



HAL
open science

Optimisation de la réponse immune après traitement locorégional de tumeurs colorectales murines

Kathia Lemdani-Aichoun Lemdani

► To cite this version:

Kathia Lemdani-Aichoun Lemdani. Optimisation de la réponse immune après traitement locorégional de tumeurs colorectales murines. Immunothérapie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS374 . tel-02546877

HAL Id: tel-02546877

<https://theses.hal.science/tel-02546877>

Submitted on 19 Apr 2020

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.

Optimisation de la réponse immune après traitement locorégional de tumeurs colorectales murines

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'université Paris-Sud

ECOLE DOCTORALE N° 582
CBMS Cancérologie : biologie - médecine – santé
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 18 Octobre 2018, par

Kathia Lemdani

Composition du Jury :

Mme. Isabelle Bourgault Professeur, Université de Versailles	Président
M. François Ghiringhelli Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
M. Olivier Adotevi Professeur, Université de Franche-Comté	Rapporteur
M. Didier Bazile Docteur, Sanofi	Examineur
Mme Frédérique Peschaud Professeur, Université de Versailles	Directeur de thèse
Mme Claude Capron Maitre de conférence, Université de Versailles thèse	Co-Directeur de
Robert Malafosse Docteur, Hôpital Ambroise Paré	Invité

Tables des Matières

I.	INTRODUCTION	11
1.	Le cancer colorectal	13
1.1	Epidémiologie.....	13
1.2	Facteurs de risque	14
1.2.1	Facteurs génétiques.....	14
1.2.2	Facteurs environnementaux.....	14
1.3	Stades et mécanisme de développement	15
1.3.1	Les adénomes	15
1.3.2	Les polypes striés sessiles (SSP)	16
1.4	Classification TNM du cancer colorectal	17
1.5	Classification moléculaires des CCR	19
1.5.1	La classe CMS1	20
1.5.2	Les autres classes	22
2.	La réponse immunitaire et le cancer	23
2.1	La preuve de concept d'immunosurveillance dans les cancers	23
2.2	L'immunosurveillance dans le cancer	24
2.2.1	La phase d'élimination	26
2.2.2	La phase d'équilibre	29
2.2.3	La phase d'échappement	29
2.3	Le microenvironnement immunitaire dans le CCR	32
2.3.1	Les effecteurs immunitaires dans le CCR.....	33
2.3.2	Immunosuppression dans le CCR.....	35
3.	Le cancer colorectal métastatique	35
3.1	La chirurgie.....	36
3.2	Les traitements systémiques.....	38
3.2.1	La chimiothérapie	38
3.2.2	Les biothérapies ciblées.....	38
3.3	Les traitements locorégionaux.....	40
3.3.1	La radiofréquence (RFA)	41
3.3.2	L'ablation par microondes (MWA).....	41
3.3.3	La cryoablation.....	42
3.3.4	Electroporation irréversible (IRE)	42
3.3.5	Les autres traitements locorégionaux	43
3.4	Traitements locorégionaux et stimulation de la réponse immune	44

3.4.1	Réponse immune et RFA.....	44
3.4.2	Réponse immune et MWA.....	44
3.4.3	Réponse immune et Cryoablation	46
3.4.4	Réponse immunitaire et radioembolisation	47
3.5	L'immunothérapie dans le cancer colorectal	47
3.5.1	Les vaccins	48
3.5.2	Les TLR	52
3.5.3	La thérapie cellulaire adoptive (ACT).....	54
3.5.4	Les cytokines.....	55
3.5.5	Les inhibiteurs de l'immune checkpoint	55
3.6	Combinaison traitements locorégionaux et immunothérapie.....	59
4.	L'immunomodulation locale.....	61
5.	Objectifs des travaux de thèse	77
II.	HYDROGEL MUCOADHESIF POUR LA LIBERATION INTRATUMORALE	
	D'IMMUNOSTIMULANTS.....	79
1.	Introduction	81
1.1	Généralités	81
1.2	Les hydrogels à transition de phase 'Sol-Gel'	81
1.3	Les poloxamères.....	82
1.4	Intérêt des poloxamères	84
1.5	La mucoadhesion	85
2.	Résumé de l'article	86
3.	Article 1 : (Manuscrit en cours de rédaction).....	87
4.	Discussion	111
III.	TRAITEMENT DES TUMEURS COLORECTALES MURINES PAR L'ASSOCIATION RFA ET GEL	
	IMMUNOMODULATEUR	113
1.	Preuve de concept et mises au point préliminaires	115
2.	Résumé de l'article2	116

3. Article2: Local immunomodulation combined to radiofrequency ablation results in a complete cure of local and distant colorectal carcinoma.....	117
4. Discussion	144
IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	147
1. Sélection et étude des agonistes du BCG	149
1.1 Agonistes potentiels du BCG	149
1.2 Stimulation de la réponse immune par le PPD	150
1.2.1 Analyse de la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T après stimulation au PPD	150
1.2.2 Evaluation de l'efficacité in vivo de l'association RFA et Gel-GM-CSF-PPD	152
2. Méthode d'analyse de l'infiltrat lymphocytaire.....	153
2.1 Etat de l'art.....	153
2.2 La méthode la LQLI et ses limites.....	153
2.3 Nouvelle méthodologie pour la quantification des lymphocytes.	154
2.4 Validation de la méthode mise en place	156
3. Application à un modèle tumoral plus pertinent	157
3.1 Les modèles ectopiques	158
3.2 Le modèle Orthotopique.....	158
3.3 Les modèles de métastases.....	159
3.4 Mise en place du modèle intrahépatique	159
3.4.1 Procédure d'injection des cellules dans le foie.....	159
3.4.2 Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence	160
3.4.3 Etude histologique des tumeurs dans le modèle intrahépatique.....	160
3.5 Etude de microenvironnement immunitaire dans le