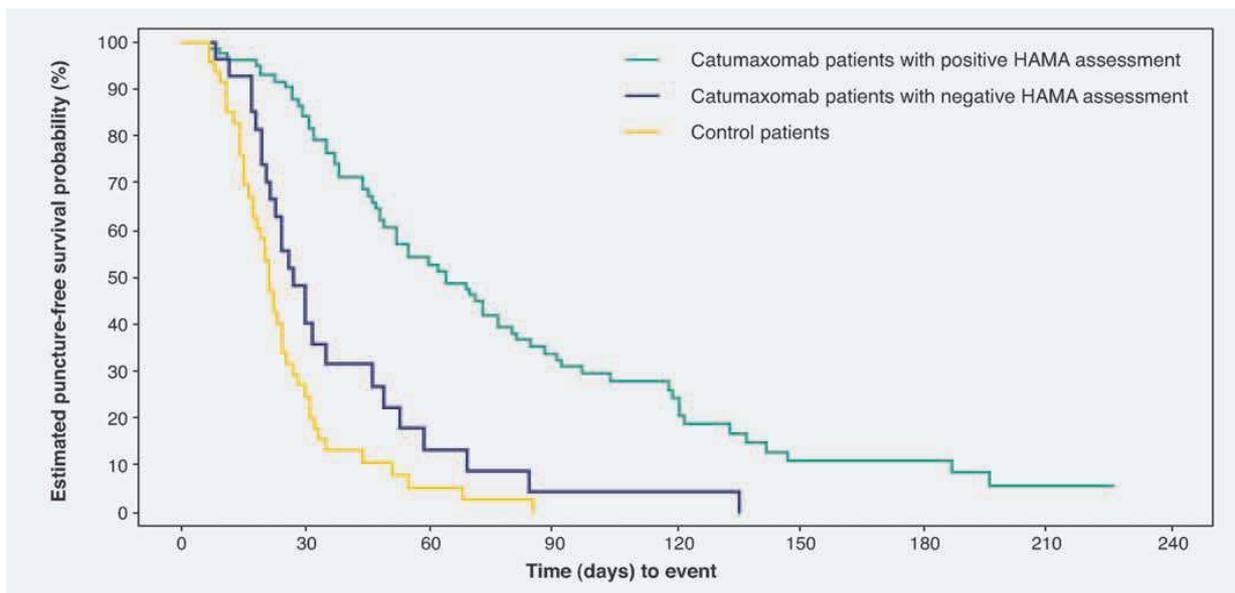
Le catumaxomab étant un anticorps chimérique dérivés de fragments de souris et de rat, une réponse immunitaire de type humorale dirigée contre les fragments murins peut survenir, suite à l'administration du catumaxomab.

Ainsi, Ruf et al, (Ruf et al, 2010) ont montré que des anticorps (human anti-mouse antibodies [HAMAs] and human anti-rat antibodies [HARAs]) étaient détectables après l'administration IP d'une dose totale de 230 µg de catumaxomab (obtenue en 4 injections IP à doses croissantes) ; leur taux augmentaient jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour, ils étaient variables selon les individus (*figure 26*).



**Figure 26 - Concentrations plasmatiques des anticorps anti-souris (ADA) dirigés contre le catumaxomab chez 10 patients (d'après Ruf et al, 2010)**

Une analyse post hoc a été réalisée à partir des résultats des patients traités dans l'essai randomisé de phase II/III, pour déterminer s'il existait une corrélation entre la détection d'anticorps anti-souris humains (HAMA) 8 jours après la 4<sup>ème</sup> perfusion catumaxomab et le résultat clinique (Ott MG et al, 2012). Parmi les patients traités par catumaxomab IP, les patients ayant développés des HAMAs avaient une survie sans ponction d'ascite supérieure, comparativement aux patients n'ayant pas d'HAMAs (figure 27). En outre, la médiane de survie était significativement augmentée chez les patients ayant développés des HAMAs (129 vs 64 jours,  $p = 0,0003$ ; hazard ratio 0,433). Par conséquent, en raison de cette corrélation entre la réponse humorale secondaire à l'administration de catumaxomab et la survie des patients, la présence d'anticorps anti-murins chez les patients traités par catumaxomab pourrait être un biomarqueur de réponse au traitement.

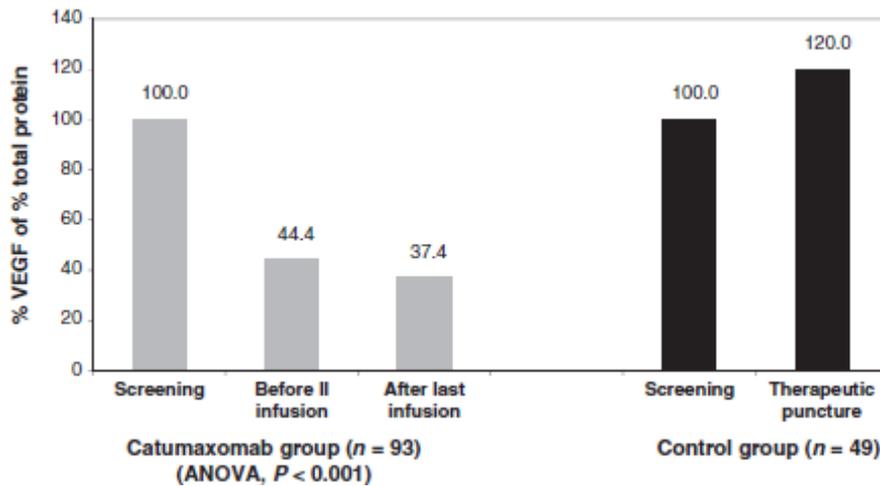


**Figure 27- Survie sans ponction d'ascite pour l'ensemble de la population.** La survie des patients traités par catumaxomab et ayant développé des anticorps anti-souris était supérieure à celle des patients sans anticorps (d'après Ott et al, 2012).

#### 1.4.4 Effet anti-angiogénique potentiel du catumaxomab

Outre le caractère pro-angiogénique du VEGF, il a été démontré qu'il participait à la formation et à l'accumulation de liquide dans la cavité péritonéale en cas de carcinose. Le contrôle de l'ascite néoplasique observé après injection IP de catumaxomab pourrait être, en partie due à une diminution de la sécrétion du VEGF par les cellules néoplasiques EpCAM+.

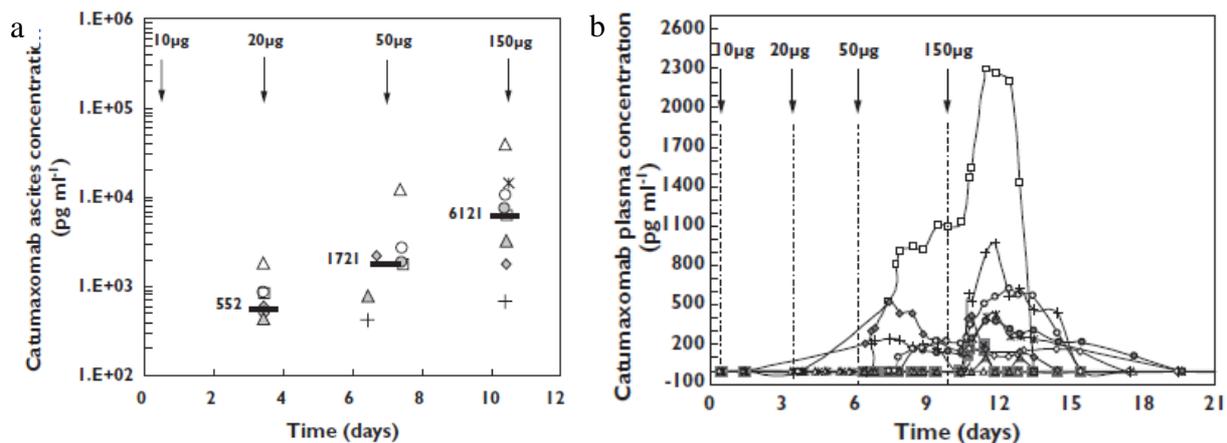
L'analyse du taux de VEGF en fonction de la concentration protidique du liquide d'ascite, a montré une diminution significative du taux de VEGF chez les patients traités par catumaxomab (n=93) ( $p < 0,001$ ), alors que ce taux restait stable chez les patients non traités (n=49) (Figure 28) (Jager M et al, 2012).



**Figure 28 – Analyses des taux de VEGF dans le liquide d’ascites, avant et après traitement par catumaxomab, et chez un groupe contrôle non traité (d’après Jager M et al, 2012).**

#### 1.4.5 Résultats pharmacocinétiques

Une analyse pharmacocinétique a été réalisée chez 13 patients atteints de d’ascites malignes traités par injection IP de catumaxomab à doses croissantes de 10, 20, 50, et 150  $\mu\text{g}$  respectivement à J0, 3, 6 ou 7 et 10 (Ruf et al, 2010). La concentration IP du catumaxomab augmentait progressivement jusqu’à 1ng/mL (figure 29a), sauf chez un patient. A J10, elle variait de 0 à 39912 pg/mL, avec une médiane de 6121 après la 4<sup>ème</sup> injection. En revanche, les concentrations plasmatiques de catumaxomab restaient à taux faibles (figure 29b), avec une concentration maximale (Cmax) moyenne de 403 pg/mL, variant de 0 à 2290 pg/mL. Le pic plasmatique survenait après la 4<sup>ème</sup> injection, et la demi-vie plasmatique moyenne était de 2,13 jours. Il existait une grande variabilité inter-individuelle, tant pour les concentrations IP que plasmatiques.



**Figure 29 – Analyse pharmacocinétique** après injection intrapéritonéale de catumaxomab chez 10 patients.

(a) concentrations IP individuelles (symboles) et médianes (-) de catumaxomab. Les flèches correspondent aux injections de catumaxomab. Les ascites étaient prélevées immédiatement avant la 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> administration IP. (b) concentrations plasmatiques de catumaxomab. Le catumaxomab était décelable dans la circulation sanguine, uniquement après la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> injection IP (d'après Ruf et al, 2010).

#### 1.4.6 Résultats des études cliniques – Une autorisation de mise sur le marché européen

Plusieurs études cliniques de phase I, de phase II et enfin de phase II/III visant à évaluer l'administration IP de catumaxomab, ont été réalisées chez des patients ayant une carcinose péritonéale, de différentes origines tumorales. Les résultats de ces études sont rapportés dans le tableau 2. Ces études ont permis d'analyser la pharmacocinétique du catumaxomab IP, de démontrer la faisabilité et la bonne tolérance de l'administration IP, et d'évaluer l'action cytotoxique sur les cellules tumorales présentes dans le liquide péritonéal. La plupart des études étaient réalisées chez des patients atteints d'ascites néoplasiques symptomatiques ; seules trois études (Phase I et Phase II randomisé) évaluaient l'injection IP du catumaxomab après la résection d'une carcinose péritonéale.

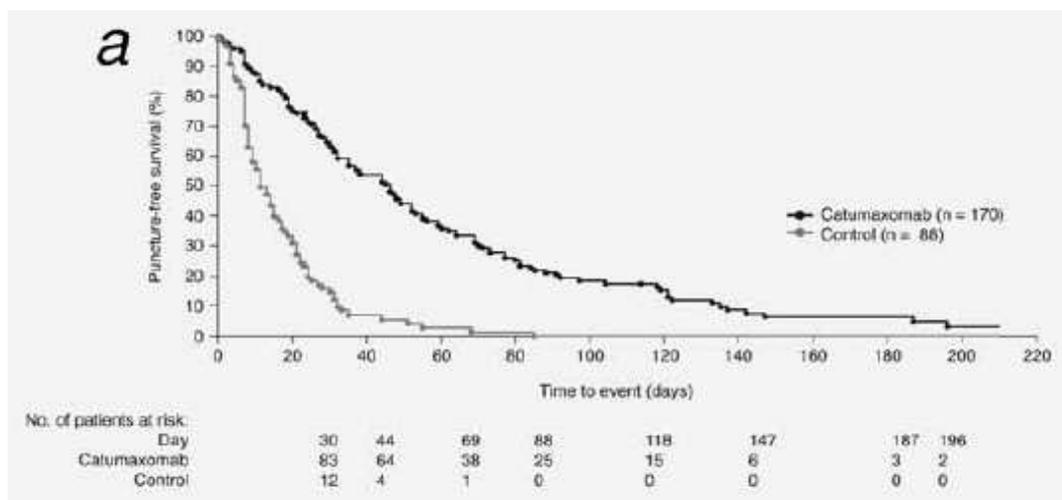
Tumor disease	Trial design	Results (end points)
<b>Malignant ascites</b>		
Malignant ascites	Pilot trial	Intraperitoneal catumaxomab is feasible; catumaxomab completely eliminates tumor cells in malignant ascites; catumaxomab diminishes ascites accumulation
Malignant ascites Ovarian cancer	Phase I/II	Definition of MTD, safety and tolerability in patients with malignant ascites; confirmation of efficacy
Malignant ascites Ovarian and non-ovarian cancer	Phase II/III Randomized	Significant prolongation of puncture-free survival Survival benefit in gastric cancer patients
<b>Solid peritoneal carcinomatosis</b>		
Solid peritoneal carcinomatosis Gastric, pancreatic and colon cancer	Phase I/II	Definition of MTD, safety and tolerability in PC patients
<b>Intraoperative treatment</b>		
Intraoperative treatment Advanced GI tract cancer at high risk for PC	Phase I	Feasibility and safety of intraoperative treatment Definition of MTD
Advanced gastric cancer	Phase II randomized	Feasibility and safety of intraoperative treatment Comparison to standard gastrectomy
Advanced gastric cancer	Phase I	Feasibility and safety of intraoperative treatment after neoadjuvant chemotherapy

MTD: Maximam-tolerated dose; PC: Peritoneal carcinomatosis.

**Tableau 2 – Résultats des principales études cliniques réalisée chez patients ayant une carcinose péritonéale (d'après Ströhlein et al, 2010)**

Une étude randomisée de phase II/III a été réalisée chez des patients ayant une ascite néoplasique symptomatique secondaire à des carcinomes EpCAM+, afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'administration IP du catumaxomab (Heiss M et al 2010). Les patients étaient randomisés entre 2 bras de traitement : paracentèse seule, ou paracentèse associée à l'administarion IP de catumaxomab. L'efficacité du traitement par catumaxomab était évaluée sur la durée de survie sans ponction (critère principal de jugement). Deux cent cinquante-huit patients, dont 66 avaient une carcinose d'origine gastrique, ont été inclus dans l'étude. Le catumaxomab a été administré en quatre perfusions IP, chacune précédée d'une ponction d'ascite au jour 0 (J0), J3, J7 et J10, ce qui a nécessité une durée totale d'hospitalisation de 11 jours. La survie sans ponction d'ascite était significativement plus longue dans le groupe traité par catumaxomab comparée à celle du groupe témoin (46 vs 11 jours,  $p < 0,0001$ ) (figure 30).

La médiane de survie globale était similaire entre les deux groupes: 72 jours dans le groupe catumaxomab versus 68 jours dans le groupe témoin. Les événements indésirables les plus fréquents étaient liés à la libération de cytokines (fièvre, nausées, vomissements, tachycardie et hypotension). Ces réactions étaient d'intensité légère ou modérée (grade 1 ou 2) et transitoires, limitées à la durée du traitement par catumaxomab, témoignant d'un profil de tolérance acceptable. Les autres effets secondaires liés au traitement étaient hématologiques (lymphopénie, anémie) et non hématologiques (douleur abdominale, fatigue, anorexie, augmentation de la protéine C réactive (CRP), des gamma-glutamyl-transférase, des phosphatases alcalines, ASAT et ALAT).



**Figure 30 – Courbes de durée de vie** (estimée selon la méthode de Kaplan-Meier) sans ponction évacuatrice d'ascite. La survie sans ponction d'ascite était significativement plus longue dans le groupe traité par catumaxomab comparée à celle du groupe témoin (46 vs 11 jours,  $p < 0,0001$ ), (d'après Heiss M et al, 2010).

Cette étude a permis de confirmer la faisabilité et l'efficacité de l'administration IP de catumaxomab sur la réduction du volume de l'ascite. Ainsi, une autorisation de mise sur le marché a été accordée en Avril 2009 par l'Union européenne pour

l'utilisation de la perfusion IP de catumaxomab intrapéritonéale chez les patients présentant une ascite EpCAM+ réfractaire au traitement standard. En outre, cette étude a démontré que la qualité de vie, évaluée par le questionnaire EORTC QLQ-C30, était plus longuement conservée chez les patients traités par catumaxomab, par rapport aux patients du groupe contrôle (médiane de 19 à 26 jours contre 47 à 49 jours). Le délai pour constater une détérioration de la qualité de vie était significativement allongé chez les patients traités par catumaxomab ( $p < 0,01$ ) (Wimberger P et al, 2012).

Une autre étude randomisée de phase II (IP-REM-GC-02) portant sur l'administration IP de catumaxomab a été rapporté au congrès de l'ASCO en 2008 (Krüger MD et al, 2008) Parmi 55 patients opérés d'un adénocarcinome gastrique (T2b/T3/T4, N  $\pm$ , M0) à visée curative, 28 ont reçu une perfusion IP de catumaxomab en postopératoire immédiat, et ont été comparés à 27 patients ayant eu la résection de l'adénocarcinome gastrique seule. Toutes les tumeurs étaient EpCAM+. Le catumaxomab était administré durant l'intervention (10  $\mu$ g), après la résection, puis 4 fois (J7, 10, 13 et 16) à des doses croissantes (10, 20, 50, 150  $\mu$ g).

Soixante-dix-huit pourcents (22/28) des patients traités par catumaxomab ont reçu les 5 perfusions. Des événements indésirables liés au traitement sont survenus chez 40% des patients, de grade 3 chez 22 (versus 10 patients du groupe témoin). Les effets secondaires les plus fréquents étaient une anémie, de la fièvre, un syndrome inflammatoire et des douleurs abdominales. Des complications chirurgicales survenaient chez 16 patients, sans différence significative entre les 2 groupes (tableau 3). Tous les effets indésirables étaient résolus à la fin du traitement, hormis chez un patient atteint d'une néphropathie, résolutive avec séquelles mineures.

Complication	Surgery alone n (%)	Surgery + catumaxomab n (%)
Anastomosis insufficiency	2 (7,4)	1 (3,7)
Wound healing disorders	2 (7,4)	3 (10,7)
Infections	3 (11,1)	4 (14,3)
Abdominal abscess	1 (3,7)	0

**Tableau 3 – Description des complications chirurgicales** survenues chez les patients opérés d'adénocarcinome gastrique, avec ou sans administration IP de catumaxomab (d'après Krüger MD et al, 2008).

Les résultats de cette étude conduisent à conclure que l'administration IP de catumaxomab en situation adjuvante était faisable, sûre et bien tolérée. Cependant, le nombre de patients traités était faible, ces résultats sont donc à confirmer sur un plus grand nombre de sujets.

**En conclusion, une immunothérapie intra-péritonéale à base de catumaxomab chez des patients ayant une ascite néoplasique, ou après résection d'un adénocarcinome gastrique, est faisable, bien tolérée et permet de diminuer le volume d'ascite et d'améliorer la symptomatologie. Toutefois, aucune étude sur la faisabilité et le potentiel bénéfique d'une immunothérapie postopératoire immédiate après chirurgie de cytoréduction d'une carcinose péritonéale n'a jamais été rapportée.**

### **1.5 Contexte et objectifs de l'étude**

Grâce à une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le développement tumoral, au sein de la cellule néoplasique, et des interactions entre la

tumeur et le système immunitaire, de nouvelles voies thérapeutiques ont été développées. Les principes de ces traitements reposent essentiellement sur une restauration ou une induction d'une cytotoxicité dirigée contre les cellules néoplasiques et sur l'inhibition des acteurs ayant un rôle immunosuppressif, permissif. Ont ainsi été développés des anticorps bi-spécifiques capables de reconnaître 2 épitopes par l'intermédiaire de leurs 2 chaînes variables, l'une dirigée contre la cellule tumorale et l'autre contre le CD3 des lymphocytes T afin d'activer une cytotoxicité T-dépendante contre les cellules tumorales (*Staerz UD et al, 1985*). D'autres anticorps bi-spécifiques capables d'engager d'autres effecteurs immuns cytotoxiques, ou de cibler des antigènes présents à la surface des cellules tumorales tels que Her2/neu or EGFR ont été développés.

Le catumaxomab est un anticorps chimérique bi-spécifique, comportant 2 chaînes variables, lui conférant une action ciblée sur l'antigène EpCAM et sur le CD3 des lymphocytes T, ainsi qu'un fragment Fc, permettant d'activer les cellules accessoires de l'immunité.

L'administration du catumaxomab a été essentiellement étudiée en système clos : dans le péritoine, dans la plèvre. En effet, le caractère « fermé », la présence d'effecteurs immuns et sa capacité à recruter de nombreux effecteurs immunitaires de la circulation sanguine, font du péritoine un site privilégié pour une immunothérapie locale. L'autre argument en faveur d'un traitement local IP par immunothérapie, repose sur la distribution isolée ou sous forme de nodules des cellules néoplasiques dans la cavité péritonéale, en faisant une cible privilégiée.

Dans l'unité INSERM U1015 du Pr Zitvogel, de nombreux travaux ont permis d'analyser les interactions entre les effecteurs immunitaires présents dans le micro-environnement tumoral et les cellules tumorales. Des mécanismes de défense de

l'hôte, notamment l'implication des cellules dendritiques, des cellules NK, ont été étudiés. De plus, des modes d'action synergiques entre les traitements cytotoxiques conventionnels et le système immunitaire, tel que la mort cellulaire immunogène induite par les anthracyclines, l'oxaliplatine, la radiothérapie, ont été largement étudiés. Par ailleurs, depuis 20 ans, le traitement chirurgical de la carcinose péritonéale, associé à des traitements intra-péritonéaux, a été l'objet de nombreux travaux de recherche clinique au sein du département de chirurgie oncologique du Pr Elias de l'Institut Gustave Roussy (IGR). Ainsi, une étude de phase II randomisée, coordonnée par l'IGR, évaluant la tolérance, la faisabilité et l'efficacité de l'administration du catumaxomab IP après résection d'une carcinose gastrique vient de débiter. Ces éléments nous ont conduits à réaliser ce travail afin d'analyser les mécanismes d'action du catumaxomab.

L'objectif de cette étude était de déterminer les effets immunomodulateurs du catumaxomab sur des cellules néoplasiques exprimant EpCAM+, à partir de deux modèles expérimentaux (allogénique et autologue), de rechercher une cytotoxicité induite par la catumaxomab, et de la caractériser, notamment en analysant la présence ou non de signaux de stress inducteurs d'une mort immunogène.

## 2 Travail expérimental

### 2.1 Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Modèle allogénique et Modèle autologue

Modèle allogénique - Des cellules tumorales issues de lignées cellulaires EpCAM+ : (SKBR3, ATCC HTB-30, carcinome mammaire, caractérisé par une forte expression d'EpCAM) et EpCAM- (MDA-MB-435S, M14 melanoma cell line) étaient mises en culture dans du milieu RPMI (RPMI 1640 contenant 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml pénicilline, and 100 µg/ml streptomycine), selon 4 conditions différentes :

- milieu seul
- avec du catumaxomab à la dose de 10ng/ml
- avec des PBMC de volontaires sains (n=5)
- avec du catumaxomab et des PBMC à différents ratio 1/1, 1/ 2.

Ces différentes conditions de culture étaient reproduites après pré-traitement pendant 2 heures avec de l'oxaliplatine (300µMOL).

Les PBMCs étaient isolés de prélèvements sanguins héparinés issus de donneurs sains, par une technique de gradient de densité (LSM 1077, PAA, Austria).

Modèle autologue - Les cellules présentes dans les ascites fraîchement prélevées étaient récupérées après centrifugation ; au préalable, il était réalisé une lyse des globules rouges à l'aide d'une solution de lyse de chlorure d'ammonium (BD Biosciences). Les surnageants étaient conservés et congelés à -80°C pour analyse des cytokines présentes dans le milieu.

### 2.1.2 Activation lymphocytaire et cellulaire

Dans un premier temps, le statut EpCAM de l'ascite était déterminé par FACS ; il était réalisé un marquage immunofluorescent anti-CD45-A750 (Beckman Coulter), anti-Epcam-PE (CD326, Becton Dickinson) et Vivid Yellow (Molecular Probe) pour analyser la viabilité cellulaire. Une ascite était définie EpCAM+ lorsqu'il était détecté en FACS, la présence de cellules vivantes CD45-, marquées par l'Ac EpCAM, sans seuil minimal de détection.

Les cellules étaient mises en culture ( $10^5$  cell/puits) en milieu RPMI (RPMI 1640 contenant 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicilline, and 100 µg/ml streptomycine), en présence de catumaxomab, ou non, à la dose de 10ng/ml, puis incubées à 37°C en atmosphère saturée à 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 18h. Les cellules étaient récupérées et marquées par des différents anticorps couplés à des fluorochromes (fluorescein isothiocyanate-(FITC)-, phycoerythrin (PE)-, phycoerythrin cyanin 7 (PE-Cya7)-, Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)-, Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5)-, allophycocyanin Alexa750 (APC A750)-, allophycocyanin -conjugated antibodies). Les anticorps utilisés pour caractériser les cellules immunitaires et rechercher des marqueurs d'activation étaient : anti-human CD45 (Beckman Coulter), CD3 (Miltenyi Biotec), CD4 (Becton Dickinson), CD8 (Beckman Coulter), CD56 (Beckman Coulter), FoxP3 (eBioscience), CD45RA (eBioscience), CD14 (Biolegend), CD16 (Beckman Coulter), CD80 (Biolegend), CD39 (eBioscience), CD40(Becton Dickinson), CD19 (Becton Dickinson), CD25 (Beckman Coulter), CD15 (Biolegend), CD73(eBioscience), CD69 (Becton Dickinson), HLA-DR (Beckman Coulter), CD253 (TRAIL, eBioscience), CD279 (PD-1, eBioscience), CD336 (NKp44, Miltenyi Biotec), TCR VD2 (Beckman

Coulter), TCR VG/D PAN (Beckman Coulter), CD123 (Becton Dickinson), Vivid Yellow (Molecular Probe).

Les marquages étaient détectés par FACS Cyan (Beckman Coulter), cytomètre à 9 canaux. Les résultats obtenus par FACS étaient analysés à l'aide du programme FlowJo software (TreeStar Inc, Ashland, OR).

Un marquage intra-cellulaire CD107a-PE (Becton Dickinson) était réalisé après ajout au milieu de culture d'un inhibiteur de transport protéique (BD Golgi-stop, Becton Dickinson) pendant 2h à 37°C. Puis, le marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$ -APC (Miltenyi) et de l'IL17A-FITC (Biolegend) étaient réalisés après fixation par BD CytoFIX CytoPerm Kit (Becton Dickinson).

### **2.1.3 Profil cytokinique**

Les cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-12p40, IL-5, étaient quantifiées dans les surnageants issus des ascites fraîches et après incubation des cellules de l'ascite selon les différentes conditions définies au-dessus. Les surnageants étaient conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les concentrations des différentes cytokines étaient déterminées par cytometric bead array (FlowCytomix; eBioscience), selon les instructions du fabricant.

L'analyse était réalisée par FACS Cyan (Beckman Coulter) et les résultats obtenus par FACS étaient analysés à l'aide du programme FlowCytomix (eBioscience).

### **2.1.4 Viabilité cellulaire et marqueurs de mort immunogène**

La viabilité cellulaire et l'apoptose étaient analysées au FACS après triple marquage membranaire par CD45-Alexa A750 (Beckman Coulter), 7AAD (Becton Dickinson)

pour déterminer la viabilité, et l'Annexin V-APC (Becton Dickinson) pour analyse de l'apoptose.

Les marqueurs de mort immunogène étaient recherchés par marquage membranaire de la CRT à l'aide d'un anticorps anti- CRT de lapin (1:100, Abcam), reconnu par une IgG (H+L) Alexa fluor 488-conjugates (Becton Dickinson) (1:100). Avant l'analyse au FACS, les cellules étaient incubées avec du 7AAD et de l'Annexin V-APC. L'analyse était faite par FACS Cyan (Beckman Coulter). L'HMGB1 et l'ATP étaient dosés dans les surnageants en utilisant un kit ELISA (IBL International GMBH), et un kit pour l'ATP (ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence de PROMEGA).

### **2.1.5 Culture 3D d'adénocarcinome gastrique**

Dans le cadre du stage de seconde année d'un étudiant en Magistère de Biotechnologies, Julien Pesquet, une analyse sur des cultures tissulaires d'adénocarcinome gastrique a été réalisée. Des fragments d'adénocarcinome gastrique étaient mis en culture selon une technique de culture 3D. Ce procédé consiste à mettre en culture des fragments tumoraux coupés en cubes de 5mm<sup>3</sup> sur une matrice de Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (PolyHema (sigma), réf:P3932-106) permettant de reproduire un environnement en trois dimensions, en conservant les éléments du stroma cellulaire, sans aucune dissociation cellulaire de la tumeur. Les fragments étaient découpés au sein de tumeur gastrique, immédiatement après résection. Ils étaient mis en culture pendant 2 heures, en milieu seul, ou en présence d'oxaliplatine à une concentration de 300µMOL.

Après lavages dans du tampon PBS, les fragments étaient mis en culture 3D selon 4 conditions différentes :

- Milieu seul (contrôle)

- Avec du catumaxomab (10 ng/ml)
- Avec PBMCs autologues
- Avec du catumaxomab et PBMCs autologues.

Après une durée d'incubation de 18h, les fragments étaient récupérés et fixés et inclus en paraffine. Les blocs de paraffine étaient coupés en tranches de 3µm d'épaisseur. Les marquages immunohistochimiques dirigés contre EpCAM, CD3, TIA-1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein), FoxP3, CRT et KI67 étaient réalisés. TIA-1 est un marqueur cytoplasmique et granulaire spécifique des granules cytotoxiques, présentes dans les NK et les CTLs.

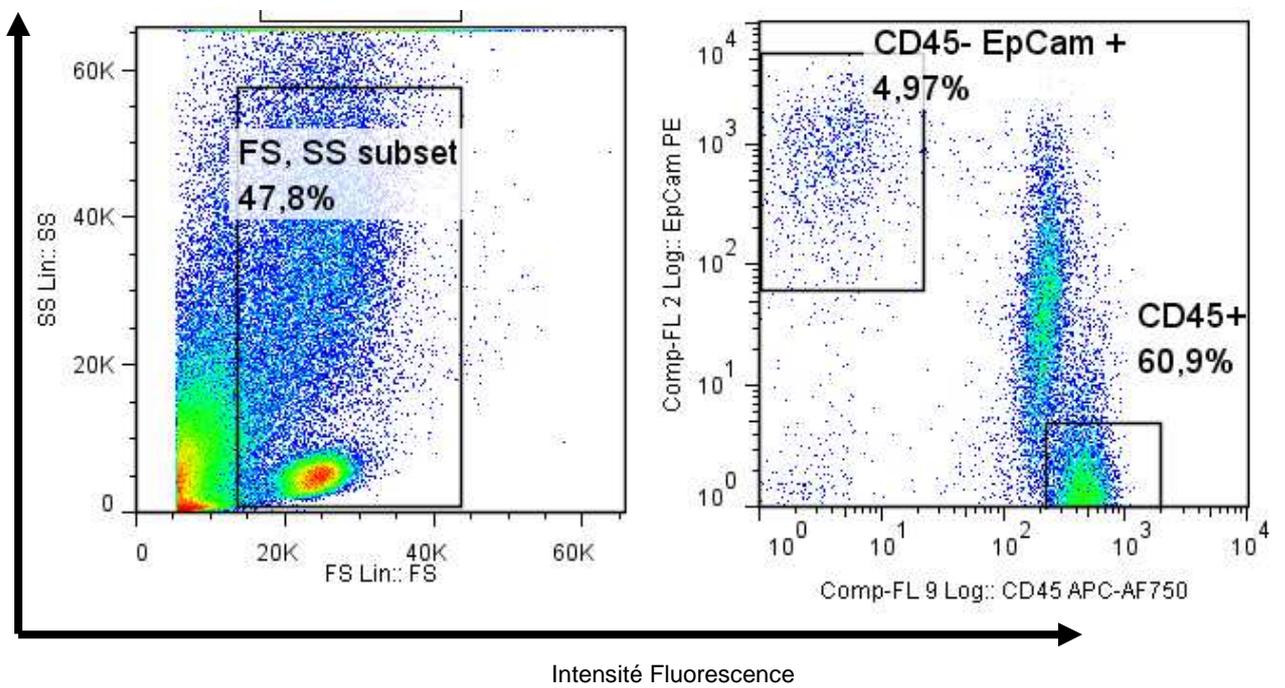
## **2.2 Résultats**

### **2.2.1 Modèle autologue**

Des échantillons de liquide d'ascite prélevés chez 12 patients, atteints de carcinose péritonéale de différentes origines tumorales EpCAM +/- (*tableau 4*) ont été fraîchement incubés avec du catumaxomab pendant 18 heures. Les cellules néoplasiques de l'ascite exprimaient le marqueur EpCAM chez 10 patients, les 2 autres patients étaient considérés comme les témoins négatifs. La carcinose était d'origine ovarienne dans 8 cas, colique dans 3 cas (dont 2 étaient EpCAM-) et mammaire dans 1 cas.

Le pourcentage de cellules EpCAM+ dans l'ascite variait de 0.06% à 24.4%. Le pourcentage de cellules CD45+ dans les ascites variait de 2,25% à 97%, avec une médiane égale à 73%. Le ratio de cellules effectrices (CD45+) sur les cellules EpCAM+ variait de 2 à 1497, avec une médiane de 50,5.

La *figure 31* représente l'analyse par cytométrie en flux d'une ascite fraîchement prélevée.



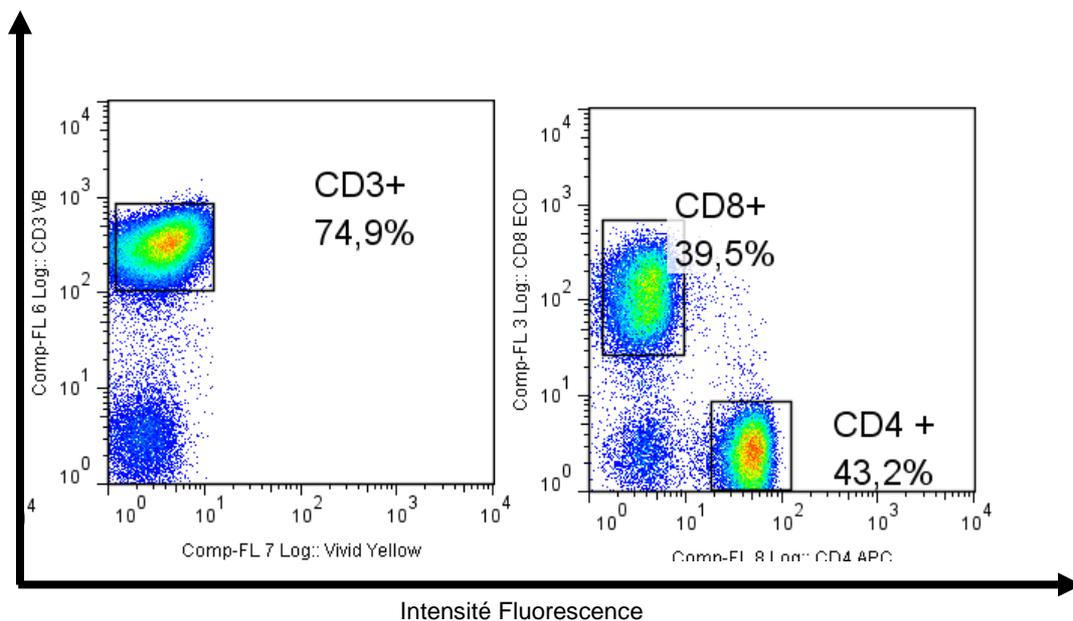
**Figure 31 – Pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD45 (leucocytes) et de cellules exprimant EpCAM, au sein d'une ascite néoplasique fraîchement prélevée.**

**Tableau 4 – Caractéristiques des patients ayant une ascite néoplasique**

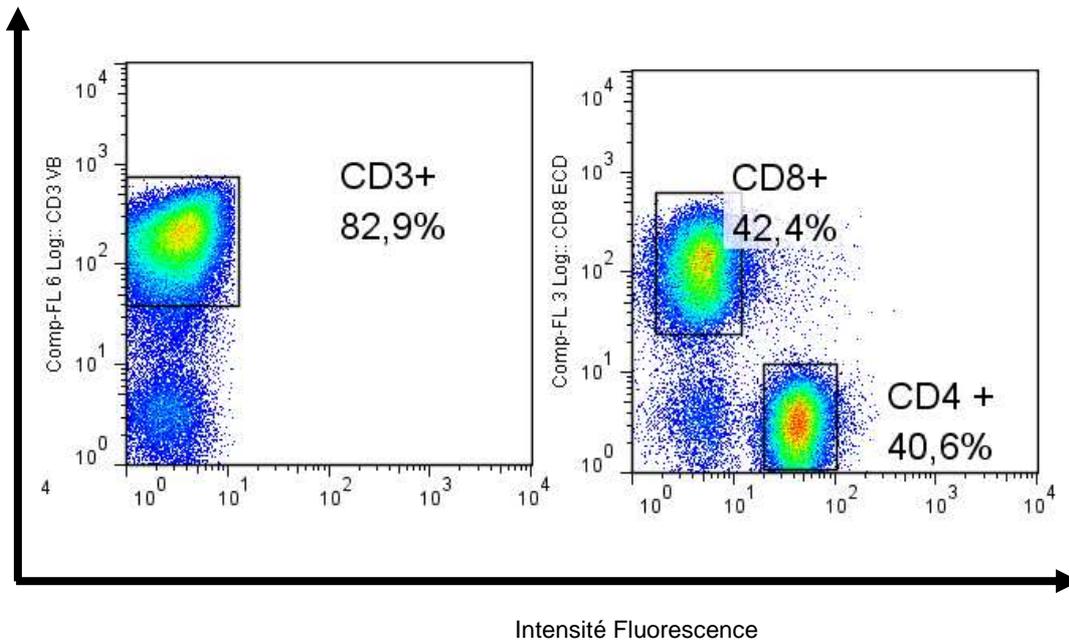
Patients	Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	Pt 6	Pt 7	Pt 8	Pt 9	Pt 10	Pt 11	Pt 12
<b>EpCAM status (Pos/Neg)</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>% EpCAM+cells/ ascites cells</b>	<b>8</b>	<b>0.5</b>	<b>1.6</b>	<b>0.12</b>	<b>0.07</b>	<b>1.8</b>	<b>0.06</b>	<b>24.4</b>	<b>0.55</b>	<b>11.1</b>	-	-
Age (y)	64	64	39	69	58	71	65	49	51	61	62	62
Gender (M/F)	F	F	F	F	F	F	F	M	F	F	M	M
Primary tumour	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Colon	Breast	Ovary	Colon	Colon
Stage	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IV	IIIb	IIIb	IV	IV
Ascites Presentation (synchronous/metachronous)	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Metach	Synch	Metach	Synch
Chemotherapy naive (Y/N)	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Type of systemic chemotherapy	-	Carboplatin Paclitaxel	-	Carboplatin Paclitaxel	-	-	-	-	Caelyx Zometa	-	Oxaliplatin, 5FU Bevacizumab	Oxaliplatin 5FU
Objective Response to chemotherapy (Yes/no)	-	Yes	-	Yes	-	-	-	-	No	-	No	No
Time to last chemo (days)	-	30	-	22	-	-	-	-	24	-	17	52
% CD45+ in ascites	17.6	10.3	76.9	55.7	37.3	95.4	84.1	64.9	2.25	97.4	14.7	73
CD45+cells/ EpCAM+ cells	2	16	48	464	497	53	1402	3	4	974	-	-
% dead cells in ascites	20.7	5	52.1	6	10.9	61	2.9	1	2.6	23.1	20.7	19

### 2.2.1.1 Activation des lymphocytes T par le catumaxomab

Les pourcentages de CD3+/CD4+ et CD3+/CD8+ au sein de la fraction CD45+ des cellules d'ascite (*figure 32 et figure 33*) étaient stables, avec un taux moyen de lymphocytes T CD4 + égal à  $35,8 \pm 25\%$  après incubation dans du catumaxomab et égal à  $40,3 \pm 19\%$  sans catumaxomab (*figure 34A*). Le taux moyen de lymphocytes T CD8+ était de  $20,5 \pm 11\%$  avec catumaxomab et de  $19,9 \pm 11$  sans catumaxomab (*figure 35A*), dans les ascites malignes EpCAM+.



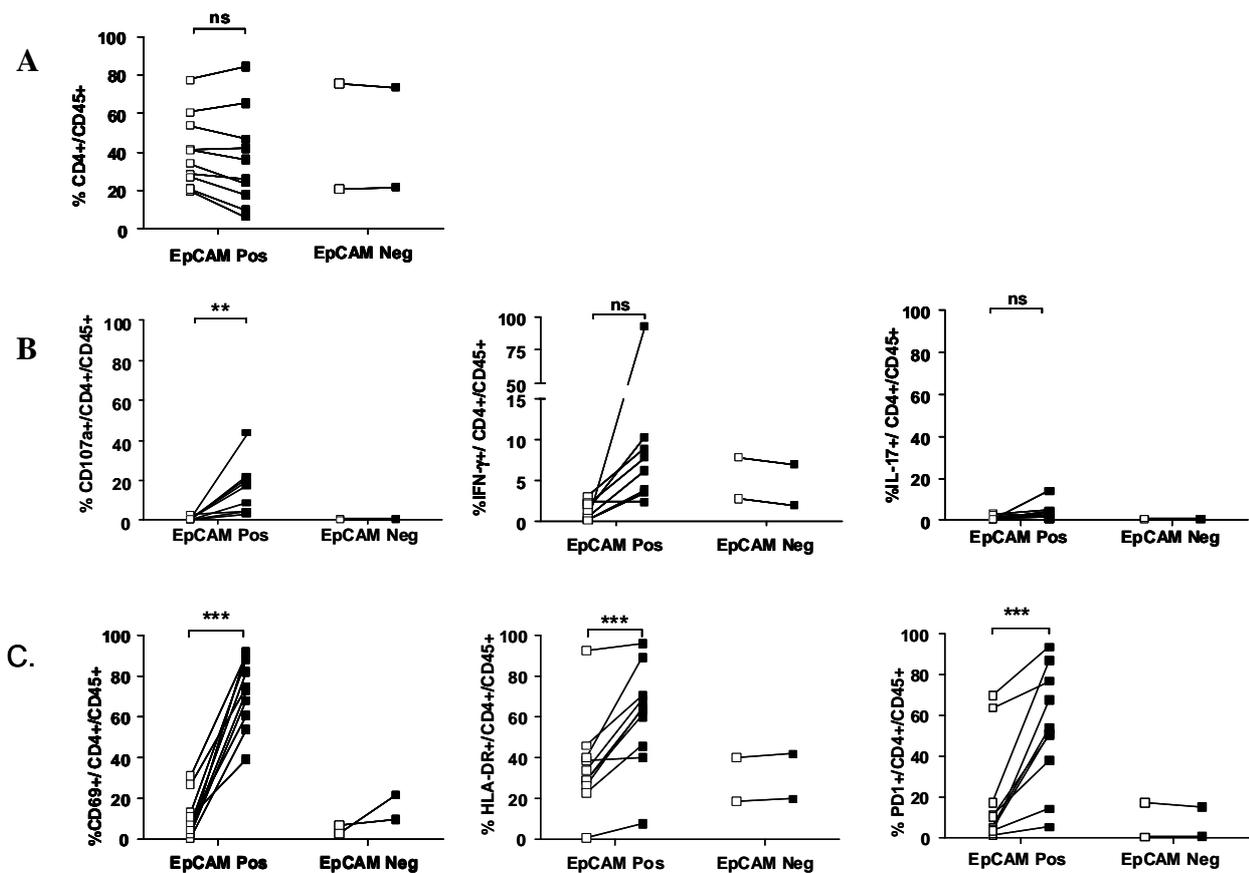
**Figure 32** – Pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD3 (lymphocytes T), et au sein de cette population, la proportion de lymphocytes CD4+ et de CD8+, après culture de cellules issues d'ascite néoplasique EpCAM+, pendant 18h dans un milieu contenant du catumaxomab (10 ng/ml).



**Figure 33-** Pourcentage de cellules exprimant CD3 (lymphocytes T), et au sein de cette population, la proportion de lymphocytes CD4+ et de CD8+, après culture de cellules issues d'ascite néoplasique EpCAM+, pendant 18h dans du milieu seul.

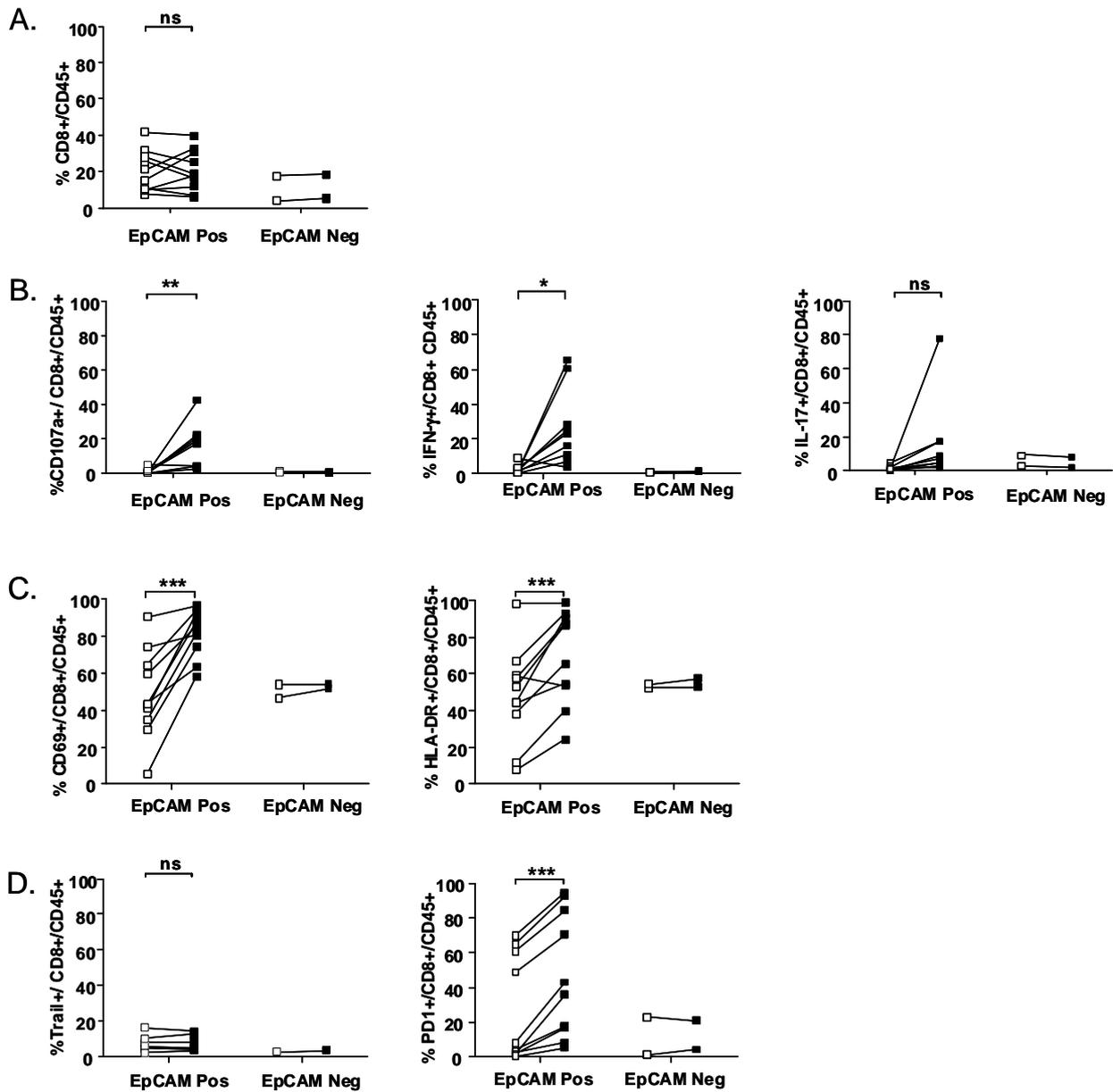
Les deux sous populations de lymphocytes T, CD4+ et CD8+, étaient capables de libérer des granules cytotoxiques – ils exprimaient le CD107a – en présence de catumaxomab, et ceci uniquement dans les ascites EpCAM+ (figure 34B, figure 35B). En présence de catumaxomab, les CD4+ et les CD8+ issus des ascites EpCAM+ sécrétaient de l'IFN $\gamma$ , en revanche, il n'y avait pas d'augmentation significative du taux d'IL-17 (figure 34B, figure 35B).

Les marqueurs d'activation des lymphocytes T - CD69, HLA-DR et PD-1- étaient significativement plus exprimés par les lymphocytes T dans les ascites EpCAM+ (figure 36, figure 37) en présence de catumaxomab (figures 34C, 35C, 35D), mais il n'était pas observé d'augmentation de l'expression de TRAIL (figure 35D).



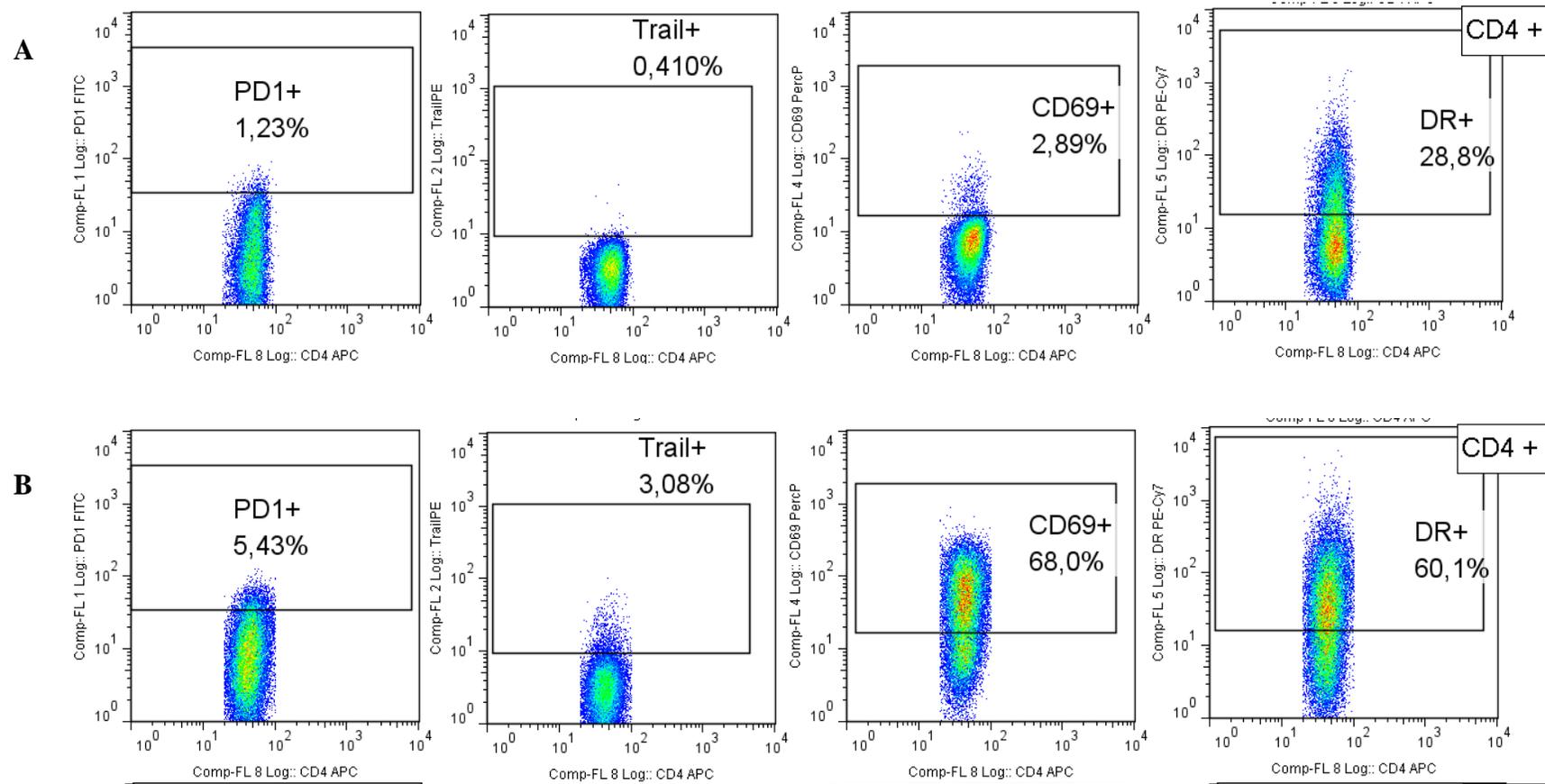
**Figure 34 - Activation des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dans les ascites malignes EpCAM<sup>+</sup> par le catumaxomab.**

Analyses par cytométrie des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> au sein des cellules CD45<sup>+</sup> d'ascites malignes (n=12) avec [■] ou sans [□] incubation dans du catumaxomab pendant 18 heures **A**. Pourcentage de CD4<sup>+</sup> **B**. Marquage intracellulaire du CD107a, INF $\gamma$  et IL-17 **C**. Marquage membranaire du CD69, HLA-DR et PD-1. Chaque point représente un patient. Un test t de Student pour comparer les moyennes  $\pm$  sd des deux groupes a été utilisé: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

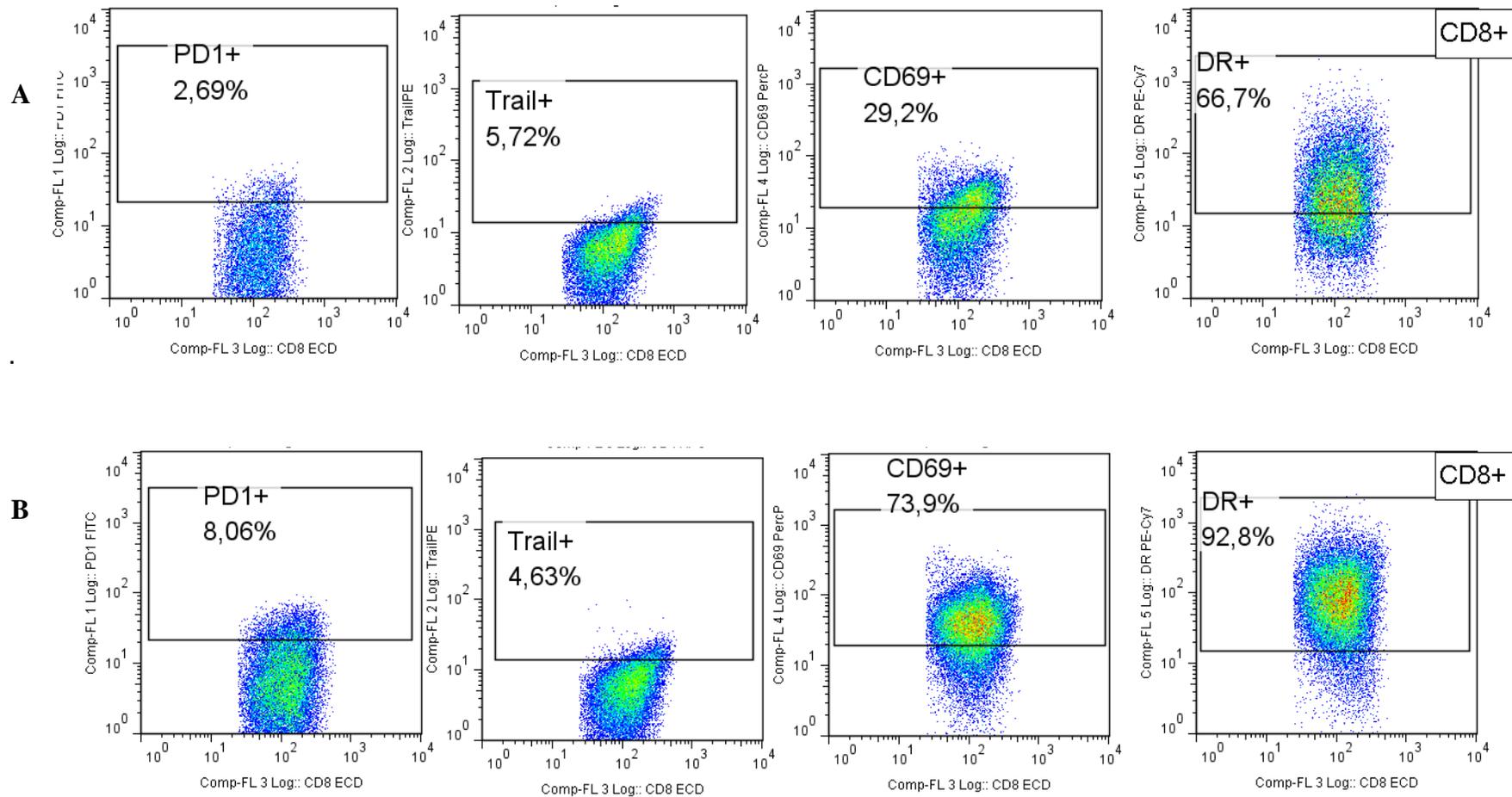


**Figure 35 - Activation des lymphocytes T CD8+ présentes dans les ascites malignes EpCAM+ par le catumaxomab.**

Analyses par cytométrie des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> au sein des cellules CD45<sup>+</sup> d'ascites malignes (n=12) avec [■] ou sans [□] incubation dans du catumaxomab pendant 18 heures **A.** Pourcentage de CD4+ **B.** Marquage intracellulaire du CD107a, INF $\gamma$  et IL-17 **C.** Marquage membranaire du CD69, HLA-DR **D.** Marquage membranaire de TRAIL et PD-1. Chaque point représente un patient. Un test t de Student pour comparer les moyennes  $\pm$  sd des deux groupes a été utilisée: \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001.



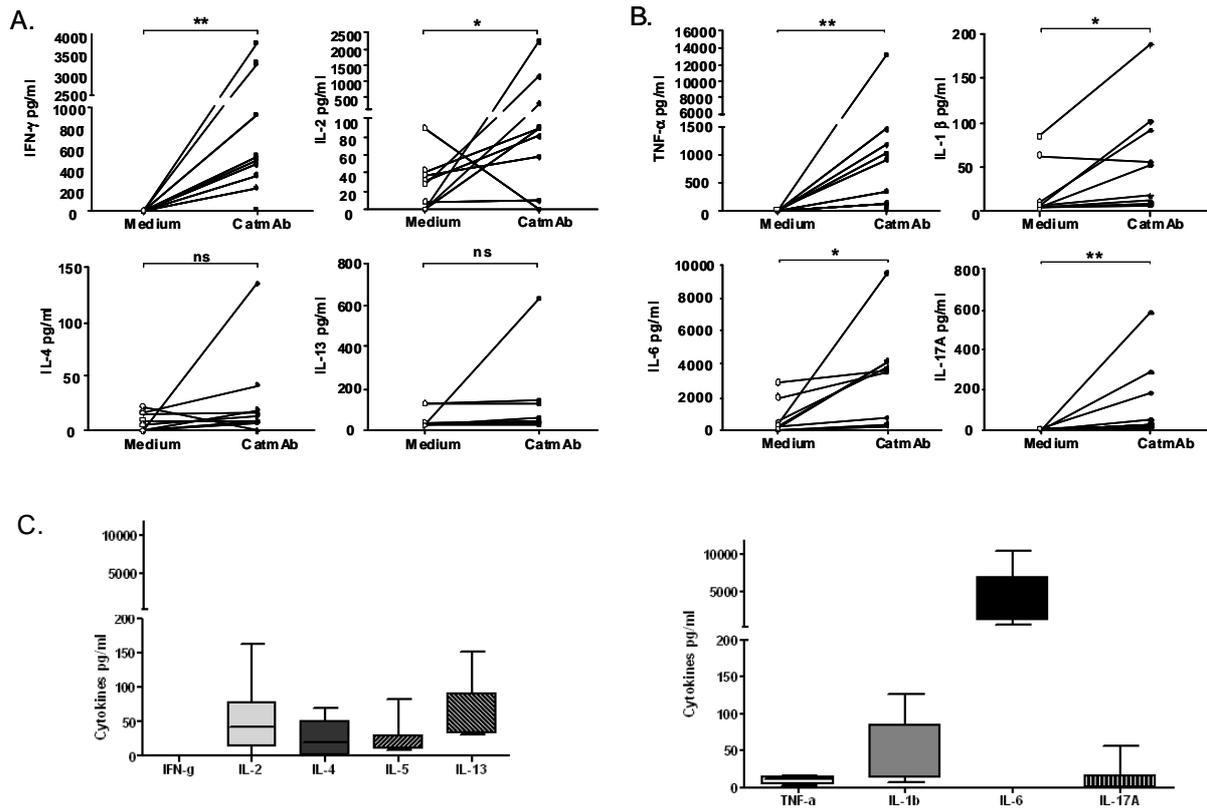
**Figures 36A et 36B** – Graphes obtenus par FACS représentant la fraction de cellules CD4+ exprimant les marqueurs d'activation PD1, TRAIL, CD69, DR, au sein des lymphocytes CD4+ issus d'ascite EpCAM+ (a) en milieu seul, (b) après incubation pendant 18 dans du catumaxomab (10ng/ml).



**Figures 37A et 37B**– Pourcentage de cellules CD8+ exprimant les marqueurs d'activation PD1, TRAIL, CD69, DR, au sein des lymphocytes CD8+ issus d'ascite EpCAM+ (a) en milieu seul, (b) après incubation pendant 18 dans du catumaxomab (10ng/ml

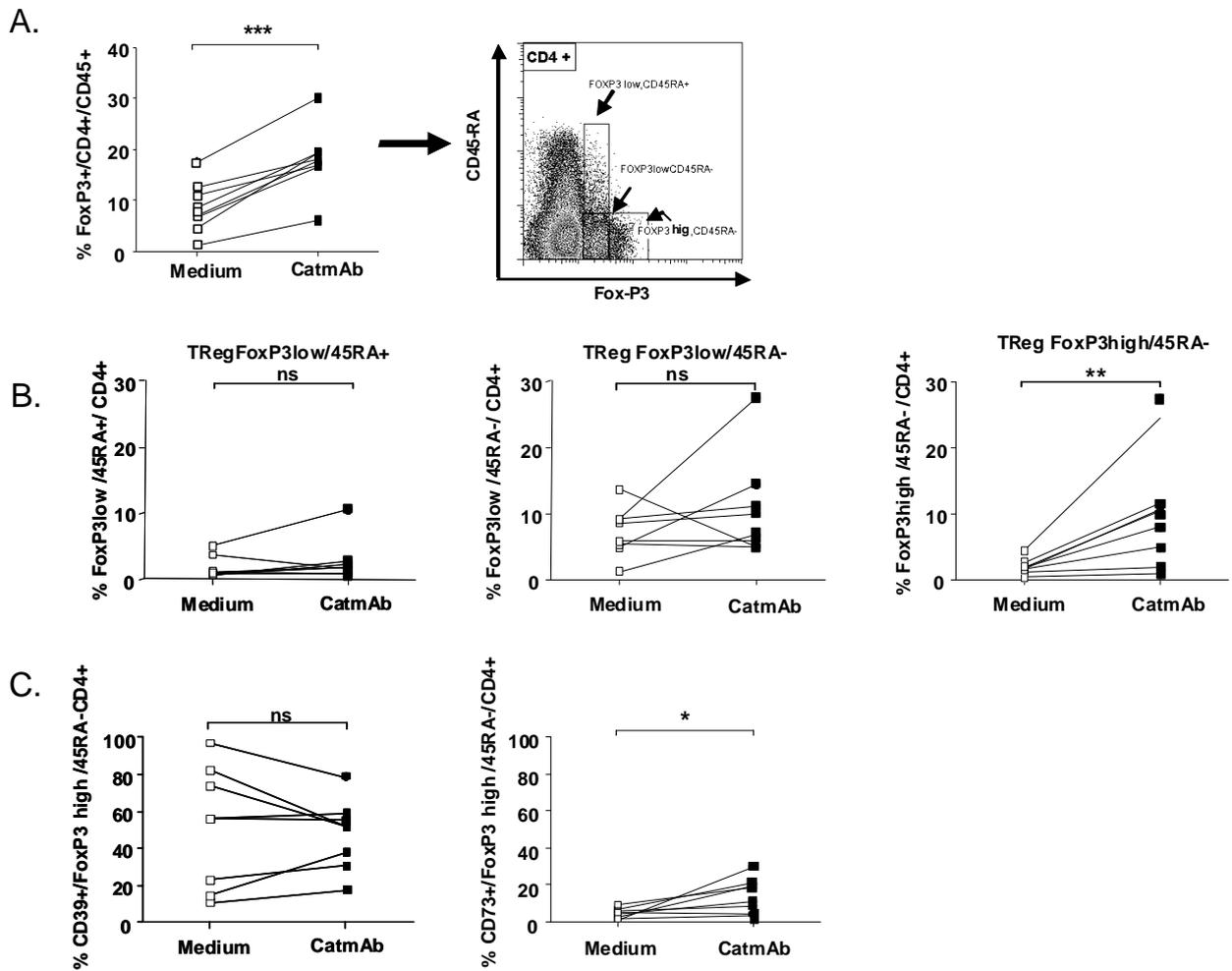
L'analyse des cytokines présentes dans le surnageant montrait une augmentation significative du taux d'IFN- $\gamma$ , d'IL-17a, d'IL-6 et d'IL- $\beta$  (*figures 38A, 38B*). En comparant les taux des différentes cytokines dans les ascites initialement prélevées, non traitées et ceux des surnageants après 18h d'incubation dans du catumaxomab, on observait une diminution, non significative, du taux d'IL-4 et d'IL-13 (*figure 38C*), témoins d'une réponse Th2 inflammatoire dans l'ascite, associée à une augmentation du taux de cytokines IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , en faveur d'une activation Th1, chez la plupart des patients. Ceci pouvait témoigner d'une modification du milieu induite par le catumaxomab, d'un profil Th2 vers un profil Th1.

Concernant les lymphocytes Treg CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, ils représentaient 5% (8,25  $\pm$  5) des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au sein des ascites malignes (*figure 39A*). L'analyse des Treg en fonction de leur statut CD45RA, permettait d'observer une majorité de FoxP3<sup>high</sup> CD45RA-CD73<sup>+</sup> après exposition au catumaxomab (*Figures 39B et 39C*). Ainsi, malgré la présence d'ectoATPase exprimée par les Treg, le catumaxomab induisait une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et une polarisation de type Th1.



### Figure 38 – Profil cytokinique des ascites

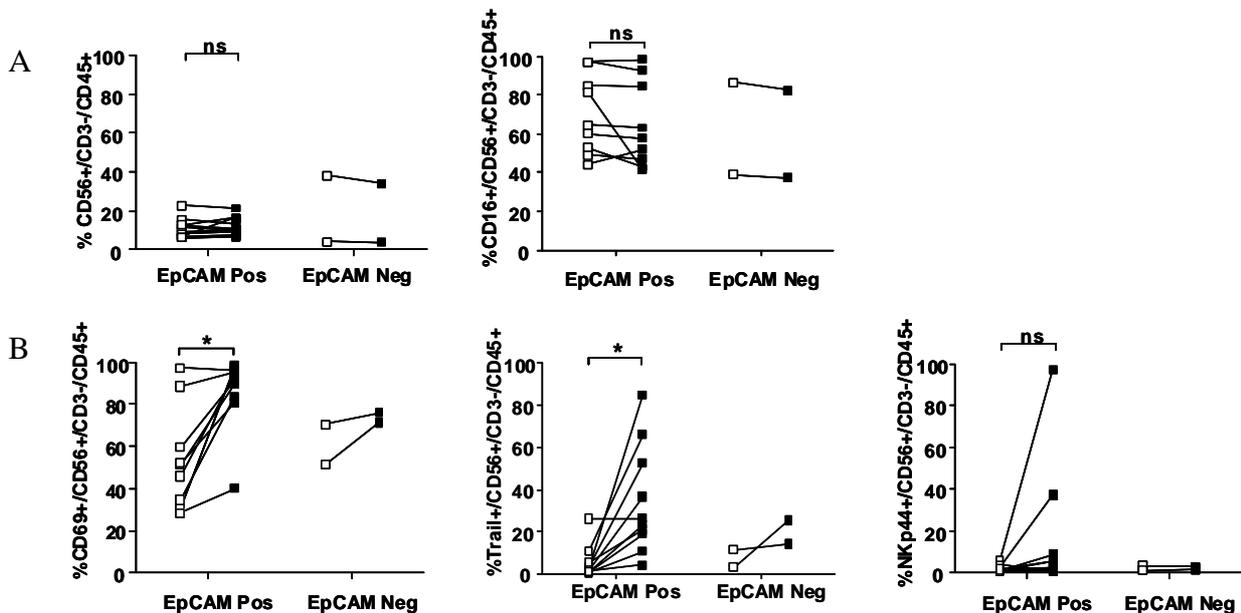
**A.** Cytokines des T helper. Monitoring de 4 cytokines préférentiellement sécrétées par les lymphocytes Thelper au sein d'ascites néoplasiques (n=12) incubées [■] ou non [□] avec du catuimaxomab pendant 18 heures. **B.** Cytokines inflammatoires. Monitoring de 4 cytokines préférentiellement sécrétées par le microenvironnement tumoral d'ascites néoplasiques (n=12) incubées [■] ou non [□] dans du catumaxomab pendant 18 heures. **C.** Cytokines dans les ascites. Analyse de la concentration cytokinique des ascites malignes fraîches. Chaque point représente un patient. Un test t de Student pour comparer les moyennes  $\pm$  sd des deux groupes a été utilisée: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



**Figure 39 – Marquage des lymphocytes T régulateurs dans les ascites malignes.** Analyse par cytométrie de flux des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> au sein des cellules CD45<sup>+</sup> d'ascites malignes (n=8) incubées [■] ou non [□] dans du catumaxomab pendant 18 heures. C. Marquage membranaire de CD39 et CD73 des Foxp3<sup>high</sup>CD45RA<sup>-</sup>. Chaque point représente un patient. Un test t de Student pour comparer les moyennes ± sd des deux groupes a été utilisée: \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001.

### 2.2.1.2 L'engagement de CD16 induit par le catumaxomab

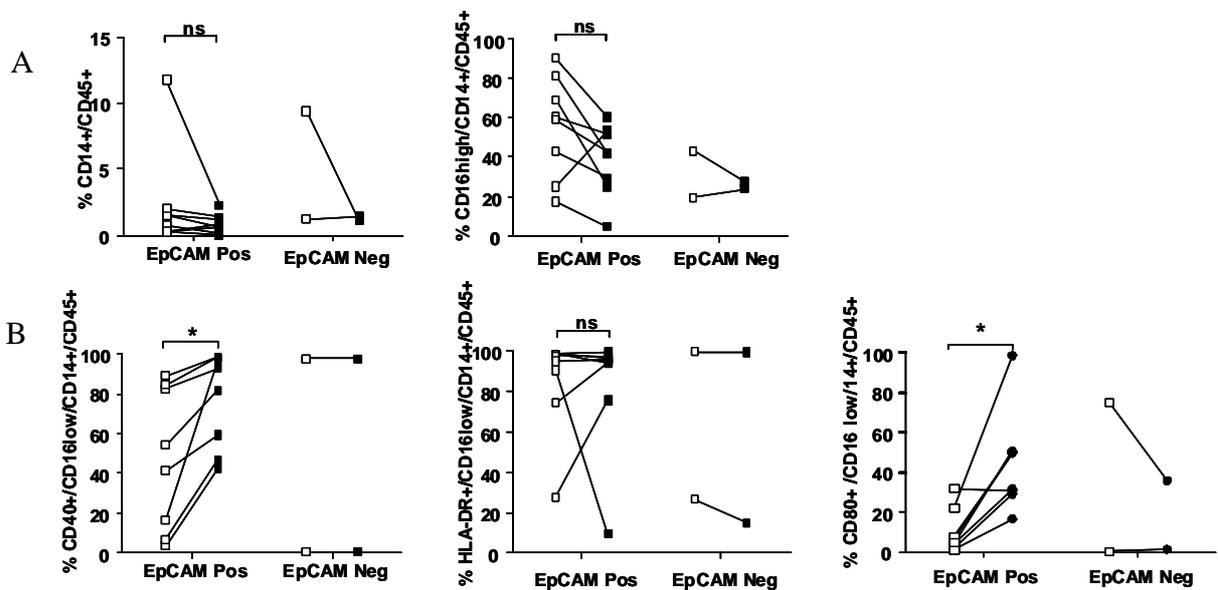
Le taux de cellules NK au sein des ascites malignes ne variait pas après incubation dans du milieu contenant du catumaxomab (*figure 40A*). Après prélèvement, la plupart des cellules NK exprimait le CD16, et son expression n'était pas augmentée après exposition au catumaxomab (*figure 40A*). Cependant, les cellules NK étaient fortement activées par le catumaxomab comme le montrait l'augmentation du taux de CD69 et de l'expression de TRAIL (*figure 40B*) et, dans une moindre mesure de l'expression de NKp44, et ceci uniquement dans les ascites EpCAM+.



**Figure 40 - Induction de TRAIL et de molécules activatrices par les cellules NK.**  
A-B. Analyse par cytométrie de flux des cellules NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> au sein des cellules CD45<sup>+</sup> d'ascites malignes (n=12) incubées [■] ou non [□] dans du catumaxomab pendant 18 heures. Les pourcentages de cellules NK et CD16<sup>+</sup> sont indiqués (A). Marquage membranaire du CD69, TRAIL et NKp44 (B).

La plupart des monocytes étaient sous-représentés au sein des lymphocytes T des ascites (*figure 40A*). Ils exprimaient la molécule CD16, qui était modérément diminuée en présence de catumaxomab (*figure 41A*). En revanche, l'expression de CD80 et CD40 sur les monocytes CD14<sup>+</sup> CD16<sup>low</sup> était nettement augmentée par le catumaxomab, avec une expression HLA-DR maintenue (*figure 41B*).

Par conséquent, le catumaxomab était capable d'induire l'expression de TRAIL sur les cellules NK et de molécules co-stimulatrices sur les monocytes inflammatoires.

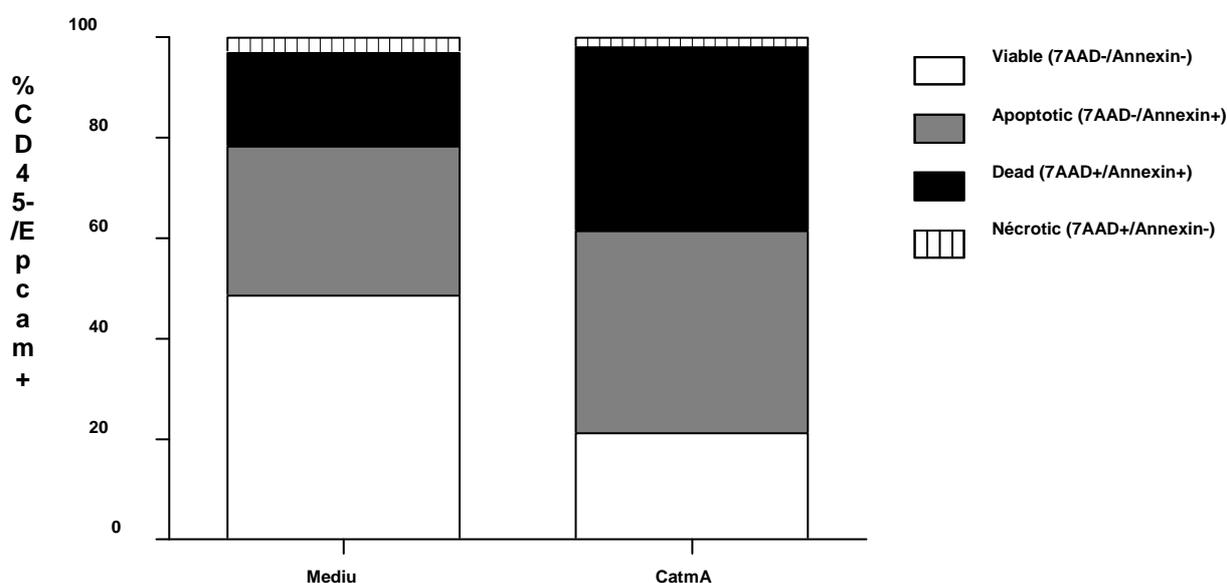


**Figure 41. Induction de molécules activatrices par les cellules monocytaires CD16<sup>+</sup>.**

A. B. Analyse par cytométrie de flux des monocytes CD14<sup>+</sup> au sein des cellules CD45<sup>+</sup> d'ascites malignes incubées ou non dans du catumaxomab pendant 18 heures. Les pourcentages de CD14<sup>+</sup> (gauche) et de CD14<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup> cells (droite) sont indiqués (A). Expression de CD40, HLA-DR et CD80 sur les CD14<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup> cells (B). Un test t de Student pour comparer les moyennes  $\pm$  sd des deux groupes a été utilisé: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 2.2.1.3 Mort immunogène induite par le catumaxomab

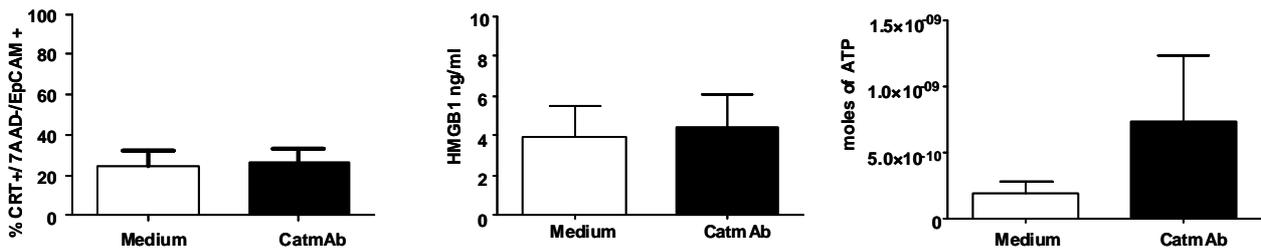
L'expression de l'annexin V et 7AAD sur les cellules EpCAM+CD45- issues d'ascites néoplasiques, en présence ou non de catumaxomab, était analysée par cytométrie de flux. L'incubation dans un milieu contenant du catumaxomab, augmentait le taux de cellules tumorales apoptotiques (annexin V+/7AAD-), de cellules tumorales mortes (annexin V+/7AAD+) (Figure 42).



**Figure 42 - Analyse par cytométrie de flux de la viabilité cellulaire.**

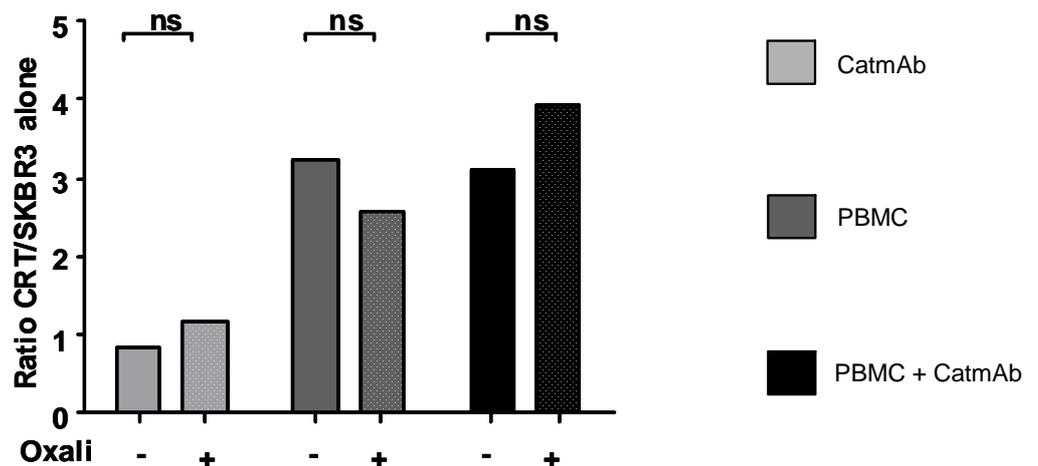
Pourcentage de cellules viables (annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>), de cellules apoptotique (7AAD<sup>-</sup> annexin V<sup>+</sup>), de cellules mortes annexin V<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) et nécrotiques (annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>), au sein des cellules CD45- EpCAM+ issues d'ascites malignes (n=7).

La concentration d'ATP dans le milieu augmentait de façon significative après incubation avec du catumaxomab (figure 43), en revanche, l'expression de la CRT et la concentration de HMGB1 dans le milieu extracellulaire de l'ascite (n = 10) (figure 43) n'étaient pas modifiées.



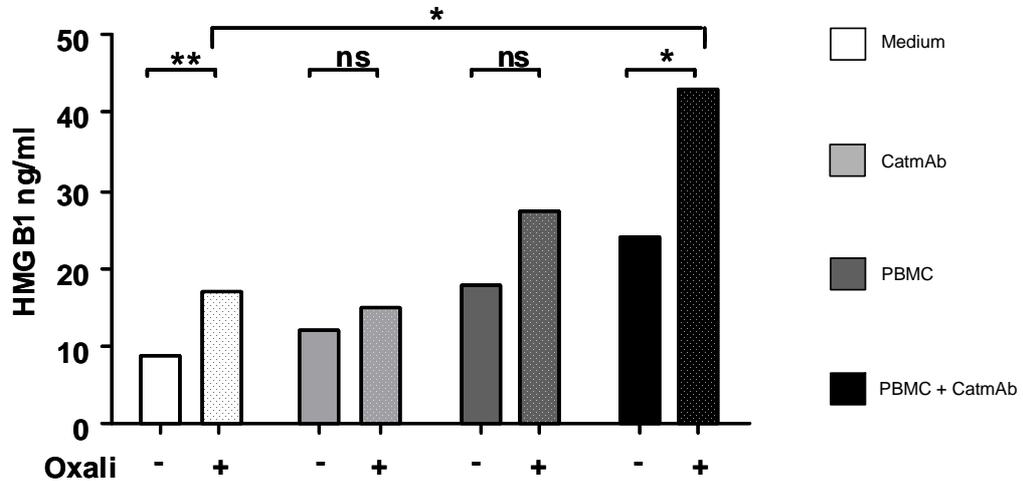
**Figure 43 – Analyse par cytométrie de flux de l'exposition membranaire de la calréticuline, de l'HMGB1 et de l'ATP extracellulaire (luciférase assays) au sein d'ascites malignes (n=10) insubées ou non dans du catumaxomab.**

Cependant, après pré-incubation de cellules EpCAM+ issues de lignées cellulaires (SKBR3) dans de l'oxaliplatine, en présence de PBMC, on observait une augmentation de l'expression de la CRT (*figure 44*), d' HMGB1 (*figure 45*) et de l'ATP (*figure 46*) en présence de catumaxomab. Les effets immunomodulateurs du catumaxomab, permettait d'induire une mort immunogène, en synergie avec l'oxaliplatine.

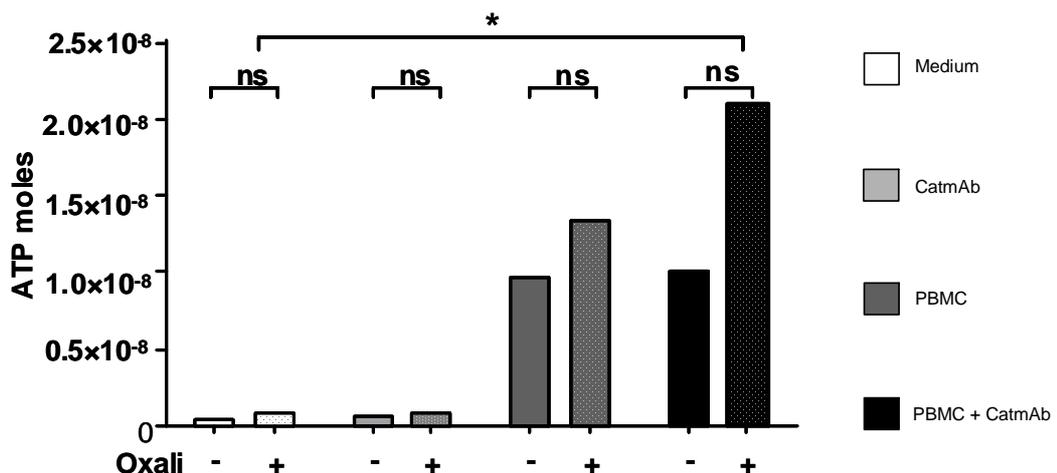


**Figure 44 – Analyse de l'exposition membranaire de la calréticuline par les cellules tumorales SKBR3, dans 3 situations : après incubation dans du catumaxomab pendant 18 heures (CatmAb), en présence de PBMC (PBMC), en présence de PBMC et après incubation pendant 18 heures dans du catimaxomab**

(PBMC + CatmAb), sans (barres pleines) ou après (barres pleines pointillées) 2 heures de pré-incubation dans de l'oxaliplatine, pour chacune des 3 situations.



**Figure 45 - Analyse de la libération d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (ELISA) dans 4 situations : après incubation dans du catumaxomab pendant 18 heures (CatmAb), en présence de PBMC (PBMC), en présence de PBMC et après incubation pendant 18 heures dans du catimaxomab (PBMC + CatmAb), et par dans le milieu seul (medium), sans (barres pleines) ou après (barres pleines pointillées) 2 heures de pré-incubation dans de l'oxaliplatine, pour chacune des 4 situations**



**Figure 46 - Analyse de la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire (Luciferase assays) dans 4 situations : après incubation dans du catumaxomab pendant 18 heures (CatmAb), en présence de PBMC (PBMC), en présence de PBMC et après**

*incubation pendant 18 heures dans du catimaxomab (PBMC + CatmAb), et par dans le milieu seul (medium), sans (barres pleines) ou après (barres pleines pointillées) 2 heures de pré-incubation dans de l'oxaliplatine, pour chacune des 4 situations*

### **2.2.2 Modèle allogénique**

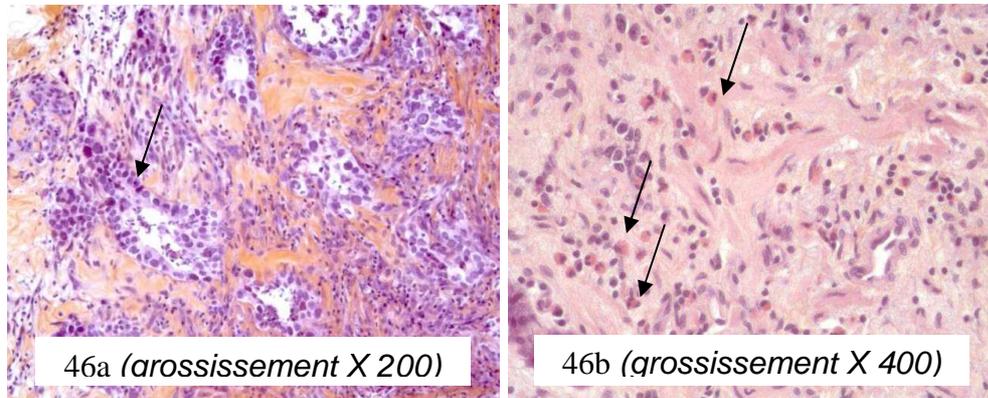
Dans le modèle allogénique, réalisé à partir de co-cultures de lignées cellulaires tumorales EpCAM+ et EpCAM-, en présence de cellules mononuclées du sang (PBMC), avec ou sans incubation dans du catumaxomab, des résultats similaires concernant les marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ étaient observés, avec comme seule différence une augmentation de la production d'IL-17.

L'analyse des cellules NK au sein des co-cultures EpCAM+/- et PBMC allogéniques, montrait une augmentation du taux de cellules NK CD69+, alors que les taux de CD107a et IFN- $\gamma$  restaient faibles après incubation dans un milieu contenant du catumaxomab.

Contrairement aux résultats obtenus dans le modèle allogénique, une mort immunogène induite par le catumaxomab, après pré-incubation dans de l'oxaliplatine, était constatée. Les cellules tumorales exposaient de la CRT, la concentration d'HMGB1 dans le milieu était significativement augmenté, ainsi que la concentration d'ATP.

### 2.2.3 Analyse sur des tumeurs sphéroïdes

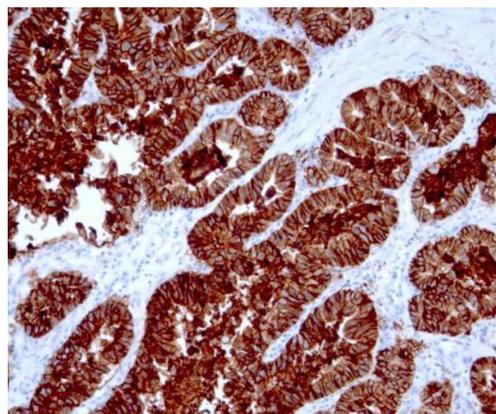
Quatre prélèvements tumoraux de cancer gastrique ont été réalisés ; seuls deux répondaient à des adénocarcinomes (*figures 47a, 47b*) et ont été mis en culture 3D sur gel de PolyHema.



**Figure 47 – Marquage HES** des coupes d'adénocarcinome gastrique. Les noyaux des cellules tumorales sont marqués en violet (a) adénocarcinome type tubuleux ,(b) adénocarcinome à cellules indépendantes.

### Marquage EpCAM

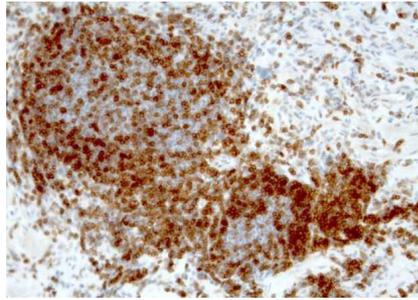
Les cellules tumorales des 2 prélèvements exprimaient EpCAM, révélé par l'anticorps anti-EPcam (*figure 48*).



**Figure 48 - Marquage immunohistochimique anti EpCAM** (grossissement X 200): marquage cytoplasmique des cellules tumorales de coloration marron.

### **Marquage des lymphocytes CD3**

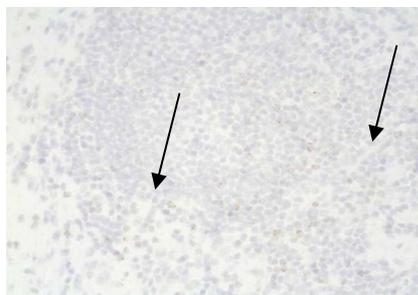
Des lymphocytes CD3 révélés par le marquage anti-CD3 étaient présents dans le stroma tumoral (*figure 49*). Le taux de CD3+ par rapport à l'ensemble des cellules, variait de 20% à 40% des cellules, sans différence significative entre les différentes conditions de mise en culture.



**Figure 49 - Marquage immunohistochimique anti-CD3** (grossissement X 200) : marquage des lymphocytes T présents dans le stroma tumoral,

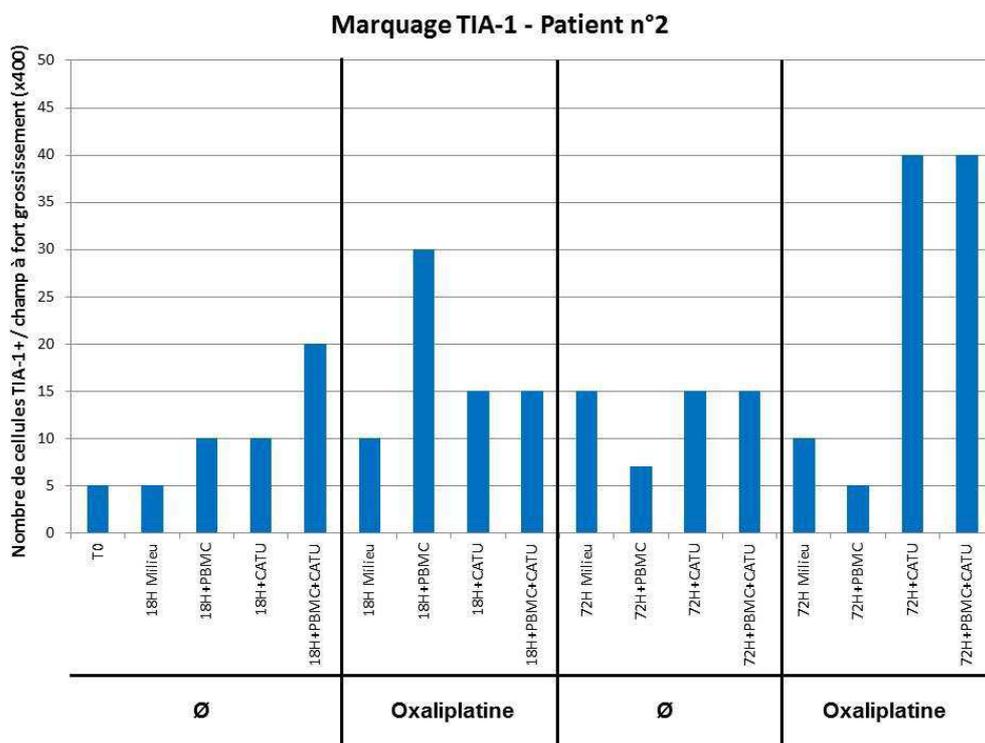
### **Marquage TIA-1**

Le marquage TIA-1 est un marqueur spécifique des granules cytotoxiques. Il est fixé par les lymphocytes et les cellules NK activées (*figure 50*). Cependant, la présence de débris cellulaires fixant TIA-1 peut gêner le comptage de cellules positives. Pour le patient N°1, le taux de cellules positives TIA-1 variait de 30 à 40%, quelque soit la condition de culture.



**Figure 50- Marquage TIA-1** (grossissement : x400) Marquage de TIA-1 sur la coupe tumorale à T0. Les cellules positives sont colorées en marron. Les flèches signalent des cellules TIA-1 positives (cellules cytotoxiques), correspondant à des lymphocytes.

Pour le patient N°2, le taux de cellules TIA-1 sans traitement variait de 5 à 15%, il n'était pas modifié après culture en présence de PBMC ou de catumaxomab seul (figure 51). En revanche, le taux de TIA-1+ augmentait à 35% après culture en PBMC et oxaliplatine, en faveur de l'induction d'une activation des lymphocytes T secondaire au stress du réticulum endoplasmique, déclenché par l'oxaliplatine. Les taux de TIA-1 les plus élevés (40% des cellules positives) étaient observés sur les échantillons incubés dans du catumaxomab (avec ou sans PBMC), après traitement initial par l'oxaliplatine, en faveur d'un effet synergique sur l'activation de la réponse immunitaire des 2 traitements.



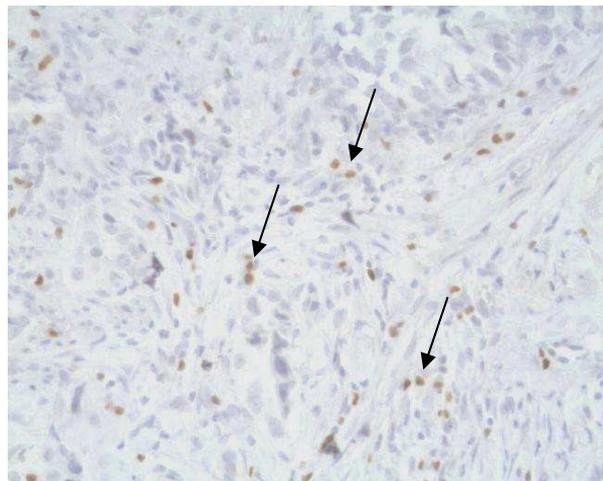
**Figure 51 - Marquage TIA-1 des coupes de tissus du patient n°2**

Les résultats sont exprimés nombre moyen de cellules TIA-1+ par champ à fort grossissement (x400) (d'après Julien Pesquet).

### **Marquage FoxP3 (figure 52)**

Pour le patient n°1, le marquage FoxP3 des lymphocytes Tregs variait de 60 à 75 par champs à T0 et après 2H de culture dans le milieu contenant de l'oxaliplatine. Le marquage diminuait à 30/ par champs, après mise en culture pendant 18h, avec ou sans oxaliplatine. Lorsque du catumaxomab était ajouté au milieu, on observait une diminution du nombre de Treg à 20/champs, majorée après pré-incubation dans de l'oxaliplatine (5 à 15 Treg/champs).

L'analyse des Treg pour le patient n°2 n'était pas réalisable, en raison de l'absence d'infiltration Treg au niveau de la tumeur.



**Figure 52 - Marquage FoxP3** (grossissement : x400)

*Marquage de FoxP3 sur la coupe après incubation en milieu contenant de l'oxaliplatine pendant 2h. Les cellules positives sont colorées en marron. Les flèches signalent des cellules FoxP3 positives (Tregs).*

### **Marquage de la calréticuline**

Le marquage de la CRT était difficilement analysable : le marquage membranaire était essentiellement localisé au niveau apical et de nombreuses cellules saines fixaient l'anticorps. Aucune conclusion quant à l'exposition de la CRT secondaire à l'incubation en catumaxomab, avec ou sans oxaliplatine ne pouvait être faite.

En conclusion, ce travail préliminaire de culture tissulaire d'adénocarcinome gastrique, nous a permis de valider la faisabilité de la technique de culture en 3D, permettant un maintien du microenvironnement tumoral, et une analyse des éléments cellulaires de ce microenvironnement.

### **3 Discussion et perspectives**

L'immunothérapie en cancérologie a fait des progrès considérables au cours des dernières années en raison d'une meilleure compréhension de la biologie tumorale et des mécanismes de surveillance, ou de tolérance liés au système immunitaire. Cette meilleure compréhension des interactions entre le développement tumoral et le système immunitaire a permis de développer de nouvelles voies de recherche thérapeutique, visant à restaurer ou à induire des mécanismes de défense immunitaire. Les différents axes de développement de ces agents anti-néoplasiques et l'application de l'immunothérapie s'appuient sur quatre grands principes : l'administration d'anticorps dirigés contre un épitope défini afin de déclencher une réaction immunitaire, la promotion ou l'inhibition de cytokines ayant une activité activatrice ou inhibitrice sur des effecteurs immuns, la vaccination capable d'induire une réponse immunitaire dirigée et prolongée et enfin les thérapies cellulaires.

Unes des voies que nous avons explorées dans ce travail est celle de l'immunothérapie par injection d'anticorps bi-spécifique ciblé sur un marqueur membranaire exprimé par les cellules tumorales et sur une molécule présente sur les lymphocytes T permettant de les activer.

#### **3.1 Activation du système immunitaire**

##### **3.1.1 Induction d'une cytotoxicité T-dépendante**

Les résultats de ce travail sur des modèles d'ascites malignes confirment les propriétés activatrices du catumaxomab sur les lymphocytes T. Jager et al, (*Jager M et al, 2012*) ont mis en évidence cette activation sous la forme d'une augmentation du

pourcentage des lymphocytes T CD4+ et CD8+ exprimant le marqueur CD69 après administration intrapéritonéale de catumaxomab. L'induction ou le blocage de l'expression d'autres molécules à la surface des lymphocytes T pourraient avoir un véritable intérêt clinique, tant dans la compréhension du mécanisme d'action de l'anticorps que dans son efficacité clinique. Nous avons donc recherché une surexpression de HLA-DR, molécule de classe II du CMH, présente sur les cellules présentatrices d'antigènes, mais également surexprimée par les lymphocytes T activés. La présence d'HLA-DR sur les lymphocytes T est impliquée dans les phénomènes de présentation d'antigènes entre les cellules T (*Barnaba V et al, 1994 ; Taams LS et al, 1999*). L'augmentation du marquage HLA-DR, stimulée par la présence d'IL-2 et d'IL-12, est donc en faveur d'une activation des lymphocytes T et d'une potentialisation de leur action par des interactions T-T.

Par ailleurs, nous avons observé une surexpression de TRAIL par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ après incubation dans du catumaxomab, ce qui est en faveur d'une action cytotoxique directe (apoptose et mort) des lymphocytes T contre les cellules tumorales, c'est-à-dire de TRAIL contre ses récepteurs de mort. Le rôle majeur de TRAIL dans l'efficacité d'un anticorps bi-spécifique antiCD3/antiEpCAM a récemment été souligné. En effet, il a été montré sur des modèles murins, et in vitro, que des lymphocytes T surexprimant TRAIL (transduits par lentivirus TRAIL), mis en contact avec des cellules tumorales EpCAM+ en présence de l'anticorps bi-spécifique anti-EpCAM/anti-CD3, augmentaient l'apoptose et la mort des cellules tumorales, comparativement à des lymphocytes non modifiés (*Groth A et al, 2012*). De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression de PD-1 (programmed death protein 1) autre marqueur d'activation des lymphocytes T.

De plus, nous avons confirmé l'activité cytotoxique directe des lymphocytes T CD3+CD8+, capables de dégranuler, par une augmentation du marquage CD107a marqueur associé à la dégranulation des lysosomes dans les CTL. De façon étonnante, un marquage CD107a était aussi constaté sur les CD4+, généralement non dotés de fonctions dégranulatoires. Cependant, un tel marquage a été décrit sur les cellules T CD4+ activées au cours des infections virales. Dans de telles circonstances, les lymphocytes T CD4+ peuvent acquérir des fonctions cytotoxiques résultant de l'expression de surface de CD107a et la libération de granzyme A et granzyme B (Casazza JP et al, 2006 ; Schmuck M et al, 2012 ; Marshall NB, Swain SL, 2011). Enfin, nous avons montré par l'analyse comparative des profils cytokiniques des ascites malignes fraîches et après incubation dans du catumaxomab, ainsi que sur les modèles allogénique, une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires secrétées par les lymphocytes Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), au profit des cytokines de type Th2 (IL-6 and IL-10) présentes dans les ascites fraîches. Or, un déséquilibre de la balance entre les lymphocytes Th1/Th2 est un des mécanismes majeurs favorisant le développement tumoral. Le catumaxomab est donc capable de convertir une inflammation chronique et immunosuppressive (Th2) en une inflammation aiguë et immunogène (Th1).

Cette activation cytotoxique des lymphocytes T n'était pas corrélée au taux de cellules EpCAM+ ; il semble qu'un faible ratio suffise à obtenir une action anti-tumorale, comme il l'a été démontré dans le travail de Heiss et al, (Heiss M et al, 2010). En effet, dans cette étude randomisée, le ratio médian de cellules EpCAM+/cellules ascites n'était que de 0,65%, et suffisait pour obtenir un bénéfice clinique et une diminution significative du taux de cellules EpCAM+ dans l'ascite qui chutait de 6510 à 27 pour 10<sup>6</sup> cellules ascites, après une seule injection IP de catumaxomab.

### 3.1.2 Activation du récepteur Fc $\gamma$ des cellules accessoires

Par son fragment Fc, le catumaxomab induit une activation des cellules accessoires exprimant le récepteur Fc $\gamma$  (CD16), comme nous avons pu le constater sur l'augmentation du pourcentage de cellules NK exprimant TRAIL, capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales, et par la surexpression des marqueurs d'activation CD80 et CD40 par les monocytes. En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression du CD16 tant sur les NK que sur les monocytes.

Initialement, l'isotype de choix utilisé en thérapeutique à base d'anticorps est une IgG humaine, dont la région Fc contient un résidu asparagine ubiquitaire (N297) qui agit comme un site accepteur pour N-glycanes. La nature de ces glycanes peut influencer de manière décisive la performance thérapeutique d'un anticorps recombinant, et leur absence ou leur modification peut entraîner la perte de fonctions effectrices de Fc, une plus grande immunogénicité et des profils pharmacocinétiques défavorables.

Ainsi, une amplification de l'affinité du catumaxomab pour le récepteur Fc $\gamma$  pourrait permettre d'augmenter son efficacité. En effet, il a été montré que la réponse au traitement dépendait du polymorphisme du récepteur Fc $\gamma$ , impliqué dans les interactions entre les cellules accessoires (cellules monocytaires et NK) et les cellules tumorales marquées par l'anticorps (*Ferris RL et al, 2010 ; Musolino A et al, 2008*). Pour exemple, il a été montré chez les patients Kras sauvage, traités pour un cancer colorectal par cetuximab, que la réponse au traitement dépendait du polymorphisme de Fc $\gamma$ RIIIa (*Bibeau F et al, 2009*). Ceci a conduit à produire des anticorps ayant une affinité plus importante pour ce récepteur. Cela a pu être obtenu en modifiant légèrement la séquence de la portion Fc ou en utilisant des systèmes cellulaires de

production des anticorps monoclonaux qui permettent de contrôler la glycosylation de cette portion, en particulier la proportion de formes afucosylées. Cette seconde solution présente l'avantage d'obtenir des anticorps monoclonaux qui ne sont pas immunogènes (ils n'induisent pas de production par le patient d'anticorps neutralisant l'anticorps thérapeutique) car ils existent naturellement bien qu'à faible concentration chez l'Homme. De tels anticorps monoclonaux de seconde génération à portion Fc modifiée ont permis d'obtenir des résultats cliniques prometteurs en comparaison aux anticorps de première génération dirigés contre la même cible. Ils pourraient représenter une nouvelle étape dans l'immunothérapie par anticorps monoclonaux. Ainsi, en modifiant le fragment Fc du catumaxomab, une augmentation de la réponse ADCC, et de l'activation des lymphocytes CD3, pourrait être obtenue.

### **3.1.3 Inhibition des effecteurs impliqués dans la progression tumorale**

Nous avons confirmé et analysé le rôle activateur du catumaxumab sur les mécanismes de défense immunitaire. Nous n'avons pas mis en évidence d'action inhibitrice potentielle du catumaxomab sur les mécanismes d'immunotolérance induits par la tumeur. Notamment, les taux de Treg au sein des lymphocytes CD4+ n'étaient pas modifiés par l'incubation dans du catumaxomab et leur action immunosuppressive ne semblait pas diminuer, comme en témoigne la présence du marqueur CD73 sur les lymphocytes Treg. En effet, le CD73 est une enzyme (ectoATPase) de la surface cellulaire appartenant au catabolisme des purines qui catalyse la dégradation de l'adénosine monophosphate en adénosine, responsable des fonctions immunosuppressives des lymphocytes Treg (*Kobie JJ, et al, 2006 ; Deaglio S et al, 2007*). Cependant, malgré la présence d'ectoATPase, la concentration d'ATP dans le milieu extra-cellulaire augmentait, signature d'une mort tumorale. Une des

prochaines étapes pourrait reposer sur la recherche d'autres modes d'action ciblés sur le blocage de processus immunosuppresseurs.

### **3.1.4 Cytotoxicité et mort immunogène – Synergie avec un agent de chimiothérapie conventionnelle**

Dans la littérature, les taux de réponse obtenus après administration d'un anticorps spécifique dirigé contre un antigène tumoral, sont de l'ordre de 8 à 10% (*Campoli M et al, 2009*) et peuvent augmenter jusqu'à 30-60% en association avec une chimiothérapie ou/et une radiothérapie. Ainsi, des anticorps sont actuellement utilisés en clinique courante tels que le rituximab (anti-CD20) dans le traitement des lymphomes, le trastuzumab (anti human epidermal growth factor 2 (HER-2)) dans le traitement du cancer du sein et de l'estomac, le cetuximab (anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR)), dans les traitements des cancers colo-rectaux métastatiques et dans les tumeurs de la tête et cou, en association avec des chimiothérapies conventionnelles. En effet, ces-dernières peuvent avoir des effets immunostimulants, dont l'induction d'une mort immunogène (anthracyclines, oxaliplatine et radiothérapie), en réponse à un stress au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule tumorale. Nous n'avons pas observé de signaux témoins d'une mort immunogène après incubation dans du catumaxomab seul. Ceci peut s'expliquer par une cytotoxicité directe du catumaxomab sur les cellules tumorales insuffisante, comparée à celle des agents anti-cancéreux conventionnels. En revanche, après pré-incubation dans de l'oxaliplatine, une mort immunogène caractérisée par l'exposition membranaire de la CRT, la libération d'HMGB1 et d'ATP, était constatée. Bien que, ces résultats obtenus sur le modèle allogénique soient à confirmer sur les cellules issues d'ascites néoplasiques, la combinaison du

catumaxomab à un agent de chimiothérapie paraît être une stratégie thérapeutique intéressante.

### **3.1.5 Réponse immunitaire à distance**

#### **Induction d'une immunité anti-tumorale spécifique**

Le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace à distance par le catumaxomab IP reste débattu. Cependant, il a été rapporté dans la littérature, deux cas de régression tumorale à distance du site d'injection IP (*Wooopen H et al, 2012 ; Petrelli F et al, 2012*). Pour un cas (*Wooopen H et al, 2012*), il s'agissait d'une patiente ayant un carcinome ovarien multimétastatique, résistante aux sels de platine, traitée par injection IP de catumaxomab en raison d'une ascite réfractaire dans le cadre de l'essai thérapeutique CASIMAS (NCT00822809). Suite à l'injection IP, une réponse clinique presque complète d'une métastase cutanée localisée sur la paroi abdominale était observée. Le second cas vient d'être rapporté (*Petrelli F et al, 2012*), il s'agissait aussi d'une patiente traitée dans le cadre de l'essai CASIMAS, pour une ascite réfractaire d'un carcinome mammaire multimétastatique. L'injection IP du catumaxomab a été suivie d'une réponse clinique des symptômes liés à l'ascite, mais aussi à une diminution du volume des métastases hépatiques. Ces deux cas suggèrent qu'une réponse immunitaire à distance, capable de contrôler les cellules tumorales EpCAM+, a été induite par l'injection IP du catumaxomab. Ceci pourrait s'expliquer par un passage systémique du catumaxomab, cependant, nous avons vu que les taux plasmatiques après injection IP étaient faibles, et il est peu probable qu'ils soient suffisants pour conférer au catumaxomab une cytotoxicité locale en dehors du péritoine. L'autre explication possible repose sur la synthèse locale, dans le péritoine, de lymphocytes mémoire, capables de recirculer dans la circulation

sanguine et d'activer une réponse immunitaire contre les cellules exprimant EpCAM+ à distance du site d'injection du catumaxomab. En effet, un effet vaccinal-like a été décrit chez 5/9 patients traités par voie IP (*Strolein MA et al, 2009*). Une réstimulation par injection sous-cutanée de cellules tumorales et de PBMC autologues, associés à l'administration de catumaxomab, était réalisée un mois après le traitement IP. Il en résultait une augmentation du taux sérique de lymphocytes T IFN $\gamma$ +CD4+ et IFN $\gamma$ +CD8+ de 0,4% à 2,9% en moyenne, témoignant d'une réponse immunitaire rapide, mémoire contre l'antigène EpCAM.

### **Production d'anticorps anti-murins**

Peu de bénéfices cliniques ont été obtenus avec les anticorps monoclonaux de première génération, essentiellement en raison de leur faible capacité à activer les effecteurs immunitaires et de l'immunogénicité des fragments murins les composant, le patient produisant des anticorps humains anti anticorps murin (HAMA). Ainsi, une réponse immunitaire importante était constatée dans 84% des cas, après l'administration répétée et à fortes doses d'anticorps (*Hwang WY, Foote J, 2005*). Ces HAMA induisent une élimination rapide des anticorps murins ainsi que des effets secondaires parfois fatals. De plus, la durée de vie des anticorps murins dans le sérum est courte et leur capacité pour recruter des effecteurs cellulaires ou les protéines impliquées dans la réponse immune est limitée (*Qu Z Zhengxing Qu et al, 2005*). Ce problème a été résolu par la synthèse d'anticorps chimérique, humanisé, ou complètement humains. Initialement, des anticorps chimériques, dans lesquels les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines, ont été fabriqués, mais il persistait une production d'anticorps humain dirigés contre les anticorps chimériques

dans 40% des cas. En effet, un des mécanismes pouvant expliquer l'absence d'efficacité d'un anticorps est la synthèse par l'hôte d'anticorps dirigés contre la partie variable de l'anticorps (idiotope). Certains de ces idiotopes peuvent être localisés au niveau de la zone de liaison de l'anticorps avec l'antigène ciblé, et compromettent ainsi l'action de l'anticorps qui est dans l'incapacité de se fixer à l'antigène cible.

De ce fait, la première humanisation des anticorps a été décrite en 1986 (*Jones PT et al, 1986*) et consiste à produire des régions variables proches des régions humaines sans que l'anticorps humanisé perde l'affinité et la spécificité de l'anticorps murin.

Par conséquent, une des limites à l'utilisation du catumaxomab est la production d'anticorps anti-catumaxomab (anti-murine (HAMA)) qu'elle génère. Ces anticorps limitent son utilisation répétée, et probablement la dose maximale injectable en systémique. En effet, par voie IP, des anticorps HAMA n'étaient détectables dans la circulation sanguine qu'après la 4<sup>ème</sup> injection IP, équivalente à 150 ng/ml, et à une dose cumulée de 230ng/ml (*Ott MG et al, 2012*), en raison d'un faible passage systémique. Une concentration plasmatique plus importante, telle que l'on pourrait le constater après injection systémique, serait suivie d'une synthèse rapide d'anticorps anti-murine, limitant la possibilité de nouvelles injections. Par conséquent, une des solutions pour améliorer l'efficacité et augmenter les possibilités d'utilisation de cet anticorps serait de l'humaniser.

## 3.2 Perspectives

### 3.2.1 Modifier la configuration spatiale : nouvelle classe des anticorps bi-spécifiques

Afin d'optimiser l'efficacité des anticorps dirigés contre la cellule tumorale, une stratégie reposant sur la préparation d'anticorps bi-spécifiques capables de se lier par ses 2 chaînes variables à 2 épitopes, le plus souvent représentés par l'antigène tumoral et le récepteur CD3 des lymphocytes T, a été développée. Ces anticorps ont l'avantage d'être stables, faciles à produire, et d'être actifs à de faibles doses. La configuration des premiers anticorps bi-spécifiques était proche de celle d'une immunoglobuline G et comportait 2 sites de liaison spécifiques distincts. Afin d'améliorer l'efficacité de ces anticorps, la configuration spatiale de ces 2 sites a été modifiée, afin d'aligner les 2 domaines variables sur une seule chaîne polypeptidique (*Bird RE, Walker BW, 1991*). Ce type d'anticorps bi-spécifique est regroupé sous le terme d'anticorps BiTE (bi-specific-Tcell engager) (*Baeuerle PA et al, 2008 ; Baeuerle PA et al, 2009*). Ces anticorps bi-spécifiques présentent l'avantage d'activer les lymphocytes CD8+ et CD4+ à un très faible ratio effecteur/ cellule tumorale (effector to target (E:T) ratio), d'induire une forte activité de lyse à des valeurs EC50 faibles allant de 0,1 à 50 pmol / L (2-1,000 pg/ml). De plus, ils sont capables de se lier au CD3 des lymphocytes mais avec une faible affinité, uniquement lorsque l'anticorps est présenté aux lymphocytes par la cellule tumorale (*Brischwein K et al, 2007*). De nombreux anticorps BiTE ont été synthétisés, dirigés contre plus de 10 antigènes cibles, tels que CD19, EpCAM, Her2/neu, EGFR, CD66e, CD33, EphA2, and MCSP (ou HMW-MAA) (*Baeuerle PA et al, 2009*). Deux d'entre eux sont actuellement en cours de développement cliniques ; il s'agit du blinatumomab (MT103) spécifiquement

dirigé contre le CD19, présent que les lymphocytes B, et le CD3, étudié dans le traitement de la leucémie lymphoblastique de type B et du lymphome non-hodgkinien. (*Bargou R et al, 2008, Topp M et al, 2008*) et le MT110 dirigé contre EpCAM et contre CD3.

Dans ce travail, nous avons confirmé le caractère bi-spécifique du catumaxomab capable de se fixer à l'antigène EpCAM et au CD3 des lymphocytes provoquant leur activation. Cependant, sa configuration spatiale de type IgG est responsable d'une activation des lymphocytes T même en l'absence de fixation ou de reconnaissance d'EpCAM. La synthèse d'un anticorps monoclonal bi-spécifique fait d'une seule chaîne polypeptidique pourrait permettre d'éviter une suractivation lymphocytaire et par conséquent des effets secondaires liés au syndrome de « cytokine release ».

L'activité cytotoxique d'un anticorps bi-spécifique anti EpCAM/antiCD3 de type BiTE dirigé, le MT110, a été étudiée in vitro et ex vivo sur des lignées cellulaires EpCAM+, et dans des modèles murins (*Brischwein K, et al, 2006; Amann M, et al 2008; Schlereth B, et al, 2005; Schlereth B, et al, 2006*). Les résultats des travaux réalisés in vitro et ex vivo suggèrent que la présence prolongée du médicament dans les tissus cibles peut entraîner un recrutement des cellules T, l'activation et l'expansion de ces cellules vers et dans les tissus tumoraux, pouvant induire une activité anti-tumorale chez l'homme. Le MT110 est actuellement étudié dans un essai thérapeutique de phase I (NCT00635596) chez les patients ayant un carcinome (poumon, estomac, cardia, colon-rectum, prostate, sein, ovaire) EpCAM+ progressif. Le traitement consiste en l'injection veineuse continue pendant au moins 28 jours de l'anticorps. L'objectif de cet essai est d'analyser les effets indésirables. La fin des inclusions est prévue pour Décembre 2013.

### 3.2.2 Associer un ciblage EpCAM à une autre cible, différente de CD3

Parmi les nouvelles classes d'anticorps thérapeutiques, certains ont un mécanisme d'action spécifiquement dirigé sur le système immunitaire, leur conférant un effet immuno-stimulateur. Il s'agit de l'ipilimumab (Yervoy, Bristol-Myers Squibb) traitement efficace du mélanome métastatique utilisé en monothérapie ou associé à la chimiothérapie (dacarbazine) (Hodi FS et al, 2010). L'ipilimumab bloque la molécule CTLA-4 présente à la surface des lymphocytes TReg, dont le rôle physiologique est de limiter l'activation du système immunitaire. Un autre anticorps monoclonal (MDX-1106) dirigé spécifiquement dirigé contre PD-1 (programmed death protein 1), un récepteur transmembranaire présent sur les lymphocytes T et ayant des fonctions immunosuppressives, est actuellement développé. En effet, il été constaté que PD-1 était surexprimé par les lymphocytes T activés contre les antigènes tumoraux (Kline J, Gajewski TF, 2010) chez les patients atteints de cancers (Gajewski TF et al, 2010 ; Ahmadzadeh M et al, 2009) et le blocage de PD-1 réactivait les fonctions cytotoxiques de ces lymphocytes CD8+ (Fourcade J et al, 2010). A côté de PD-1, d'autres molécules inhibitrices, telle que TIM3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3) sont surexprimées chez les patients atteints de cancer. Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui diminue la présentation antigénique aux lymphocytes CD8+ et par conséquent leur activation (Fourcade J et al, 2010). Ainsi, des anticorps ayant pour rôle de bloquer ces molécules inhibitrices ont été développés, et pourraient permettre de diminuer les dysfonctions lymphocytaires T induites par les cellules tumorales et de restaurer les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T. Ces immuno-stimulateurs sont capables d'inverser les phénomènes d'immuno-tolérance et d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. Par conséquent, une des voies de développement des anticorps anti-EpCAM pourrait reposer sur la synthèse d'un

anticorps bi-spécificique dirigé contre EpCAM et contre une molécule impliquée dans l'immunotolérance chez ces patients.

### **3.3 Essais thérapeutiques**

#### **3.3.1 Essais thérapeutiques actuels**

Actuellement, 14 essais thérapeutiques sur la catumaxomab intra-péritonéal sont enregistrés dans la base clinical trials.gov (*annexe1*). Cinq essais évaluent l'administration du catumaxomab IP chez des patients ayant une carcinose et une ascite réfractaire soit d'origine ovarienne (4 essais), soit d'origine gastrique (1 essai). Quatre essais s'adressent à des patients ayant une ascite EpCAM+ réfractaire. Quatre essais évaluent la tolérance après résection chirurgicale soit de carcinome ovarien de stade IIIb (1 essai), soit d'un adénocarcinome gastrique (2 essais, dont un ayant fait l'objet d'une présentation à l'ASCO en 2008, détaillé auparavant), soit d'une carcinose d'origine gastrique (essai IIPOP que nous allons détailler plus loin). Un seul essai thérapeutique sur l'injection systémique du catumaxomab est en cours (NCT01320020), ouvert depuis Mars 2011. Il s'agit d'un essai de phase I d'escalade de doses, s'adressant à des patients atteints d'un cancer épithélial EpCAM+, progressif. Le catumaxomab est injecté par voie veineuse, à un rythme de 1 fois par semaine, pendant 6 heures, à une dose débutante de 2 µg.

#### **3.3.2 Catumaxomab dans le traitement de la carcinose péritonéale d'origine gastrique : essai IIPOP (NCT01784900)**

Le cancer de l'estomac était en 2000 le deuxième cancer digestif en France avec 7000 nouveaux cas par an. Le pronostic est sombre, puisque la survie globale, fonction du stade de la tumeur est de 10 à 15% à 5 ans. Un des problèmes majeurs

du carcinome gastrique est son tropisme péritonéal, Ainsi, une carcinose péritonéale est présente au moment du diagnostic chez 5 à 20% des patients, et après traitement curatif, les récives sont locorégionales et/ou péritonéales dans plus de 50%. Les résultats de la chimiothérapie IP, à base d'agents « classiques » tels que la mitomycine C, l'oxaliplatine, et le 5FU, restent décevants, avec une survie globale à 5 ans de moins de 15% (*Glehen O et al, 2010*). Le développement d'autre traitement IP de la carcinose péritonéale d'origine gastrique est donc nécessaire.

Il existe des arguments forts pour évaluer ce traitement chez les patients présentant une carcinose gastrique: (1) la gravité du pronostic des patients malgré un traitement optimal à visée curative, y compris une chimiohyperthermie intrapéritonéale, (2) l'expression de l'antigène EpCAM dans près de 90% des adénocarcinomes gastriques (*Went P et al, 2006*), (3) l'absence d'expression de l'antigène EpCAM par les cellules mésenchymateuses péritonéales.

En raison de notre expérience dans le traitement chirurgical de la carcinose péritonéale qui représente une des principales activités du département de chirurgie oncologique (plus de 700 patients opérés), nous allons coordonner un essai clinique de phase 2 randomisé, financé par un PHRC : « Traitement des Carcinoses Péritonéales d'origine Gastrique par l'association exérèse chirurgicale complète des lésions et immunothérapie intrapéritonéale utilisant le Catumaxomab ».

Le but de cet essai de phase 2 est d'étudier la tolérance clinique (morbimortalité à 30 jours) de ce traitement et d'analyser les taux de récive péritonéale et de survie globale et sans récive. Les patients recevront du catumaxomab en intra-péritonéal après résection complète des lésions tumorales intra-abdominales sur une période de 6 jours. Le concept original de cet essai est de

réaliser un traitement combinant tout d'abord la chirurgie qui traite la maladie visible (macroscopique), puis l'immunothérapie intra-péritonéale qui traite la maladie restante invisible (microscopique). Le traitement sera administré sans hyperthermie qui dénaturerait le catumaxomab, à doses croissantes pour limiter les réactions inflammatoires systémiques. Il sera réalisé un bain péritonéal continu pendant 6 jours en postopératoire avec 3 injections de catumaxomab toutes les 48h à doses croissantes. Quarante patients seront inclus dans l'essai clinique de phase 2. Pour chaque patient, les liquides péritonéaux seront prélevés à 5 temps différents (juste après l'incision cutanée, après l'exérèse complète de la maladie et 3 prélèvements durant le traitement IP). Sur ces liquides péritonéaux, nous analyserons la mort cellulaire induite par le catumaxomab (marquage AnnexinV/7AAD), et les effecteurs de l'immunité cellulaire (qualification et quantification des cellules lymphocytaires T, NK, macrophages et cellules dendritiques) par cytométrie de flux. Un profil des cytokines dans le surnageant sera déterminé par technique Multiplex.

En conclusion, le catumaxomab, anticorps dirigé contre l'antigène EpCAM et le CD3 des lymphocytes, pourvu d'un fragment Fc capable de se fixer aux cellules accessoires, permet de moduler l'environnement immunitaire dans les ascites néoplasiques, de convertir une inflammation chronique et immunosuppressive (Th2) en une inflammation aiguë et immunogène (Th1), et induit une activation des lymphocytes T cytotoxiques. En association à de l'oxaliplatine, il pourrait potentialiser les effets de mort cellulaire immunogène. Sa structure chimérique, murine, responsable du développement d'anticorps anti-murins, limite l'utilisation répétée, par voie systémique du catumaxomab. Par conséquent, son administration a été essentiellement développée dans le traitement de carcinose péritonéale EpCAM+,

sur une durée d'administration courte. De ce fait, l'administration intra-péritonéale, en traitement adjuvant, après résection d'une carcinose péritonéale, pourrait représenter une indication « idéale » du catumaxomab, et va faire l'objet d'un essai thérapeutique randomisé de phase II, après résection de carcinose d'origine gastrique. Cette étude permettra de confirmer les modes d'action du catumaxomab et d'évaluer l'effet anti-tumoral sur la survie sans récurrences des patients.

#### 4 Références

- Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009; 114:1537-1544.
- Amann M, Brischwein K, Lutterbuese P, et al. Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3. *Cancer Res* 2008; 68:143–51.
- Andre F, Berrada N, Desmedt C. Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:547–551.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220:47-59.
- Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11:22–30.
- Baeuerle PA, Reinhardt C, Kufer P. BiTE: A new class of antibodies that recruit T cells. *Drugs Future* 2008; 33:137-147.
- Banchereau J, Steiman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 2008; 321:974–977.
- Barnaba TV, Watts C, de Boer M, et al. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24:71-75.

- Becker Y. CpG ODN treatments of HIV-1-infected patients may cause the decline of transmission in high risk populations – a review, hypothesis and implications. *Virus Genes* 2005; 30:251-266.
- Bedard K, Szabo E, Michalak M, et al. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* 2005; 245:191-121.
- Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; 27:1122-1129.
- Bird RE, Walker BW. Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol* 1991; 9:132-137.
- Blankenstein, T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17:180–186.
- Bogen B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ Tcells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol* 1996; 26:2671-2679.
- Brischwein K, Parr L, Pflanz S, et al. Strictly target celldependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class. *J Immunother* 2007; 30:798–807.
- Brischwein K, Schlereth B, Guller B, et al. MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 2006; 43:1129-1143.
- Broche F, Tellado JM: Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7:105–116.

- Burger RA, Sill MW, Monk BJ, et al. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5165–5171.
- Burger RA. Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:2902–2908.
- Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1-27.
- Campoli M, Ferrone S. Immunotherapy of malignant disease: the coming age of therapeutic monoclonal antibodies. In: DeVita V, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009:21-18.
- Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5180–5186.
- Cao Y, Tan A, Gao F, et al. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing chemotherapy plus bevacizumab with chemotherapy alone in metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:677–685.
- Casares N. et al., *J. Exp. Med.* 202, 1691 (2005).
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; 202:1691-1701.
- Casazza JP, Betts MR, Price DA, et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med.* 2006; 203:2865-2877.
- Wim P Ceelen, Marc E Bracke. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* 2009; 10: 72–79.

- Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Jr. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Rev. Cancer* 2005; 5:65–72.
- Chelius D, Ruf P, Gruber P, et al. Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab MAbs 2010; 2:309-319.
- Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010 ;10:826-837.
- Chen JG, Xia JC, Liang XT, et al. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci* 2011; 7:53–60.
- Chen X, Wan J, Liu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010; 69:348–354.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013; 368:651-662.
- Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, et al. Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012; 30:2449-2456.
- Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 2004; 118:671-674.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-867.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-949.
- Dalerba P, MacCalli C, Casati C, et al. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46:33-57.

- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204:1257–1265.
- Decker D, Tolba R, Springer W, et al. Abdominal surgical interventions: local and systemic consequences for the immune system—a prospective study on elective gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 2005; 126:12–18.
- De Monte L, Reni M, Tassi E, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 2011; 208:469–478.
- DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011; 1:54-67.
- Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:105–113.
- Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5158–5165.
- Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res.* 2010; 70:7465-4675.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-998.

- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-360.
- Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, et al. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* 2009; 27:681-685.
- Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibodybased immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol*. 2010;28:4390-4399.
- Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 2010 ; 207, 2175–2186.
- Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23 Suppl 8:viii6-9
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298–306.
- Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, et al. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:215-233.
- Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. *Cancer J* 2010; 16:399–403.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960–1964.
- Galon J, Fridman WH, Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res* 2007; 67:1883–1886.

- Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25:2586-2593.
- Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65:671–680.
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15:1170-1178.
- Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3702-3709.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Koutsopoulos A, et al. High Beclin 1 expression defines a poor prognosis in endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 2011; 123:147-151.
- Glehen O, Gilly F, Arvieux C, et al. Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:2370-2377.
- Glik A, Douvdevani A. T lymphocytes: the "cellular" arm of acquired immunity in the peritoneum. *Perit Dial Int.* 2006; 26:438-448.
- Goel S, Duda DG, Xu L, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011; 91:1071-1121.

- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118:285-296.
- Groth A, Salnikov AV, Ottinger S, et al. New gene-immunotherapy combining TRAIL-lymphocytes and EpCAMxCD3 Bispecific antibody for tumor targeting. *Clin Cancer Res* 2012;18:1028-1038.
- Halama N, Michel S, Kloor M, 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 Res* 2011; 71:5670–5677.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
- Hamilton CA, Maxwell GL, Chernofsky MR, et al. Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 111:530–532.
- Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010; 127:.2209-2221.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363:711–723.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2335–2342.
- Hwang WY, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005; 36:3-10.

- Imaizumi T, Aoyagi K, Miyagi M, et al. Suppressive effect of bevacizumab on peritoneal dissemination from gastric cancer in a peritoneal metastasis model. *Surg Today* 2010; 40:851–857.
- Iwamoto T, Bianchini G, Booser D, et al. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:264–272.
- Jäger M, Schoberth A, Ruf P, Hess J, Hennig M, Schmalfeldt B, et al. Immunomonitoring results of a phase II/III study of malignant ascites patients treated with the trifunctional antibody CatmAb (anti-EpCAM x anti-CD3). *Cancer Res.* 2012; 72:24-32.
- Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7:987-989.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, et al. Replacing the complementaritydetermining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986 ; 321:522-525.
- Keating, G. M. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, lowgrade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs* 2010; 70: 1445-1476.
- Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, et al. The immunogenicity of tumor cell death. *Current Opinion in Oncology* 2009;21:71-76.
- Kim MS, Song SY, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. *APMIS* 2011; 119:802-807.
- Kline J. & Gajewski T. F. Clinical development of mAbs to block the PD1 pathway as an immunotherapy for cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2010; 11:1354–1359.

- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, et al. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5 $\alpha$ -adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 2006; 177:6780–6786.
- Kobold S, Hegewisch-Becker S, Oechsle K, et al. Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist* 2009; 14:1242–1251.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *Br J Cancer* 2010; 103:1209-1214.
- Kotanagi H, Saito Y, Yoshioka T, et al. Characteristics of two cancer cells lines derived from metastasis foci in liver and peritoneum of a patient with colon cancer. *J Gastroenterology* 1998; 33:842-849.
- Koyama T, Yashiro M, Inoue T, et al. TGF $\beta$  1 secreted by gastric fibroblasts up-regulates CD44H expression and stimulates the peritoneal metastatic ability of scirrhous gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2000;16:355-362.
- Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2007 15; 67:8900-8905.
- Krueger CM, Berdov BA, Romain LA, et al. Intraoperative, adjuvant treatment of gastric cancer with the trifunctional antibody catumaxomab compared to surgery alone: A phase II study *J ClinOncol* 2008Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 15529.
- Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med.* 2006; 203:871-881

- Kubicka U, Olszewski WL, Tarnowski W, et al. Normal human immune peritoneal cells: Subpopulations and functional characteristics. *Scand J Immunol* 1996; 44:157-163.
- Laane E, Tamm KP, Buentke E, et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ* 2009; 16:1018-1029.
- Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2413-2420.
- Ladoire S, Chaba K, Martins I, et al. Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy* 2012; 8:1175-1184.
- Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2413–2420.
- Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol* 2011; 224:389–400.
- Lake RA, van der Most RG. A better way for a cancer cell to die. *N Engl J Med* 2006; 354:2503-2504.
- Lee PP, Savage PA, Fong L, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 1999; 5:677-685.

- Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:449-459.
- Lesterhuis WJ, Punt CJ, Hato SV, et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest* 2011 ; 121 :3100–3108.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27-42.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402:672-676.
- Liu WM, Fowler DW, Smith P, et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br. J. Cancer* 2010; 102:115–123.
- Liu J, Duan Y, Cheng X, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem. Biophys Res Commun* 2011; 407:348–354.
- Loercher AE, Nash MA, Kavanagh JJ, et al. Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *J Immunol.* 1999; 163:6251-6560.
- Lyman MA, Aung S, Biggs JA, et al. A spontaneously arising pancreatic tumor does not promote the differentiation of naive CD8+ T lymphocytes into effector CTL. *J Immunol* 2004; 172:6558-6567.

- Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Biol Chem* 2010; 285:7176-7186.
- Manzur M, Hamzah J, Ganss R Modulation of the "blood-tumor" barrier improves immunotherapy. *Cell Cycle* 2008; 7:2452-5
- Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:954602.
- Marmessier E, Sylvain A, Thibult ML, et al. Human breast cancer cells tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011; 121,3609-3622.
- Medrek C, Pontén F, Jirström K, et al The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; 12:306.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295–298.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1:135–145.
- Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am J Pathol* 1998; 153:1249-1256.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al.. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science.* 2011; 334:1573-7.
- Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:957-964.

- Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 2006;214:219-228.
- Motohashi S, Okamoto Y, Yoshino I, et al. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Immunol* 2011; 140:167-176.
- Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 2010; 70:5728-5739.
- Mundy-Bosse BL, Lesinski GB, Jaime-Ramirez AC, et al. Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 2011; 71:5101–5110.
- Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:1789-1796.
- Mussai F, De Santo C, Cerundolo V. Interaction between invariant NKT cells and myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: evidence and therapeutic opportunities. *J Immunother* 2012; 35:449-459.
- Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, et al. Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* 1999; 163:1958-1965.
- Ninomiya S, Inomata M, Tajima M, et al. Effect of bevacizumab, a humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor, on peritoneal metastasis of MNK-45P human gastric cancer in mice. *J Surg Res* 2009; 154:196–202.

- Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, et al. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J. Immunol* 2003; 170:4905–4913.
- Nowak, A. K., Robinson, B. W. & Lake, R. A. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res.*2003; 63:4490–4496.
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2006; 13:54-61.
- Onrust SV, Hartl PM, Rosen SD, et al. Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996; 97:54-64
- Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18:11-8.
- Ott MG, Marmé F, Moldenhauer G, Lindhofer H, Hennig M, Spannagl R, et al. Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int J Cancer.* 2012; 130:2195-203.
- Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5944–5951.
- Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review *Cancer Treatment Reviews* 2012; 38:68-75.

- Pedroza-Gonzalez A, Xu K, Wu TC, et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. *J Exp Med* 2011; 208 :479–490.
- Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 2006; 107:2866-2872.
- Petrelli F, Borgonovo K, Lonati V, Elia S, Barni S. Regression of liver metastases after treatment with intraperitoneal catumaxomab for malignant ascites due to breast cancer. *Target Oncol.* 2012 Nov 30. [Epub ahead of print]
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NFkappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461-466.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71-78.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141:39-51.
- Qu Z Zhengxing Qu, Gary L. GriYths, William A. Wegener, et al. Development of humanized antibodies as cancer therapeutics. *Methods* 2005; 36:84-95.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu.Rev Immunol* 2007; 25:267-296.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90:1383-435.
- Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res* 2009; 69:5383-5391.

- Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1535- 1544.
- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:709-730.
- Ruf P, Kluge M, Jäger M, et al. Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69:617-625.
- Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, et al. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21:3-10.
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, et al . Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996; 5:103-114.
- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokines production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999; 29:1617-1625.
- Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18 :593-620.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:18538-18543.
- Schlereth B, Fichtner I, Lorenczewski G, et al. Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice

- by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Res* 2005; 65:2882–2889.
- Schlereth B, Kleindienst P, Fichtner I, et al. Potent inhibition of local and disseminated tumor growth in immunocompetent mouse models by a bispecific antibody construct specific for murine CD3. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:785–796
  - Schreck S, Friebel D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2009; 27:31-39.
  - Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, et al. Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central memory T cells by partial targeting of the IL-2 receptor signaling pathway: the key role of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2012; 188:5189-5198.
  - Selzner N, Selzner M, Graf R, et al. Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding. *Cell Death Differ* 2004; 11:172-180.
  - Selzner N, Selzner M, Graf R, et al. Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding. *Cell Death Differ* 2004; 11:172-180.
  - Senovilla L, Vitale I, Martins I, et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science*. 2012; 337:1678-1684.
  - Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 2012; 1:1323-1343.
  - Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2:293-299.

- Song L, Asgharzadeh S, Salo J, et al. Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* 2009; 119:1524- 1536.
- Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:790–800.
- Spizzo G, Fong D, Wurm M, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* 2011;64:415-20.
- Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:645-657;
- Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314:628–631.
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*1998; 95: 1178-1183.
- Ströhlein MA, Siegel R, Jäger M, Lindhofer H, Jauch KW, Heiss MM. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28:18-28.
- Stover DG, Bierie B, Moses HL. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 2007; 101:851-861.
- Taams LS, van Eden W, Wauben MH. Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell–APC interactions. *Eur J Immunol* 1999; 29:1543-1550.
- Topp M, Goekbuget N, Kufer P, et al. Treatment with anti-CD19 BiTE antibody blinatumomab (MT103/ MEDI-538) is able to eliminate minimal residual disease

- (MRD) in patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL): First results of ongoing phase 2 study [ASH Annual Meeting Abstract]. *Blood* 2008;112:1926.
- Vincent, J. et al. 5-fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010; 70:3052–3061.
  - Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; 331:44-49.
  - Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; 331:44-49.
  - Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA et al. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res* 2002; 62:3581-3586.
  - Wang RC, Wei Y, An Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012; 338:956-959.
  - Went P, Vasei M, Bubendorf L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 2006; 94:128-135.
  - Wertel I, Nowicka A, Rogala E, Kotarski J. Peritoneal immune system in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Int Rev Immunol.* 2011; 30:87-101.
  - Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10:145-147.
  - Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005; 437:141-146.

- Wimberger P, Gilet H, Gonschior AK, Heiss MM, Moehler M, Oskay-Oezcelik G, et al. Deterioration in quality of life (QoL) in patients with malignant ascites: results from a phase II/III study comparing paracentesis plus catumaxomab with paracentesis alone. *Ann Oncol*. 2012; 23:1979-85.
- Woopen H, Pietzner K, Darb-Esfahani S, et al. Extraperitoneal response to intraperitoneal immunotherapy with catumaxomab in a patient with cutaneous lymphangiosis carcinomatosa from ovarian cancer: a case report and review of the literature. *Med Oncol* 2012; 29:3416-20.
- Yagi Y, Fushida S, Harada S, et al. Biodistribution of humanized anti-VEGF monoclonal antibody/bevacizumab on peritoneal metastatic models with subcutaneous xenograft of gastric cancer in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 66:745–753.
- Yamasaki K, Horiguchi S, Kurosaki M, et al. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin Immunol* 2011; 138:255-65.
- Yan TD, Deraco M, Baratti D, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: multi-institutional experience. *J Clin Oncol* 2009; 27:6237-6242.
- Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, et al. Activation simultanée des lymphocytes T et des cellules accessoires par une nouvelle classe d'anticorps bispécifique intact résultats dans la destruction des cellules tumorales efficaces *J Immunol* 1999; 163:1246-1252.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:203-213.

- Zhang J, Yan J, Xu J et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50:980–989.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev Immunol* 2008; 8:59–73.
- Zitvogel L, Casares N, Pequignot MO, et al. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 2004; 84:131-179.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-727.
- Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother* 2004; 38:1258–1264.
- Zorn E. & Hercend T. A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *Eur. J Immunol* 1999; 29:592-601.

## **5 Annexes**

Annexe 1 – Essais thérapeutiques en cours sur la catumaxomab – Base Clinical Trials.

## Annexe 1 Essais thérapeutiques en cours sur la catumaxomab – Base Clinical Trials.

Rank	Status	Study
1	Active, not recruiting	<p><a href="#">Phase II Study With Catumaxomab in Patients With Gastric Cancer After Neoadjuvant CTx and Curative Resection</a></p> <p><b>Conditions:</b> Gastric Cancer; Gastric Adenocarcinoma</p> <p><b>Interventions:</b> Drug: Catumaxomab; Drug: catumaxomab</p>
2	Recruiting	<p><a href="#">Feasibility and Clinical Activity of Initial Intraperitoneal Catumaxomab Followed by Chemotherapy in Patients With Recurrent Ovarian Cancer</a></p> <p><b>Condition:</b> Recurrent Epithelial Ovarian Cancer</p> <p><b>Intervention:</b> Drug: Catumaxomab</p>
3	Recruiting	<p><a href="#">Catumaxomab for Treatment of Peritoneal Carcinomatosis in Patients With Gastric Adenocarcinomas</a></p> <p><b>Conditions:</b> Gastric Adenocarcinoma With Peritoneal Carcinomatosis; Siewert Type II Adenocarcinoma of Esophagogastric Junction With Peritoneal Carcinomatosis; Siewert Type III Adenocarcinoma of Esophagogastric Junction With Peritoneal Carcinomatosis</p> <p><b>Interventions:</b> Drug: catumaxomab, Fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, docetaxel; Drug: Fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, docetaxel</p>
4	Completed Has Results	<p><a href="#">Safety and Efficacy Study of Catumaxomab to Treat Ovarian Cancer After a Complete Response to Chemotherapy</a></p> <p><b>Condition:</b> Ovarian Cancer</p> <p><b>Intervention:</b> Drug: catumaxomab</p>
5	Completed	<p><a href="#">Safety Study of Second Intraperitoneal (I.P.) Infusion Cycle of Catumaxomab in Patients With Malignant Ascites</a></p> <p><b>Condition:</b> Malignant Ascites Due to Epithelial Carcinoma</p> <p><b>Intervention:</b> Drug: catumaxomab</p>
6	Completed	<p><a href="#">CASIMAS: Catumaxomab Safety Phase IIIb Study With Intraperitoneal Infusion in Patients With Malignant Ascites Due to Epithelial Cancers</a></p> <p><b>Conditions:</b> Cancer; Neoplasms; Carcinoma; Malignant Ascites</p>

**Interventions:** Drug: Catumaxomab; Drug: Prednisolone

- 7 **Recruiting** [Catumaxomab as a Consolidation Therapy in Patients With Ovarian Cancer in Second or Third Clinical Disease Remission](#)  
**Condition:** Ovarian Cancer  
**Intervention:** Drug: Catumaxomab
- 8 **Completed** [Study of the Trifunctional Antibody Catumaxomab to Treat Recurrent Symptomatic Malignant Ascites](#)  
Has Results  
**Condition:** Malignant Ascites  
**Intervention:** Drug: catumaxomab
- 9 **Recruiting** [A Open Label, Dose Escalating Study to Evaluate the Safety and Tolerability of Ascending Intravenous \(i.v.\) Doses of Catumaxomab in Epithelial Cancer Patients](#)  
**Condition:** Epithelial Cancer Patients  
**Intervention:** Drug: catumaxomab
- 10 **Completed** [Phase II Study of the Trifunctional Antibody Catumaxomab Administered Intra- and Postoperatively in Patients With Ovarian Cancer](#)  
**Conditions:** Ovarian Cancer; Epithelial Ovarian Cancer  
**Intervention:** Drug: Catumaxomab
- 11 **Completed** [Study in EpCAM Positive Patients With Symptomatic Malignant Ascites Using Removab Versus an Untreated Control Group](#)  
**Conditions:** EpCam Positive Tumor (e.g.Ovarian, Gastric, Colon, Breast); Malignant Ascites  
**Interventions:** Biological: Catumaxomab (Removab); Procedure: paracentesis
- 12 **Recruiting** [Treatment of Gastric Peritoneal Carcinomatosis by Association of Complete Surgical Resection of the Lesions and Intraperitoneal Immunotherapy Using Catumaxomab](#)  
**Condition:** Patients With Gastric Peritoneal Carcinomatosis  
**Interventions:** Drug: Catumaxomab 100µg; Drug: Catumaxomab 140µg
- 13 **Completed** [Safety and Efficacy Study With Catumaxomab in Patients After Curative Resection of a Gastric Adenocarcinoma](#)  
**Conditions:** Gastric Cancer; Gastric Adenocarcinoma  
**Intervention:** Drug: catumaxomab
- 14 **Completed** [Randomized, Multicenter, 2-Dose Level, Open-Label, Phase IIa Study With the Intraperitoneally Infused Trifunctional Bispecific Antibody Removab\(TM\) \(Anti-EpCAM x](#)

[Anti-CD3\) to Select the Better Dose Level in Platinum Refractory Epithelial Ovarian Cancer Patients](#)

**Conditions:** Ovarian Cancer; Fallopian Tube Neoplasms; Peritoneal Neoplasms

**Intervention:** Biological: anti-EpCAM x anti-CD3 (removab)

15 **Recruiting** [Bevacizumab as a Palliative Treatment for Patients With Symptomatic Malignant Ascites Due to Advanced-stage Gastrointestinal Cancers](#)

**Conditions:** Malignant Ascites; Gastrointestinal Cancers

**Interventions:** Drug: Bevacizumab; Other: Placebo

## **6 Communications et Publications**

- Ce travail a été présenté en communication affichée au congrès de l'ESMO en 2012 à Vienne (Autriche).
- Un article original issu de ce travail est en cours de publication dans le journal Cancer Research.
- Un article original sur l'essai thérapeutique IIPOP est en cours de soumission au journal BMC Cancer.

# Contribution of immunogenic cell death (ICD) to the anti-tumor activity of catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3)

Diane Goéré<sup>1,4</sup>, Caroline Flament<sup>1,5</sup>, Sylvie Rusakiewicz<sup>1</sup>, Vichnou Poirier-Colame<sup>1</sup>, Julien Pesquet<sup>1</sup>, Alexander Eggermont<sup>2</sup>, Dominique Elias<sup>3</sup>, Nathalie Chaput<sup>1,2,5</sup>, Laurence Zitvogel<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1151, <sup>2</sup>Centre d'Investigation Clinique Biologie, COIC 507, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, <sup>3</sup>Université Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, <sup>4</sup>Département de Chirurgie, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

N°495P

## Introduction

Catumaxomab is a trifunctional antibody targeting EpCAM on tumor cells, CD3 on T lymphocytes and binding to FcγR positive accessory cells thereby leading to the elimination of EpCAM+ tumor cells by different immune-mediated mechanisms<sup>1,2</sup>.

It has been reported that tumor cell death triggered by some immunogenic compounds or drugs used in the oncological armamentarium participates in the long term protection of patients treated with chemotherapy<sup>3</sup>. The present nonclinical study investigated whether catumaxomab promotes immunogenic cell death (ICD) mechanisms which may contribute to its mode of action and its pharmacological activity in vivo.

## Material & Methods

Either co-cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers (n=5) and EpCAM+ tumor cells (SKBR3) (allogeneic system) or ascites cells from patients with malignant ascites (autologous system) were incubated in the presence of catumaxomab (CatmAb) at a concentration of 10 ng/mL for 18-48 hours. Ascites fluids harvested from 12 patients bearing EpCAM+/- cancers were used.

Analysis of T cell activation and measurement of cytokine release in cell culture supernatants was performed. Subsequent analyses included investigation of cell death of EpCAM+ tumor cells and evaluation of ICD parameters (calreticulin, HMGB1, ATP).

### References

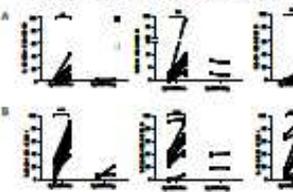
- Jäger M, et al. Cancer Res. 2012;72:24-32.
- Sebastian M. Cancer Manag Res. 2010;2:283-8.
- Zitvogel L, et al. Cell. 2010;140:798-804.

## Results

### CD4+ and CD8+ T cells

Both CD4+ and CD8+ T cells could degranulate (expressed CD107a) in the presence of CatmAb, only in EpCAM+ ascites (Fig. 1A, Fig. 2A, left panels). Both CD4+ and CD8+ T cells secreted IFNγ in the presence of CatmAb, only in EpCAM+ ascites (Fig. 1A, Fig. 2A, middle panels). CatmAb failed to significantly stimulate T cells to produce IL-17, then to trigger Th17 cells (Fig. 1A, Fig. 2A, right panels). All T cells exhibited activation markers such as CD69, HLA-DR and PD-1 upon recognition of EpCAM+ tumors (Fig. 1B, 2B) but failed to express TRAIL (Fig. 2C).

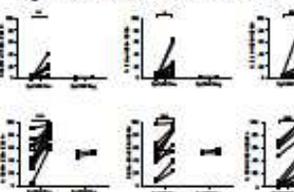
### Figure 1 - CD3+CD4+ T cell activation



Flow cytometry analyses of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cells gated to the CD45+ fraction of tumor infiltrating lymphocytes of various malignant ascites samples (n=12) incubated without [□] or with [■] CatmAb (10 ng/mL) for 18 h.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001  
ns = not significant

### Figure 2 - CD3+CD8+ T cell activation



Flow cytometry analyses of CD3+CD8+ T cells gated to the CD45+ fraction of tumor infiltrating lymphocytes of various malignant ascites samples (n=12) incubated without [□] or with [■] CatmAb (10 ng/mL) for 18 h.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001  
ns = not significant

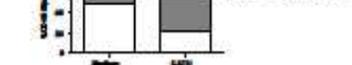
### Tumor cell death fingerprint post-Catumaxomab

The bispecific mAb increased the fraction of dying and dead cells (Fig. 4A) and promoted the release of ATP in the milieu (Fig. 4C, right panel) but failed to induce the exposure of calreticulin (CRT) or the release of HMGB1 in the extracellular environment (Fig. 4B, left and middle panels), in incubated ascites (n=7).

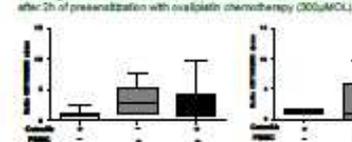
Pre-incubation of tumor cells (SKBR3) with oxaliplatin did not increase cell death by CatmAb (Fig. 4C) but mediated stress and increased CRT exposure (Fig. 4C, left panel), HMGB1 (Fig. 4C, middle panel) and ATP release (Fig. 4C, right panel) in the presence of CatmAb.

### Figure 4

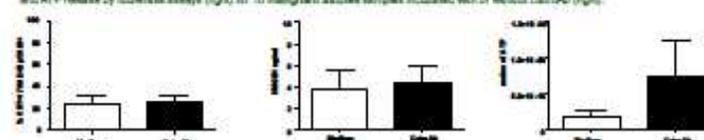
A - Flow cytometry determination of living, apoptotic, dead or necrotic cells in the gate CD45+ EpCAM+ featuring tumor cells of the ascites fluids (n=7).



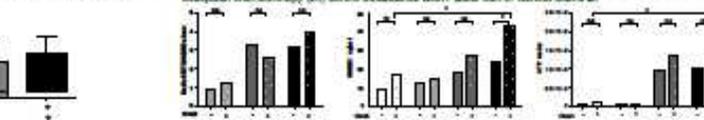
B - Allogeneic induced PBMC tumor ex vivo cocultures with or without CatmAb for 18h (left panels) and after 2h of preincubation with oxaliplatin chemotherapy (OXAL/PLAT), before cocultures (right panels).



C - Monitoring of CRT exposure by direct flow cytometry gating on living tumor cells (left), of HMGB1 release by commercial ELISA (middle) and ATP release by luciferase assays (right) for 10 malignant ascites samples incubated with or without CatmAb (right).



D - Flow cytometry analyses of CRT exposure (left panels), ELISA assessment of HMGB1 secretion (middle panels), ATP release monitored by luciferase assays (right panels), with or without preincubation with oxaliplatin chemotherapy (OX) before cocultures with PBMC with or without CatmAb.



## Conclusion

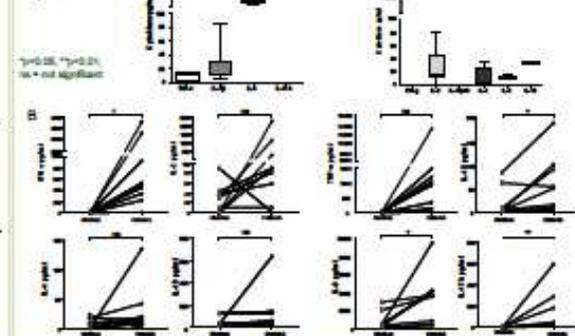
In the presence of EpCAM+ tumor target, CatmAb markedly enhanced T cell activation (CD69, CD107A, HLA-DR and PD-1 expression), stimulated inflammatory CD4+Th1 and CD8+ Th1 to release IFNγ but failed to trigger Th17 cells. CatmAb promoted tumor cell death associated with ATP release and strongly synergized with oxaliplatin (but not 5 fluorouracil (not shown)) by promoting immunogenic cell death mechanisms (calreticulin, HMGB1 and ATP). These findings warrant validation as potential biomarkers for efficacy of CatmAb.

### Cytokines

CatmAb-mediated T cell activation resulted in dramatic changes of the cytokine milieu suggesting the Th1/Th2 cytokine ratio and promoting local inflammation (rise in IL-1β, IL-6, TNFα, IL-17A release in supernatants). Hence, CatmAb could skew the natural Th2 (Fig. 3A) cytokine pattern of malignant ascites towards a Th1 inflammatory milieu (Fig. 3B).

Direct assessment of cytokine concentrations after fresh harvesting prior to incubation with CatmAb of malignant ascites fluids (n=12) (Fig. 3A) and after incubation for 18h in CatmAb (Fig. 3B).

### Figure 3 - Cytokines



\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001  
ns = not significant

## **Potent immunomodulatory effects of the trifunctional antibody catumaxomab**

Diane Goéré<sup>1,4\*</sup>, Caroline Flament<sup>1,2\*</sup>, Sylvie Rusakiewicz<sup>1</sup>, Vichnou Poirier-Colame<sup>1</sup>, Isabelle Martins<sup>6</sup>, Oliver Kepp<sup>3,6</sup>, Julien Pesquet<sup>1</sup>, Alexander Eggermont<sup>3</sup>, Dominique Elias<sup>4</sup>, Nathalie Chaput<sup>1,2,3\*</sup>, Laurence Zitvogel<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1015, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>2</sup> Centre d'Investigation Clinique Biothérapie CICBT 507, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>3</sup> Université Paris-Sud, Kremlin Bicêtre France

<sup>4</sup> Département de Chirurgie, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>5</sup> Unité de Thérapie Cellulaire, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>6</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U848, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

\*Co-first and co-last authors have equally contributed to this work

### **Corresponding author:**

Pr. Laurence Zitvogel

Institut Gustave Roussy

114 rue Edouard Vaillant

94805 VILLEJUIF Cedex, France

E-mail : zitvogel@igr.fr

Phone : +33 1 42 11 50 41

Fax : +33 1 42 11 60 94

**RUNNING TITLE :** Immunomodulatory effects of catumaxomab

**KEYWORDS:** catumaxomab, immunogenic cell death, ADCC, T cells, cancer.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was supported by Frésenius; Institut National du Cancer (INCa), la Ligue contre le cancer (LIGUE labellisée, Zitvogel L.), l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); Fondation pour la Recherche Médicale (SA's fellowship), and Fondation de France (VPC's salary).

**Author contributions:**

D.G, C.F. performed the in vitro experiments.

J.P, V.P.C. contributed to the in vitro experiments.

D.G, C.F, N.C, S.R conducted data analysis.

M.G.O, D.S, L.Z, N.C, D.E, conceived the study.

L.Z, D.G, C.F, N.C, D.S wrote the manuscript.

I.M, O.K ran the CRT experiments

A.E, supervised the work

**Words count:**

Abstract : 187 words

Manuscript text : 3159 words

Number of table and figures : 7

Number of references : 41

**ABBREVIATIONS :**

CatmAb : catumaxomab

EpCAM : epithelial cell adhesion molecule

TILs : ascites- infiltrating lymphocyte

CTL : cytotoxic T lymphocyte

HMGB1 : High mobility group 1 protein

ATP :adenosine triphosphate

CRT : calreticulin

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

IFN $\gamma$  : interferon gamma

PBMC : peripheral blood mononuclear cells

MA : malignant ascites

TNF : tumor necrosis factor

CDAM : cell death -associated molecular pattern

ER : endoplasmic reticulum

## **Precis**

This study reports a comprehensive dissection is of the immunomodulatory effects of a bispecific mAb specific for a widely expressed tumor cell adhesion molecule and the T cell molecule CD3, which is one of the first bispecific mAbs to be explored in clinic.

## Abstract

Catumaxomab (CatmAb), a trifunctional bispecific antibody directed against the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and the T cell antigen CD3, is approved as intraperitoneal therapy for the treatment of malignant ascites in patients with EpCAM positive carcinomas. The immunomonitoring results of a Phase II/III study using CatmAb reported tumoricidal effect, associated with reduced VEGF levels, CD69 expressing T cells and the release of Th1 cytokines (1). Here, we comprehensively dissected the immunomodulatory effects of the CatmAb on the major subsets of malignant ascites- infiltrating leukocytes (TILs) and the molecular fingerprint of tumor cell death. We show that in the presence of EpCAM-positive tumor targets CatmAb markedly enhanced T cell activation (CD69, CD107A (LAMP1), HLA-DR and PD-1(PDCD1) expression), stimulated inflammatory CD4<sup>+</sup>Th1 and CD8<sup>+</sup> Th1 to release IFN $\gamma$  but failed to trigger Th17 cells. Engagement of CD16-expressing cells caused upregulation of TRAIL (TNFSF10) and costimulatory CD40 and CD80 molecules. CatmAb promoted tumor cell death associated with ATP release and strongly synergized with oxaliplatin for the exposure of the three hallmarks of immunogenic cell death (calreticulin, HMGB1 and ATP). These findings warrant validation as potential biomarkers of efficacy of CatmAb.

## Introduction

The trifunctional bispecific monoclonal antibody CatmAb has two binding specificities directed at EpCAM (through a mouse IgG2a) and CD3 (through a rat IgG2b). With its Fc portion, the antibody has the potential to engage accessory cells (through Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIII) such as neutrophils, NK cells, macrophages, monocytes and dendritic cells (2). This therapeutic strategy is expected to promote an MHC-unrestricted pattern of killing, targeting EpCAM positive tumor cells (most tumours of gastrointestinal origin and in some carcinomas of the genitourinary tract, i.e about 90% of ascites-causing carcinoma (3,4)) sparing EpCAM negative mesothelial cells of the peritoneal cavity. In vitro studies showed that cytokine release, perforin-dependent killing, antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) and activation of accessory cells all acted in concert to eliminate tumor cells (5-7). EpCAM<sup>+</sup> tumors have a worse prognosis than their negative counterparts, specifically in triple negative and node negative breast cancers (8,9). In tumor spheroids, CatmAb (alone or together with cisplatin) exerted regressions of tumor volumes associated with massive immune infiltration in an ADCC-dependent manner (10).

Pilot and Phase I/II studies showed that intraperitoneal administration of CatmAb reduced tumor cell accumulation in ascites fluids in a sustained manner (11,12). Next, an open label, multicenter, randomized Phase II/III trial in patients with malignant ascites due to epithelial cancer compared the effects of CatmAb with control paracentesis. Puncture-free survival (primary endpoint of the trial) was significantly higher in the CatmAb compared with the control group (median 46 versus 11 days, HR: 0.25) (13). Overall survival in the pooled population showed a positive trend towards the CatmAb group with significant results in the subgroup of gastric cancers (13).

Treatment with CatmAb delayed the deterioration of quality of life in patients with malignant ascites (14). Moreover, ascites concentrations of VEGF and CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> cancer stem cells significantly dropped post-CatmAb while 20-30% of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquired CD69 expression (1).

Therefore, we undertook the comprehensive phenotypic analysis of the immune infiltrates and the tumor cell death fingerprint in ascites fluids incubated *ex vivo* with CatmAb. Our findings indicate that CatmAb skews the T cell cytokine pattern towards an inflammatory Th1 profile, turns on NK cells to express TRAIL and inflammatory monocytes to harbour costimulatory molecules. In addition, when combined with oxaliplatin, CatmAb imprinted an immunogenic cell death pathway to tumor cells.

## **Results**

### **CatmAb-mediated T cell triggering**

Ascites fluids harvested from 12 patients bearing EpCAM<sup>+/−</sup> cancers (Table 1) were freshly incubated with CatmAb for 18 hours. The percentages of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells among the CD45<sup>+</sup> fraction of ascites cells remained stable,  $35.8 \pm 25$  and  $40.3 \pm 19$  for CD4<sup>+</sup>T cells with or without CatmAb respectively (Fig. 1A),  $20.5 \pm 11$  and  $19.9 \pm 11$  for CD8<sup>+</sup>T cells with or without CATmAb respectively (Fig. 2A) in EpCAM<sup>+</sup> malignant ascites. Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells could degranulate (expressed CD107A) in the presence of CatmAb, only in EpCAM<sup>+</sup> ascites (Fig. 1B, Fig. 2B, left panels). Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells secreted IFN $\gamma$  in the presence of CatmAb, only in EpCAM<sup>+</sup> ascites (Fig. 1B, Fig. 2B, middle panels). CatmAb failed

to significantly stimulate T cells to produce IL-17 (Fig. 1B, Fig. 2B, right panels). All T cells exhibited activation markers such as CD69, HLA-DR and PD-1 upon recognition of EpCAM<sup>+</sup> tumors (Fig. 1C, 2C, 2D right panel) but failed to express TRAIL (Fig. 2D, left panel). It is noteworthy that similar findings and also the production of IL-17, could be obtained by coculturing EpCAM<sup>+/-</sup> tumor cell lines with peripheral blood mononuclear (PBMC) cells from healthy volunteers in the presence of CatmAb (Supplemental Fig. 1 and Fig. 2). CatmAb-induced T cell activation significantly increased the production of IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-6 and IL-1 $\beta$ , hence contributing to a modulation of the local microenvironment (Fig. 3A, 3B). CatmAb deviated the natural Th2 inflammation by decreasing the concentrations of IL-4 and IL-13 while augmenting the Th1 cytokines in most patients (Fig. 3C, left and right panels).

Malignant ascites contained up to 5% ( $8.25 \pm 5$ ) of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells among CD4<sup>+</sup>T cells (Fig. 4A), that could be analyzed according to CD45RA (15). Most of these Treg became Foxp3<sup>high</sup> CD45RA<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> after exposure to CatmAb (Fig. 4B, Fig. 4C).

CatmAb activated local T cells and geared their polarization towards an inflammatory Th1 pattern despite the presence of ectoATPase-expressing Treg.

### **Engagement of CD16 expressing cells in malignant ascites incubated with CatmAb**

NK cells were not enriched post-CatmAb (Fig. 5A, left panel). Most NK cells from ascites TILs were CD16<sup>+</sup> at harvesting but CatmAb did not significantly reduce CD16 expression on NK cells (Fig. 5A, right panel). However, NK cells were markedly activated by CatmAb as shown by their upregulated levels of CD69 and TRAIL expression (Fig. 5B left and middle panels and, to a lesser extent NKp44 expression, right panel) only in EpCAM<sup>+</sup> ascites. Similar findings were

achieved in cocultures of PBMC and allogeneic EpCAM<sup>+</sup> tumor cells modulated by CatmAb (Supplemental Fig. 3) in that NK cells became CD69<sup>+</sup> TRAIL<sup>+</sup> while expressing low levels of CD107A and IFN $\gamma$  in the presence of the trifunctional Ab.

Most monocytes, albeit underrepresented in TILs (Fig. 5C, left panel), also expressed CD16 molecules (Fig. 5C, right panel) which, upon engagement with CatmAb, decreased to some extent (Fig. 5C, right panel). CatmAb markedly increased CD80 and CD40 molecules on CD14<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup> TIL monocytes (Fig. 5D, left and right panels) while maintaining HLA-DR expression (Fig. 5D, middle panel).

Hence, CatmAb induced TRAIL expression on NK cells and costimulatory molecules on inflammatory monocytes.

### **Tumor cell death fingerprint post-CatmAb**

Immunogenic cell death can be defined as a modality of cell demise associated with T cell-dependent tumor rejection and long term survival, and correlated with the exposure or release of cell death -associated molecular (CDAM) patterns (16). Briefly, stress before death matters for an immunogenic cell death pathway to occur. First, an ER stress response culminating with calreticulin (CRT) exposure to the tumor cell surface (17), then late apoptosis associated with the exodus of the chromatin binding HMGB1 protein (18) and finally, activation of the autophagy machinery leading to ATP release (19) all contribute to the adequate phagocytosis, processing and antigen presentation of the dying tumor cells to T lymphocytes (20,21). Therefore, we addressed whether CatmAb-mediated tumor cells death could trigger an immunogenic cell death program. We analyzed by flow cytometry the expression of annexin V and 7AAD on EpCAM<sup>+</sup>

CD45<sup>-</sup> tumor cells of the malignant ascites in the presence (or absence) of CatmAb at 18 hours. The bispecific mAb increased the fraction of dying and dead cells (Fig. 6A) and promoted the release of ATP in the milieu (Fig. 6B, right panel) but failed to induce the exposure of CRT or the exodus of HMGB1 in the extracellular environment of ascites (n=10)(Fig. 6B, left and middle panels). In contrast, pre-incubation of tumor cells (SKBR3) with oxaliplatin did not increase cell death by CatmAb (Fig. 6C left panel) but mediated stress and increased CRT exposure (Fig. 6C, right panel), HMGB1 (Fig. 6D, left panel) and ATP release (Fig. 6D, right panel) in the presence of CatmAb.

CatmAb-mediated immunomodulatory effects on malignant ascites synergized with oxaliplatin to induce CDAM on tumor cells.

## Discussion

Here we show –using malignant ascites ex vivo experimental model systems- that CatmAb switches the polarization of local T cells into inflammatory Th1 cells (capable of degranulating and secreting IFN $\gamma$ ), engages CD16<sup>+</sup> cells to express TRAIL (for NK cells) and costimulatory molecules (for monocytes). In conjunction with oxaliplatin, CatmAb triggered the three hallmark criteria of immunogenic cell death in allogeneic tumor cell lines cocultured with PBMC.

CatmAb has been described as a trifunctional antibody capable of i) engaging T cells in a MHC-independent manner, ii) targeting tumor cells in an EpCAM-dependent fashion, iii) stimulating antigen presenting cells through the Fc $\gamma$ R. The increase rate of CD4<sup>+</sup>T cells showing surface mobilization of CD107a was unsuspected because surface mobilization of CD107a by CD8T

cells identifies that can release cytotoxic granules, a function not often associated with CD4<sup>+</sup> T cells. Although mostly described for cytolytic CTLs recognizing target cells, membrane expression of CD107a, a lysosomal marker associated with degranulation in CTLs, could also be found on activated CD4<sup>+</sup> T cells during viral infections. In such circumstances, CD4<sup>+</sup> T cells can acquire cytotoxic functions resulting in the surface expression of CD107a and the release of granzyme A and granzyme B (22-25).

While it is widely demonstrated that CatmAb has local antitumor effects in malignant ascites (13) and mediates a strong tumoricidal activity in mixed tumor lymphocyte cocultures (5-7), whether CatmAb mediates distant effects on systemic immunity remains an open conundrum. Interestingly, two case reports suggested that a systemic immunity might take place post-CatmAb. An extraperitoneal skin metastasis of a platinum-refractory ovarian cancer regressed after an intraperitoneal treatment with CatmAb given for a massive ascites (26). Delayed inflammatory lesions of the peritoneum corresponding to mesenterial nodular fibrosis and granulomatosis were observed post-chemotherapy and surgery in adjuvant intraperitoneal CatmAb injections and appeared to be associated with a complete and long term response in an advanced gastric adenocarcinoma (27). Stroehlein et al. showed tumor -reactive CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Th1/Tc1-lymphocytes in PBMC after restimulation in 5 of 9 patients suffering from peritoneal carcinomatosis, indicating that a long term specific anti-tumor immunity can be elicited with CatmAb (28). Finally, humoral responses to CatmAb (human anti-mouse antibodies) correlated with clinical outcome (puncture-free survival, time to next puncture and overall survival) in a Phase II/III clinical trial (29). Several mechanisms could be involved to account for this systemic immunity. The FcγR-mediated cross-presentation of dying cells is an efficient pathway for the priming of naïve T cells (30). Alternatively, reactivation of tumor-specific effector T cells into long lived

cells integrating the memory T cell pool and recirculating to protect the host against relapse independently of a de novo priming in lymph nodes has been suggested or described (31-33). Finally, the nature of tumor cell stress preceding cell demise matters to condition long term immunity against dying cells. The ER stress response culminating in the exposure, to the cell surface, of an ER-resident chaperone, calreticulin (CRT) represents an « eat-me signal » for engulfment of tumor cells by inflammatory phagocytes (17,34).

While CatmAb alone failed to promote CRT exposure on most malignant ascites-derived tumor cells (and in vitro in mixed lymphocyte tumor cocultures), it enhanced the ability of oxaliplatin to induce it. On one hand, this negative result is surprising given the fact that TRAIL-mediated lysis can promote CRT exposure on tumor cells (35). It may be explained by the fact that TRAIL-expressing NK cells may not engage in privileged contacts with dying tumor cells in the context of the trifunctional bispecific antibody. On the other hand, Trapani and coll. showed that granzyme A/B-mediated lysis is involved in enhancing uptake and cross-presentation of dying bodies by CD8 $\alpha^+$  DC in mouse models (36). They showed that blocking phosphatidylserine did not hamper this granzyme-dependent engulfment of dying tumor cells. It is conceivable that additional eat-me signals different from CRT be exposed post-degranulation by T cells that could be recognized by the human ortholog of mouse CD8 $\alpha^+$  DC (37). However, very few BDCA3 $^+$  DC could be recovered from ascites fluids in our model system (data not shown). The lack of expression of CRT does not appear to be related to a low effector to tumor cell ratio. First, there was no significant correlation between the E:T ratio of CD45 $^+$ /EpCAM $^+$  cells (ranging from 2 to 1402, Table 1) and T cell activation parameters. Second, in a randomized trial (13) where the median proportion of EpCAM $^+$  cells in ascites cells was 0.6%, a clinical benefit associated with a decreased percentage of EpCAM $^+$  cells in ascites was reported.

CatmAb-mediated cell death could not promote the release of the non-histone chromatin-binding transcription factor, HMGB1, in tumor cells from malignant ascites treated with the bispecific antibody alone but could do so, in mixed lymphocyte tumor allogeneic cocultures after presensitization with oxaliplatin (Fig. 6D). This negative result could be explained by the frequent deficiency in nuclear HMGB1 observed in advanced cancers (our unpublished data). Indeed, HMGB1 is the ligand for TLR4 mediating efficient processing and presentation of the phagocytic cargo in DC to Tc1 cells (18). The specific knock down of HMGB1 (created by means of siRNA interfering with HMGB1 translation in tumor cells) suppressed the immunogenicity of cell death induced by oxaliplatin in vivo (18). Therefore, it is conceivable that CatmAb may not mediate its full potential in peritoneal carcinomatosis exhibiting HMGB1 deficiencies. Interestingly, when combined with oxaliplatin (~~but not 5FU~~), CatmAb was more potent in promoting HMGB1 release, urging the use of combinatorial regimen to exploit the immunogenicity of the cell death process.

Finally, ATP release, associated with the activation of the autophagy machinery in tumor cells (19,38), is critical for two key events : first, the recruitment of CD11c<sup>+</sup> DC in tumor beds post-chemotherapy or cell demise (26), second the engagement of P2RX7 on DC which activates the inflammasome NLRP3, culminating in IL-1 $\beta$  release and IL-1R1-dependent Tc1 polarization (39). Ecto-ATPases expressed on regulatory Th17 (40) and Tregs (41) might impair the recruitment of DC and/or the differentiation of IFN $\gamma$  producing CTLs post-treatment. Indeed, CatmAb-treated malignant ascites contained increased levels of memory Treg expressing CD73 (Fig. 4). However, such Tregs did not appear to inhibit the strong polarization of TILs towards an inflammatory Th1 profile (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, Fig. 1B, Fig. 2B, Fig. 3), starting from ascites containing Th2 cytokines (Fig. 3C) and poorly activated T cells (Fig. 1, Fig. 2). This might be

explained by the significant release of ATP induced by CatmAb and amplified by presensitization of tumor cells with oxaliplatin (Fig. 6).

A multicenter, randomized, prospective Phase II study aimed at addressing the efficacy of CatmAb in adjuvant settings in post-operative gastric cancer carcinomatosis responding to neoadjuvant chemotherapy (platinum-based regimen) will be conducted in France. We will validate the capacity of CatmAb i) to induce immunogenic cell stress or death in peritoneal cancer cells, ii) to switch the polarization of TIL towards an inflammatory Th1 pattern, iii) to promote the expression of TRAIL and costimulatory molecules on NK cells and monocytes respectively, with the intent to correlate one of these immune biomarkers to the time to progression.

## **Material and Methods**

**PBMC or Ascites-CatmAb coculture systems.** Either co-cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy volunteers (n=5) and EpCAM<sup>+</sup> tumor cells (SKBR3) (allogeneic system) or ascites cells from patients with malignant ascites (autologous system) were incubated in the presence of CatmAb (CatmAb) at a concentration of 10 ng/mL for 18-48 hours. Ascites fluids harvested from 12 patients bearing EpCAM<sup>±</sup> cancers were used (table 1).

Analyses of T cell activation and measurement of cytokine release in cell culture super-natants were performed. Subsequent analyses included investigation of cell death of EpCAM<sup>+</sup> tumor cells and evaluation of immunologic cell death markers (ICD) (CRT, HMGB1, ATP).

**Ascites samples.** Ascites cells taken at screening (immediately prior to the study) were harvested by standard sample centrifugation or Ficoll density centrifugation if erythrocytes were present to eliminate the latter. The supernatant were frozen at -80°C to evaluate the assessment of cytokines.

Cells harvested from samples at screening were stained for fluorescence-activated cell sorted (FACS) analysis with the antibody anti-CD45-A750 (Beckman Coulter) and anti-EpCAM-PE (CD326, Becton Dickinson) and Vivid Yellow (Molecular Probe) to assess viability. Malignant ascitic fluids were defined as “positive” when EpCAM specific staining gating on viable CD45 negative cells was detectable in flow cytometry using the appropriate isotype control antibodies. No precise threshold of positivity was required.

Then, cells were seeded in 12-well plates ( $10^6$  cells per well) in complete RPMI medium (RPMI 1640 containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin) and CatmAb was added (or not) at 10ng/ml. The plates were incubated in a 5% saturated CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, for 18h.

**Phenotype of peritoneal cells and activation markers:** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) studies of plasma membrane markers. They were performed with the use of fluorescein isothiocyanate-(FITC)-, phycoerythrin (PE)-, phycoerythrin cyanin 7 (PE-Cya7)-, Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)-, Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5)-, allophycocyanin Alexa750 (APC A750)-, allophycocyanin -conjugated antibodies. The following antibodies used for FACS were : anti-human CD45 (Beckman Coulter), CD3 (Miltenyi Biotech), CD4 (Becton Dickinson), CD8 (Beckman Coulter), CD56 (Beckman Coulter), FoxP3 (eBioscience), CD45RA (eBioscience), CD14 (Biolegend), CD16 (Beckman Coulter), CD80 (Biolegend), CD39 (eBioscience), CD40(Becton Dickinson), CD19 (Becton Dickinson), CD25 (Beckman Coulter), CD15 (Biolegend), CD73(eBioscience), CD69 (Becton Dickinson), HLA-DR (Beckman Coulter), CD253 (TRAIL, eBioscience), CD279 (PD-1, eBioscience), CD336 (NKp44, Miltenyi Biotech), TCR VD2 (Beckman Coulter), TCR VG/D PAN (Beckman Coulter), CD123 (Becton Dickinson), Vivid Yellow (Molecular Probe).

After 30 minutes of incubation at 2°C to 8°C, samples were washed. Samples were analyzed in a FACS Cyan (Beckman Coulter). FACS data were analyzed with FlowJo software (TreeStar Inc, Ashland, OR).

**Intracellular staining.** After incubation for 18h, a protein transport inhibitor (BD Golgi-stop, Becton Dickinson) and CD107a-PE (Becton Dickinson) were added for 2h at 37°C.

Then, membrane staining was performed to identify T- and NK cells (CD3,CD4,CD8,CD56). Then, intracellular staining was performed using BD CytoFIX CytoPerm Kit (Becton Dickinson) plus IFN- $\gamma$  -APC (Miltenyi) and -IL17A-FITC (Biolegend).

**Cytokines monitoring.** The cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-12p40, IL-5, was quantified in cell-free supernatants from co-cultures after the end of the incubation period. The supernatants were stored at -80°C until analysis. Cytokines were quantified by cytometric bead array (FlowCytomix; eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 13 beads populations with distinct spectral addresses and size precoated with cytokine-specific capture antibodies were mixed and incubated with recombinant cytokine standards or test samples. In a second time a biotin-conjugated second antibody mixture was added. Finally, Streptavidin-Phycoerythrin was added. Acquisition was performed by flow cytometry Cyan and analysis of sample data was performed with manufactured software (FlowCytomix; eBioscience).

**Tumor Cytotoxicity assays and ICD markers.** Tumour cells co-incubated with PBMC or CatmAb alone were used as controls. After incubation for 18h, cells were analyzed on a FACS after membrane staining with CD45-Alexa A750 (Beckman Coulter) and staining with 7AAD (Becton Dickinson) for determination of cell viability, and Annexin V-APC (Becton Dickinson) conjugated for analysis of apoptosis.

Fluorescence detection of cell surface CRT. Cells (in 12-well plates) were first washed with CRT buffer (1× PBS, 3% albumin bovin serum, PH 7.4) and then incubated with membrane markers for 20 min at 4°C. After 2 washes in CRT buffer, cells were incubated in rabbit anti- CRT antibody (1:100, Abcam) in FACS buffer at 4°C for 30 min. Cells reacted with secondary anti-rabbit IgG (H+L) Alexa fluor 488-conjugates (Becton Dickinson) (1:100) in CRT buffer at 4°C for 30 min and then were washed twice with FACS buffer. Finally, cells were incubated 15 min with 7AAD and Annexin V-APC in Annexin Buffer. Data analysis was conducted using a FACS Cyan (Beckman Coulter).

HMGB1 and ATP dosages. HMGB1 in cell-free supernatant was detected using an ELISA kit (IBL International GMBH) and ATP in cell-free supernatant was detected using a kit for ATP measurement (ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence from PROMEGA).

Acknowledgments : The authors thank Patricia Pautier (MD) and Youssef Tazi (MD) for their help in collecting samples of ascites, and SOCRATES SIRIC, LABEX OncoIMmunology.

## References

1. Jäger M, Schoberth A, Ruf P, Hess J, Hennig M, Schmalfeldt B, et al. Immunomonitoring results of a phase II/III study of malignant ascites patients treated with the trifunctional antibody CatmAb (anti-EpCAM x anti-CD3). *Cancer Res.* 2012;72:24-32.
2. Sebastian M. Review of CatmAb in the treatment of malignant ascites. *Cancer Manag Res.* 2010;2:283-6.
3. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* 2004;35:122-8.
4. Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol.* 2011;64:415-20.
5. Schmitt M, Schmitt A, Reinhardt P, Thess B, Manfras B, Lindhofer H, et al. Opsonization with a trifunctional bispecific (alphaCD3 x alphaEpCAM) antibody results in efficient lysis in vitro and in vivo of EpCAM positive tumor cells by cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol.* 2004;25:841-8.
6. Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, et al. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J Immunol.* 1999;163:1246-52.
7. Zeidler R, Mysliwietz J, Csánady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, et al. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer.* 2000;83:261-6.

8. Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M, Boehm D, Cotarelo C, Steiner E, et al. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5849-55.
9. Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet* 2000;356:1981-2.
10. Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Efficacy of CatmAb in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1675-84.
11. Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, et al. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer.* 2005;117:435-43.
12. Burges A, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, et al. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3899-905.
13. Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer.* 2010;127:2209-21.
14. Wimberger P, Gilet H, Gonschior AK, Heiss MM, Moehler M, Oskay-Oezcelik G, et al. Deterioration in quality of life (QoL) in patients with malignant ascites: results from a phase II/III study comparing paracentesis plus catumaxomab with paracentesis alone. *Ann Oncol.* 2012;23:1979-85.
15. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30:899-911.

16. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. 2010;140:798-804.
17. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13:54-61.
18. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050-9
19. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al.. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*. 2011;334:1573-7.
20. Zitvogel L, Kroemer G. Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects. *J Clin Invest*. 2009;119:2127-30.
21. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8:151-60.
22. Casazza JP, Betts MR, Price DA, Precopio ML, Ruff LE, Brenchley JM, et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med*. 2006 25;203:2865-77.
23. Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, et al. Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central memory T cells by partial targeting of the IL-2 receptor signaling pathway: the key role of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2012 15;188:5189-98.
24. Nemes E, Lugli E, Bertoncelli L, Nasi M, Pinti M, Manzini S, et al.. CD4+ T-cell differentiation, regulatory T cells and gag-specific T lymphocytes are unaffected by CD4-guided treatment interruption and therapy resumption. *AIDS*. 2011;25:1443-53.

25. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:954602. doi: 10.1155/2011/954602.
26. Woopen H, Pietzner K, Darb-Esfahani S, Oskay-Oezcelik G, Sehouli J. Extraperitoneal response to intraperitoneal immunotherapy with catumaxomab in a patient with cutaneous lymphangiosis carcinomatosa from ovarian cancer: a case report and review of the literature. *Med Oncol.* 2012 ;29:3416-20.
27. Rüssel J, Stein A, Behrmann C, Hauptmann S, Krummenerl P, Schmoll HJ, et al. Inflammatory lesions of the peritoneum mimic carcinomatosis after treatment with intravenous chemotherapy and intraperitoneal catumaxomab. *J Clin Oncol.* 2011;29:e644-6.
28. Ströhlein MA, Siegel R, Jäger M, Lindhofer H, Jauch KW, Heiss MM. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:18.
29. Ott MG, Marmé F, Moldenhauer G, Lindhofer H, Hennig M, Spannagl R, et al. Humoral response to catumaxomab correlates with clinical outcome: results of the pivotal phase II/III study in patients with malignant ascites. *Int J Cancer.* 2012;130:2195-203.
30. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999 18;189:371-80.
31. Pagès 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;353:2654-66.
32. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFNγ-dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell.* 2011;20:781-96.

33. Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, Laface D, Truong H, McClanahan T, et al. IL-10 Directly Activates and Expands Tumor-Resident CD8+ T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Res.* 2012;72:3570-81.
34. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med.* 2010;2:63ra94.
35. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 2009;28:578-90.
36. Hoves S, Sutton VR, Haynes NM, Hawkins ED, Fernández Ruiz D, Baschuk N, et al. A critical role for granzymes in antigen cross-presentation through regulating phagocytosis of killed tumor cells. *J Immunol.* 2011;187:1166-75.
37. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanč P, Kjær S, Feest C, et al. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity.* 2012;36:635-45.
38. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle.* 2009;8:3723-8.
39. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15:1170-8.
40. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity.* 2012;36:362-73.

41. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Möller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res.* 2012;72:2190-6.

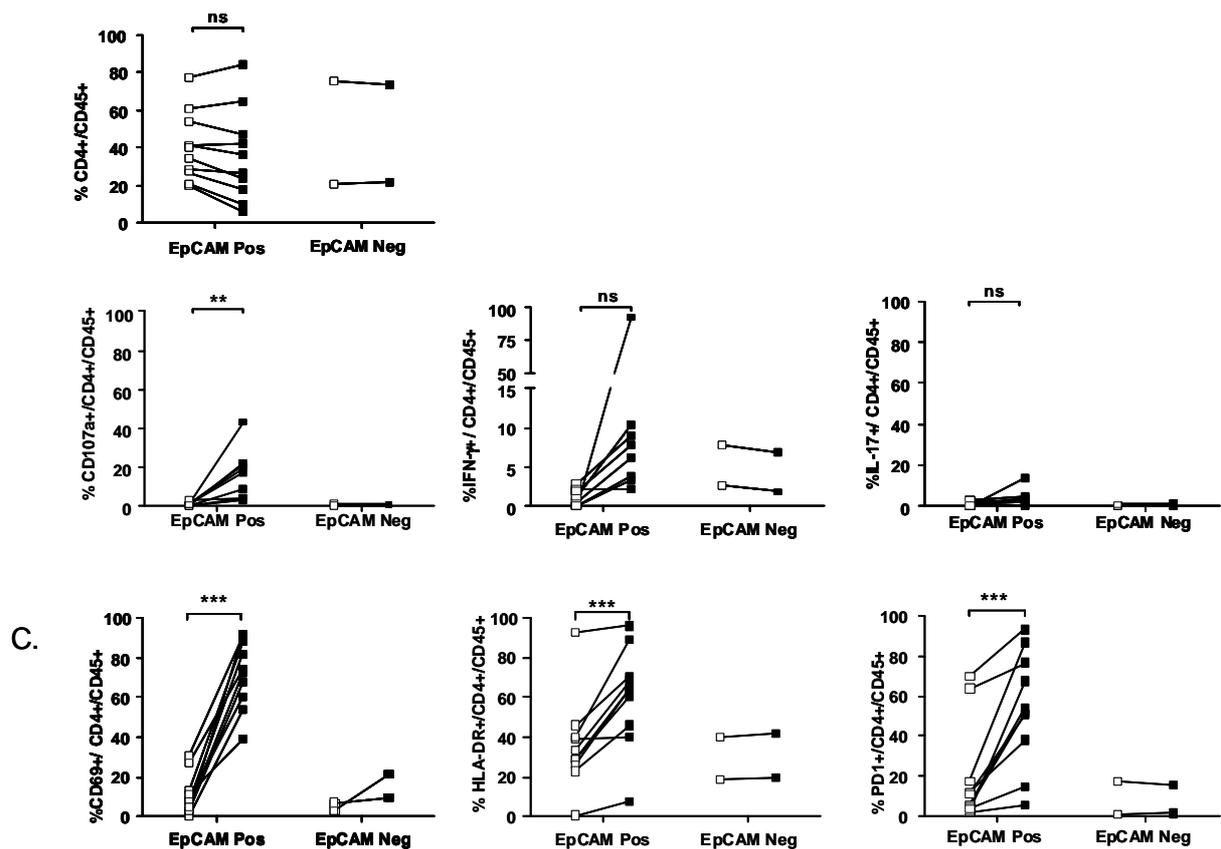
Table 1 – Patients' characteristics

Patients	Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	Pt 6	Pt 7	Pt 8	Pt 9	Pt 10	Pt 11	Pt 12
<b>EpCAM status (Pos/Neg)</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>% EpCAM+/ ascites cells</b>	<b>8</b>	<b>0.5</b>	<b>1.6</b>	<b>0.12</b>	<b>0.07</b>	<b>1.8</b>	<b>0.06</b>	<b>24.4</b>	<b>0.55</b>	<b>11.1</b>	-	-
Age (y)	64	64	39	69	58	71	65	49	51	61	62	62
Gender (M/F)	F	F	F	F	F	F	F	M	F	F	M	M
Primary tumour	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Ovary	Colon	Breast	Ovary	Colon	Colon
Stage	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IIIb	IV	IIIb	IIIb	IV	IV
Ascites Presentation (synchronous/metachronous)	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Synch	Metach	Synch	Metach	Synch
Chemotherapy naive (Y/N)	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Type of systemic chemotherapy	-	Carboplatin Paclitaxel	-	Carboplatin Paclitaxel	-	-	-	-	Caelyx Zometa	-	Oxaliplatin, 5FU Bevacizumab	Oxaliplatin 5FU
Objective Response to chemotherapy (Yes/no)	-	Yes	-	Yes	-	-	-	-	No	-	No	No
Time to last chemo (days)	-	30	-	22	-	-	-	-	24	-	17	52
% CD45+ in ascites	17.6	10.3	76.9	55.7	37.3	95.4	84.1	64.9	2.25	97.4	14.7	73
CD45+cells/ EpCAM+ cells	2	16	48	464	497	53	1402	3	4	974	-	-
% dead cells in ascites	20.7	5	52.1	6	10.9	61	2.9	1	2.6	23.1	20.7	19

## Figures

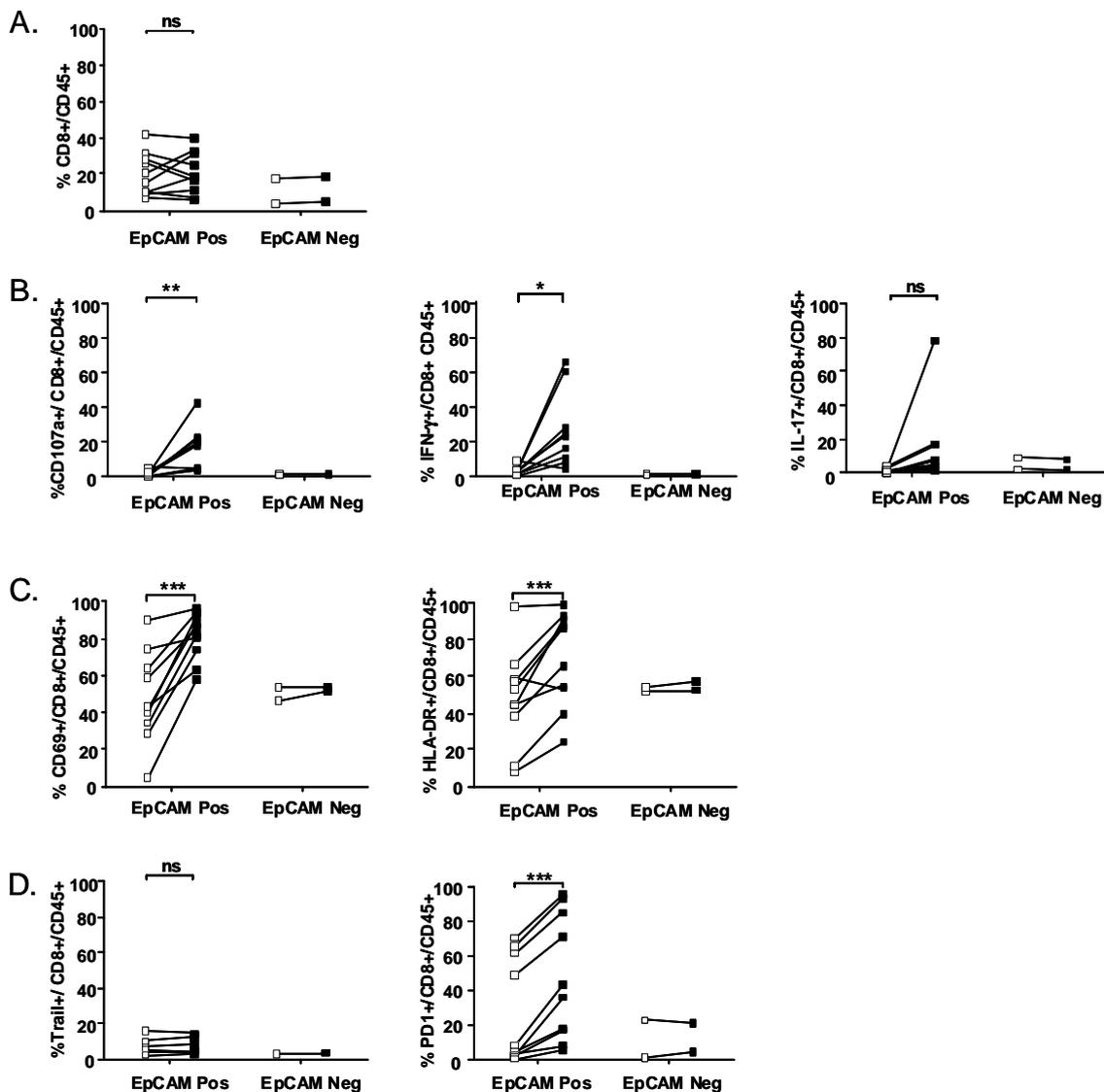
### Figure 1. Activation of malignant ascites derived- CD4<sup>+</sup> T cells by CatmAb.

Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of TIL of various malignant ascites samples incubated (n=12) with [] or without [] CatmAb for 18 hours. **A.** Percentages of CD4<sup>+</sup> T cells are indicated. **B.** Intracellular staining for CD107a, IFN $\gamma$  and IL-17. **C.** Membrane staining for CD69, HLA-DR and PD-1. Each dot represents one patient's ascites fluid. Two patients harbouring an EpCAM negative cancer were used as negative controls. Student t' test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



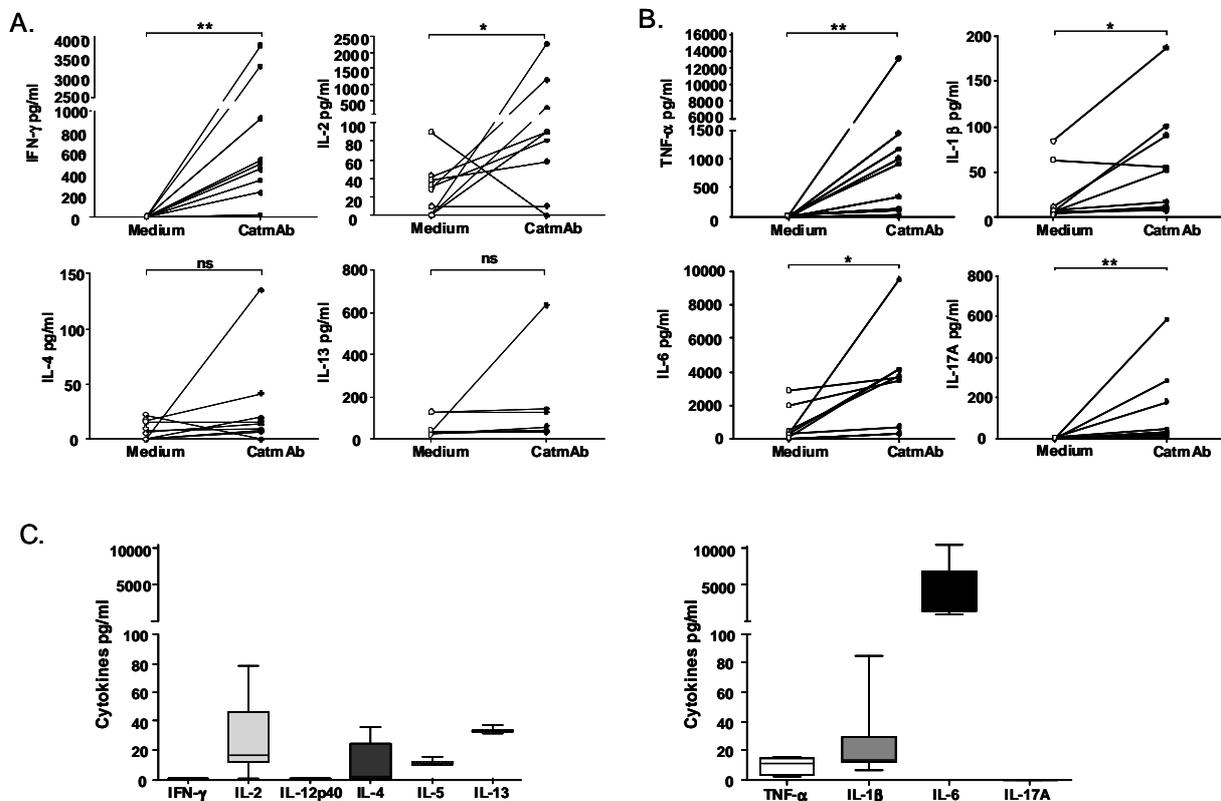
**Figure 2. Activation of malignant ascites derived- CD8<sup>+</sup> T cells by CatmAb.**

Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of TIL of various malignant ascites samples (n=12) incubated with [] or without [] CatmAb for 18 hours. **A.** Percentages of CD8<sup>+</sup> T cells are indicated. **B.** Intracellular staining for CD107A, IFN $\gamma$  and IL-17. **C.** Membrane staining for CD69, HLA-DR. **D.** Membrane staining for TRAIL and PD-1. Each dot represents one patient's ascites fluid. Two patients harbouring an EpCAM negative cancer were used as negative controls. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



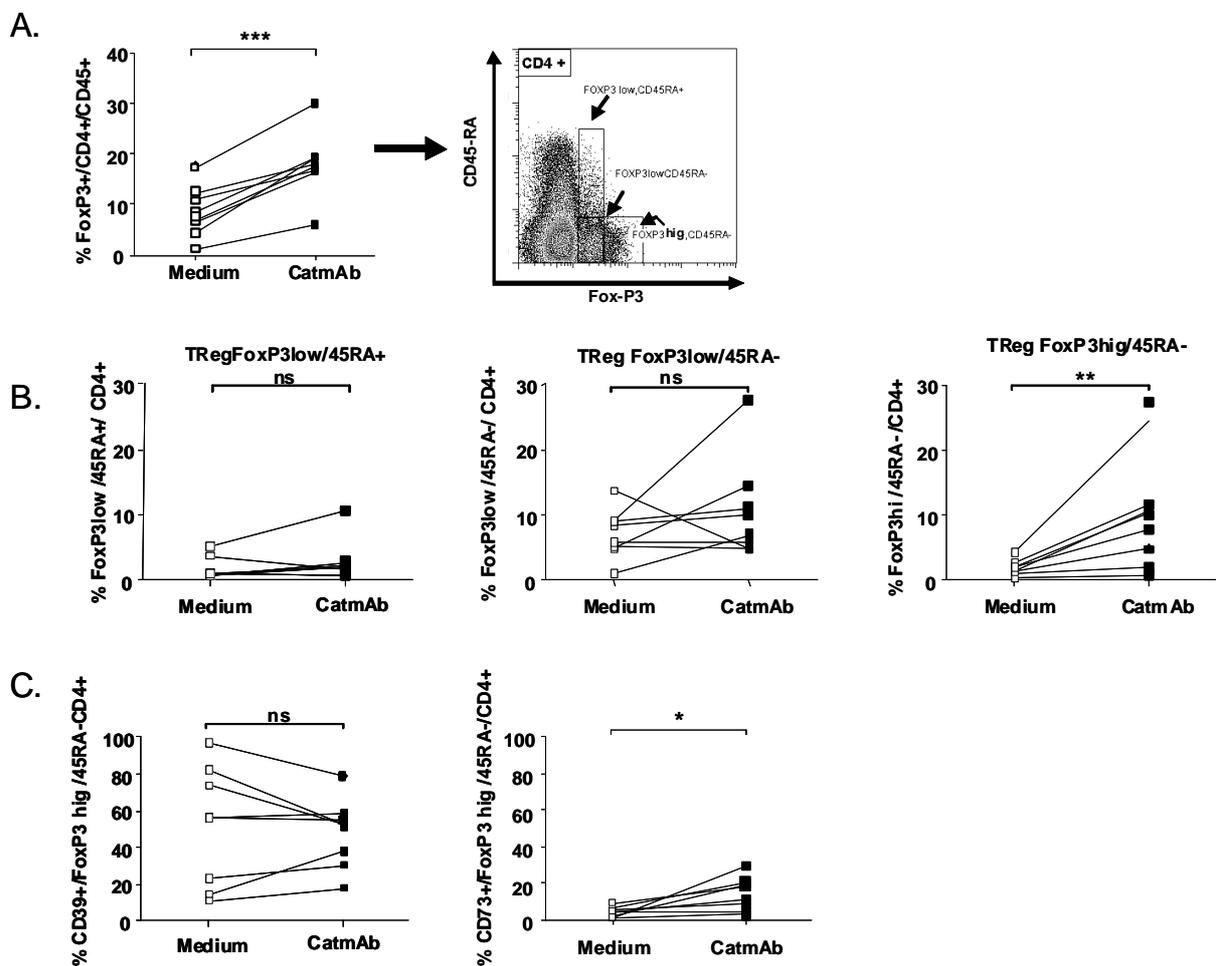
**Figure 3. Cytokine profiles of the ascites milieu are changed following exposure to CatmAb.**

**A.** T helper cytokines. Monitoring by commercial ELISA of four cytokines preferentially secreted by polarized T cells in TIL of various malignant ascites samples (n=12) incubated with [] or without [] CatmAb for 18 hours. **B.** Inflammatory cytokines. Monitoring by Flow Cyto Mix (eBiosciences) of four cytokines preferentially secreted by the tumor microenvironment in various malignant ascites incubated with [] or without [] CatmAb for 18 hours. **C.** Cytokines of the ascites fluids. Direct assessment of cytokine concentrations after fresh harvesting (prior to incubation with CatmAb) of malignant ascites fluids using commercial Flow Cyto Mix (eBiosciences). Each dot represents one patient's ascites fluid. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



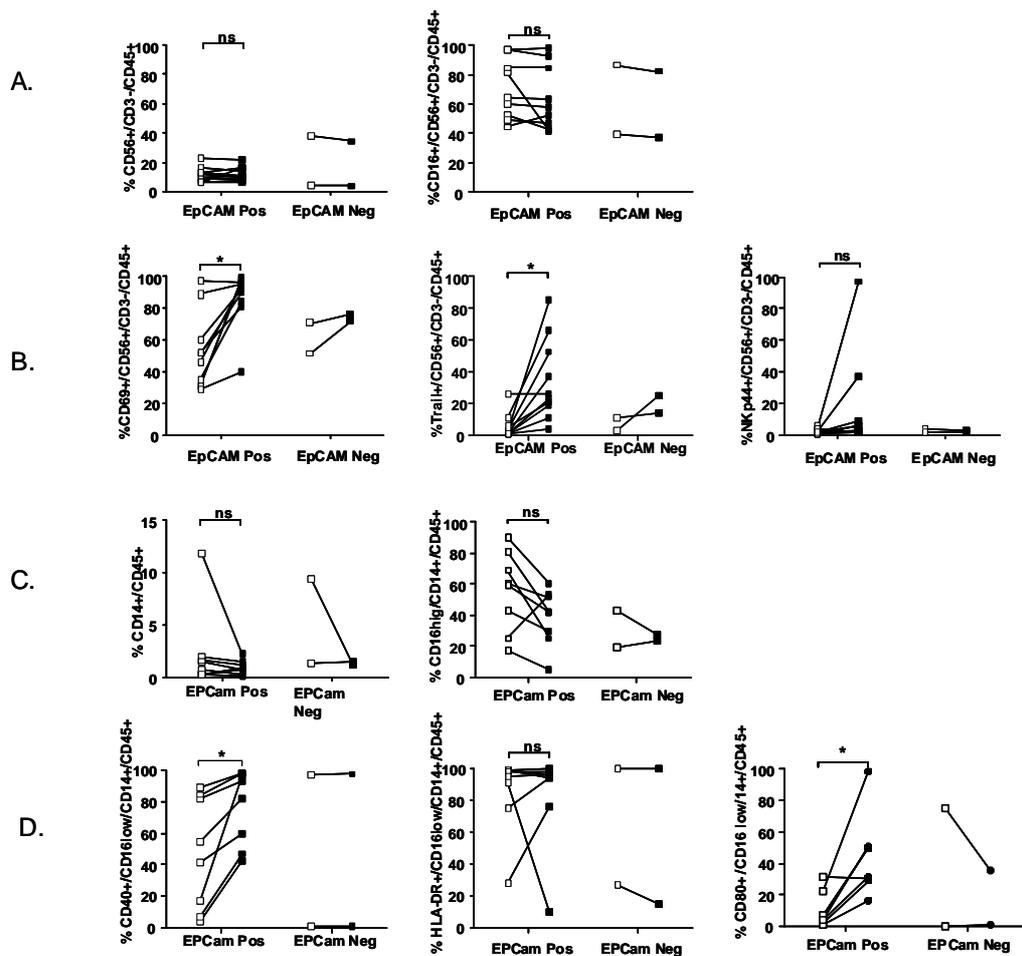
**Figure 4. Regulatory T cells expressed ecto-ATPases post-CatmAb.**

**A-B.** Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of TIL of various malignant ascites samples (n=8) incubated with [] or without [] CatmAb for 18 hours. Percentages of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are indicated (A) as well as CD45RA<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> cells (B). **C.** Membrane staining for CD39 and CD73 in the gate Foxp3<sup>high</sup>CD45RA<sup>-</sup>. Each dot represents one patient's ascites fluid. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



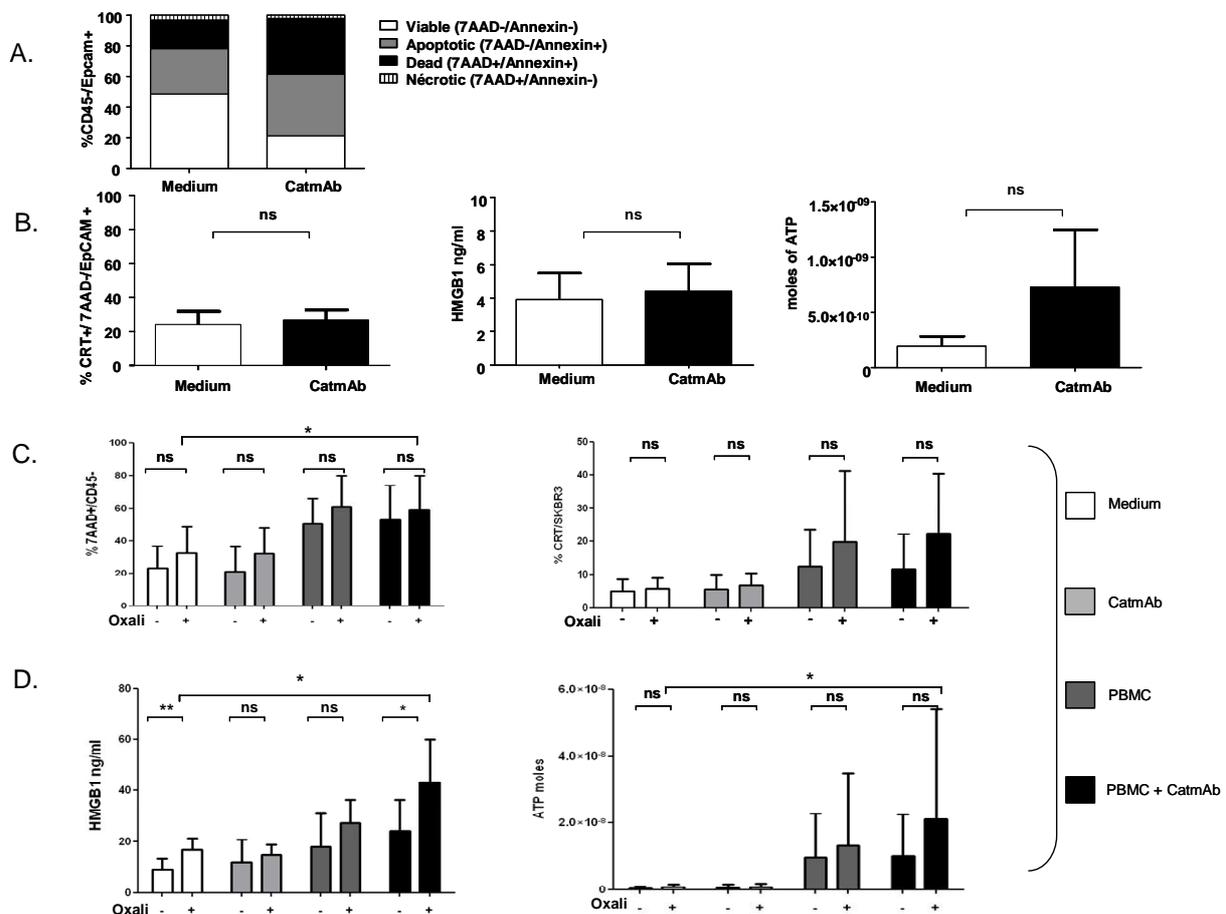
**Figure 5. CatmAb-induced TRAIL and costimulatory molecule expression on CD16<sup>+</sup> cells.**

**A-B.** Flow cytometry analyses of CD3-CD56<sup>+</sup> NK cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of TIL of various malignant ascites samples (n=12) incubated with [] or without [] CatmAb for 18 hours. Percentages of NK cells and CD16<sup>+</sup> NK cells are indicated (A). Low levels of CD107A<sup>+</sup> or IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells could be found after exposure with CatmAb (not shown). Membrane staining for CD69, TRAIL and NKp44 (B). **C-D.** Flow cytometry analyses of CD14<sup>+</sup> monocytes gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of TIL of various malignant ascites incubated [] or not [] with CatmAb for 18 hours. Percentages of CD14<sup>+</sup> cells (left panel) and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup> cells (right panel) are indicated (C). Expression levels of CFD40, HLA-DR and CD80 on CD14<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup> cells (D). Each dot represents one patient's ascites fluid. Two patients harbouring an EpCAM negative cancer were used as negative controls. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Figure 6. Hallmark criteria of immunogenic cell death post-CatmAb.**

**A.** Flow cytometry determination of living, apoptotic (7AAD-annexin V<sup>+</sup>), dead or necrotic (annexin V-7AAD<sup>+</sup>) cells in the gate CD45<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> featuring tumor cells of the ascites fluids (n=7). The percentages of live versus apoptotic versus dead cells are represented for all the patients. **B.** Monitoring of CRT exposure by direct flow cytometry gating on living tumor cells (left), of HMGB1 release by commercial ELISA (middle) and ATP release by luciferase assays (right) for 7 malignant ascites samples incubated with or without CatmAb (right). **C-D.** Allogeneic mixed PBMC/ tumor ex vivo cocultures incubated with or without CatmAb for 18h (left panels) and after 2h of presensitization of oxaliplatin chemotherapy before cocultures (right panels). Flow cytometry analyses of 7AAD<sup>+</sup> cells (C), CRT exposure (D, left panels), ELISA assessment of HMGB1 secretion (D, middle panels), ATP release monitored by luciferase assays (D, right panels). Means±SEM for 4-6 independent experiments are depicted. Anova and Fisher's exact method were used to compare means ±SEM in between four groups. Significant p values are indicated : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



## **Supplemental Material and Methods**

**Cell lines.** SKBR3 cells (breast adenocarcinoma cell line, ATCC HTB-30), which strongly express the EpCAM were used as the target cell line, and MDA-MB-435S EpCAM negative cell line (M14 melanoma cell line) were used as negative controls.

Cells were cultured in complete RPMI medium (RPMI 1640 containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin).

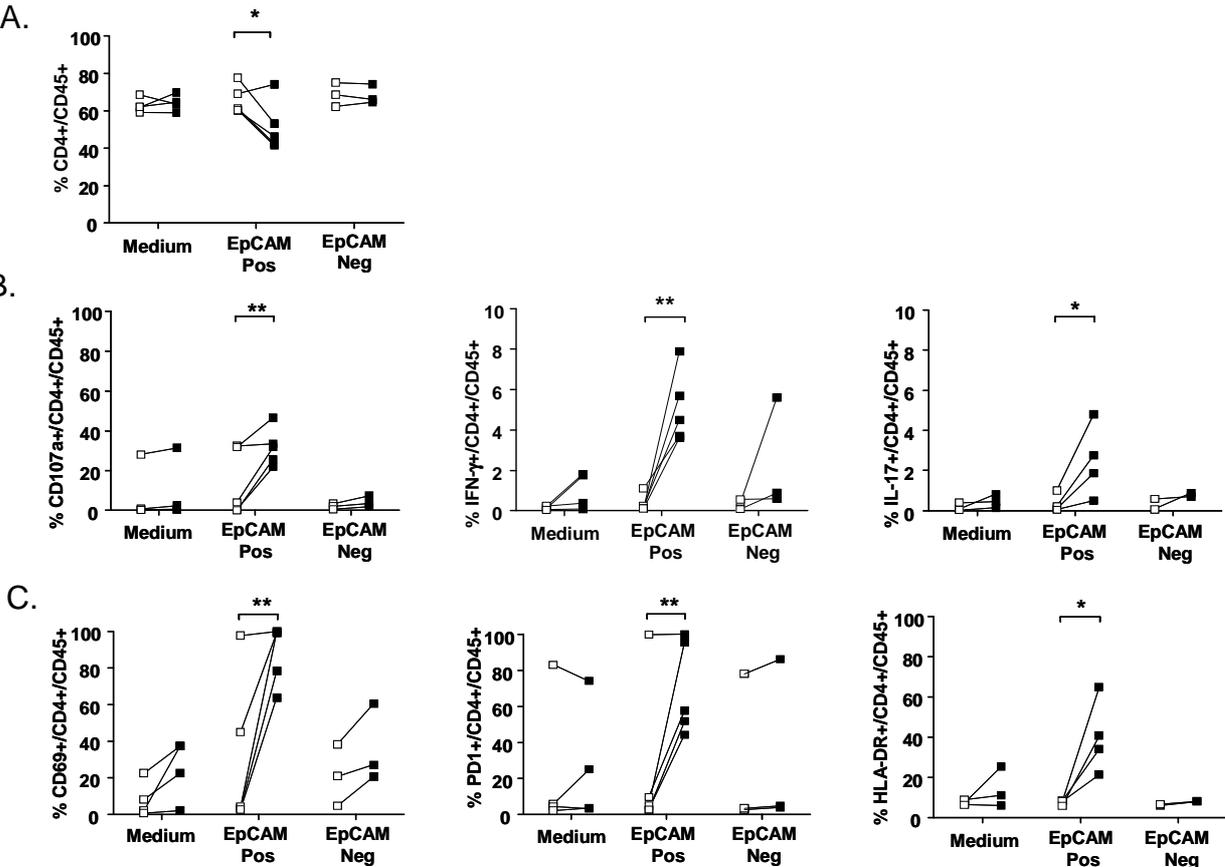
**Co-culture of Cell lines.** Cells (EpCAM +/-) were incubated with either peripheral PBMC at a ratio 1/1, or with CatmAb at a concentration of 10 ng/mL, or with both, or in medium (negative controls).

PBMCs were isolated from heparinized peripheral blood from healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation (LSM 1077, PAA, Austria). Cells were incubated in a 5% saturated CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, for 18h. Co-cultures were also performed after presensitization for 2h in oxaliplatin (300µMOL), or in 5-FU (40 µMOL).

**Supplemental Figures**

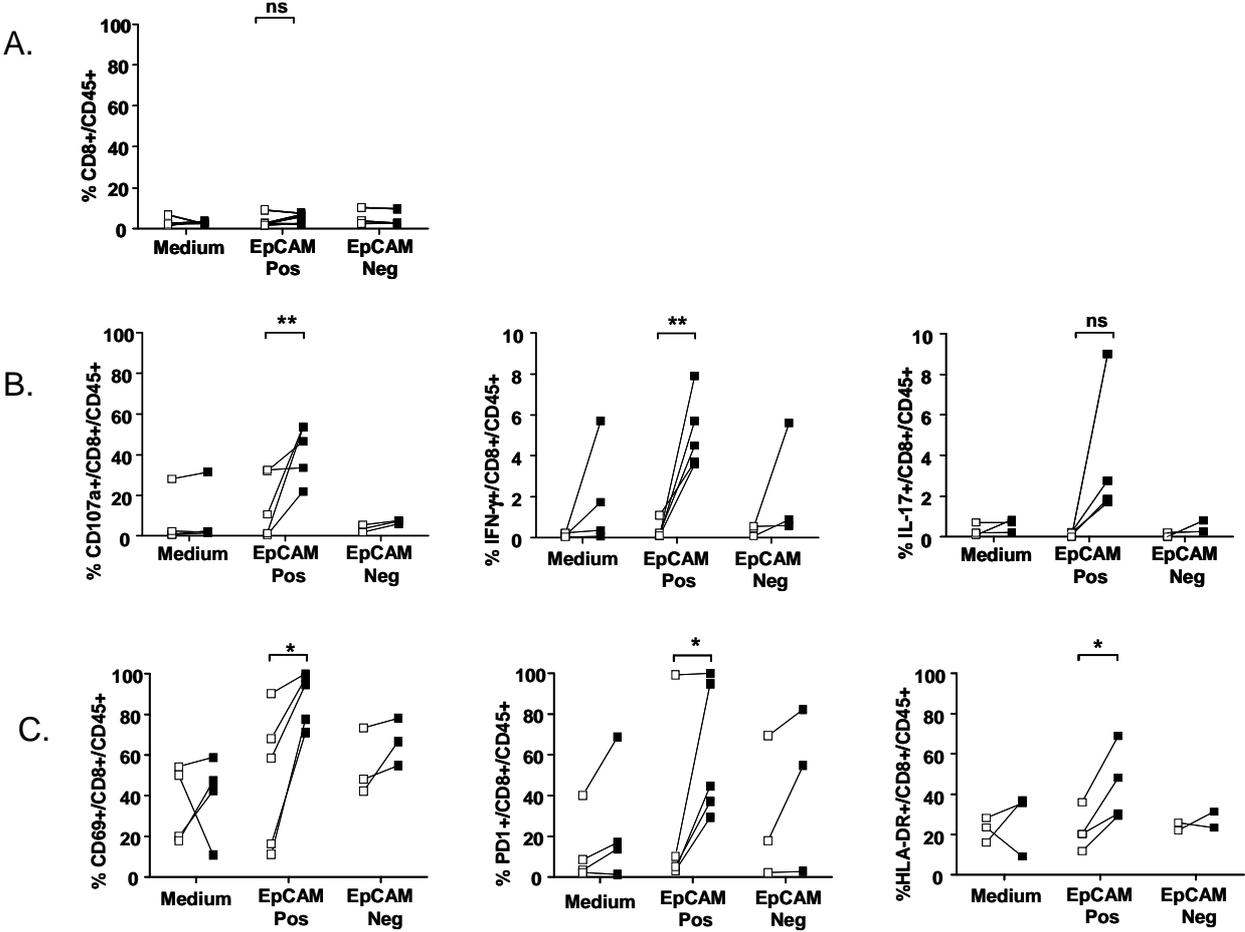
**Supplemental Figure 1. Activation of CD4<sup>+</sup> T cells by CatmAb in mixed lymphocyte tumor cocultures.**

Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of PBMC or mixed PBMC/allogeneic tumor cell line cocultures (n=4) incubated with [■] or without [□] CatmAb for 18 hours. **A.** Percentages of CD4<sup>+</sup> T cells are indicated. **B.** Intracellular staining for CD107A, IFN $\gamma$  and IL-17. **C.** Membrane staining for CD69, HLA-DR and PD-1. Each dot represents one coculture experiment. The EpCAM negative tumor was MDA-MD-435S while the EpCAM positive tumor cell line was SKBR3. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



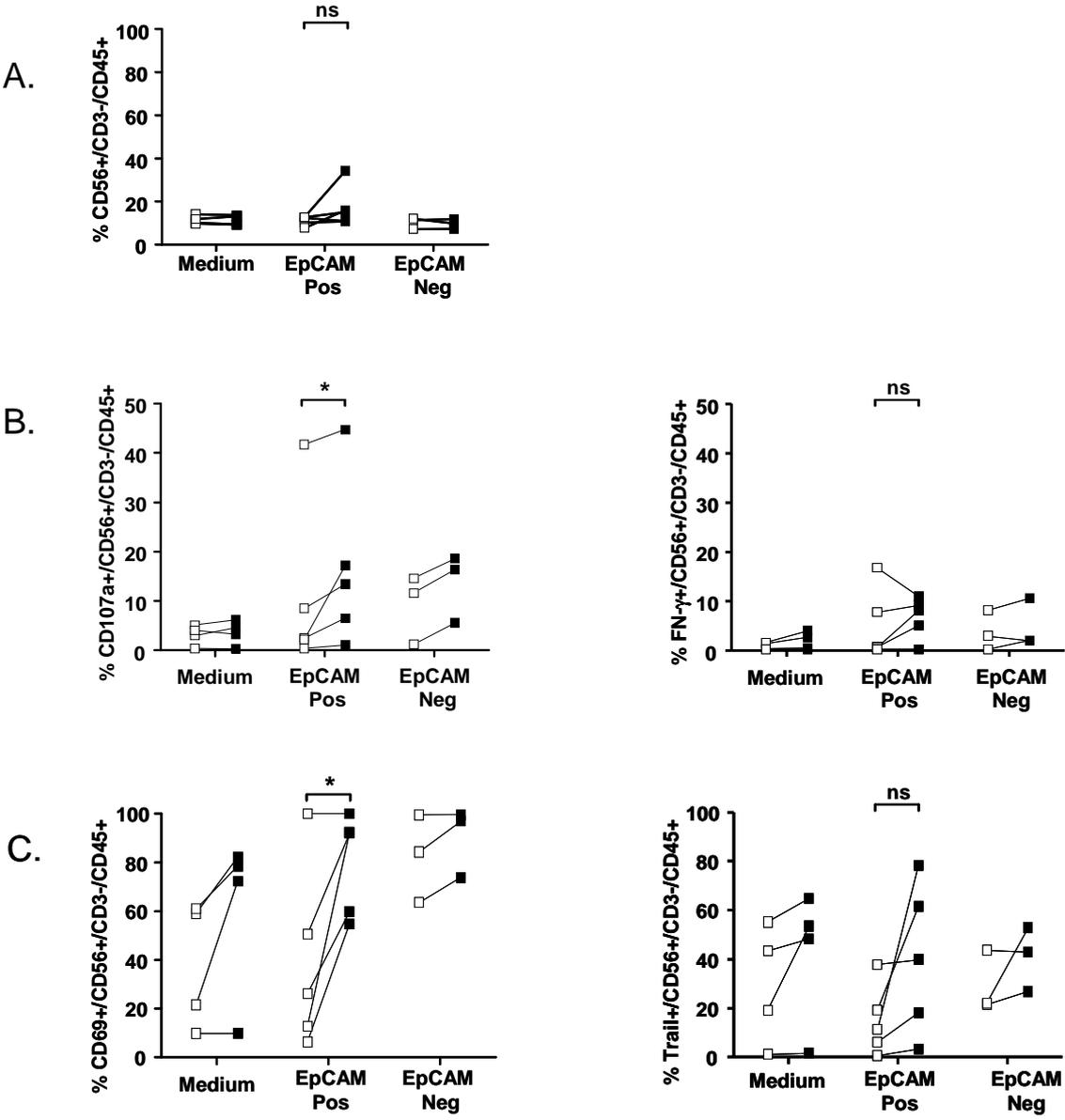
**Supplemental Figure 2. Activation of CD8<sup>+</sup> T cells by CatmAb in mixed lymphocyte tumor cocultures.**

Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of PBMC or mixed PBMC/allogeneic tumor cell line cocultures (n=4) incubated with [■] or without [□] CatmAb for 18 hours. **A.** Percentages of CD8<sup>+</sup> T cells are indicated. **B.** Intracellular staining for CD107a, IFN $\gamma$  and IL-17. **C.** Membrane staining for CD69, HLA-DR and PD-1. Each dot represents one coculture experiment. The EpCAM negative tumor was MDA-MD-435S while the EpCAM positive tumor cell line was SKBR3. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Supplemental Figure 3. Activation of NK cells by CatmAb in mixed lymphocyte tumor cocultures.**

Flow cytometry analyses of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells gated in the CD45<sup>+</sup> fraction of PBMC or mixed PBMC/allogeneic tumor cell line cocultures (n=4) incubated with [■] or without [□] with CatmAb for 18 hours. **A.** Percentages of NK cells are indicated. **B.** Intracellular staining for CD107A and IFN $\gamma$  are depicted. **C.** Membrane staining for CD69 and TRAIL is shown. Each dot represents one coculture experiment. The EpCAM negative tumor was MDA-MD-435S while the EpCAM positive tumor cell line was SKBR3. Student t'test to compare means  $\pm$ SEM of two groups was used: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001



## 7 Remerciements

Mes sincères et respectueux remerciements s'adressent aux médecins, chercheurs, collègues et amis qui ont acceptés de juger ce travail de Thèse en Cancérologie Option Immunologie.

Je remercie sincèrement ma directrice de Thèse, le Professeur Laurence Zitvogel, qui a accepté que j'entreprenne cette étude dans son laboratoire.

Laurence, je te remercie de ta confiance, de ton aide, de ton enthousiasme, et espère que ce travail sera le début d'une longue et constructive coopération.

Je remercie le Professeur Christian Auclair d'avoir soutenu la réalisation de cette thèse au sein de l'Ecole Doctorale et d'en présider la soutenance.

Je remercie mes rapporteurs, les professeurs Christophe Mariette et Marc Pocard, pour leur expertise, leurs précieux conseils et commentaires sur ce travail.

Christophe, c'est un honneur de te présenter ce travail, je te remercie de ton analyse émérite, de ton soutien et de ton dynamisme.

Marc, tes précieux conseils me guident depuis de nombreuses années, je suis heureuse de te présenter ce travail, aboutissement d'un projet qui n'aurait pas vu le jour sans toi.

Je remercie mes examinateurs, les professeurs Olivier Gléhen, Pierre Laurent-Puig et Dominique Elias, d'avoir accepté de juger ce travail. C'est un honneur de vous présenter cette étude.

Olivier, je suis heureuse de te présenter ce travail et de partager avec toi la réalisation de l'essai thérapeutique qui en découle. Je te remercie de ton dynamisme tant dans le domaine de la recherche que de la chirurgie.

Pierre, je te remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail, au regard de tes grandes qualités scientifiques et en souvenir de nos jeunes années à Ambroise Paré.

Dominique, je vous remercie de la confiance que vous m'accordez, de votre soutien, de vos conseils et de votre enseignement inestimables. C'est un honneur et un plaisir de vous présenter ce travail.

Je remercie mes collègues du laboratoire, Caroline Flament, Nathalie Chaput, Sylvie Rusakiewicz, Vishnou Poirier, Julien Pesquet.

Caroline, je te remercie pour ton aide à la réalisation de cette étude, pour ton enseignement des techniques expérimentales et pour ta disponibilité permanente.

Nathalie, je te remercie de tes conseils si utiles et de ta confiance dans la réalisation de cette étude.

Je suis heureuse de poursuivre cette aventure à vos côtés.

Je remercie mes collègues au sein du département de Chirurgie Oncologique et du comité de Pathologies Digestives, Frédéric, Charles, Michel, David, Valérie, Pascal,

Clarisse, Thierry, Peggy, Eric, pour la confiance qu'ils m'accordent, leur dynamisme et leur esprit innovatif.

Je remercie le Professeur Eggermont de la confiance qu'il m'accorde. Vos travaux dans le domaine de la chirurgie et de l'immunologie sont un exemple. C'est un honneur de vous présenter ce travail.

Je remercie les docteurs Patricia Pautier et Youssef Tazi, pour leur aide à la réalisation de ce travail.

Je remercie les êtres les plus chers qui m'entourent de leur soutien sans faille, de leur formidable compréhension, de leur admirable patience, de leur écoute et de leur amour infini, qui m'ont tant aidée dans la réalisation de ce travail.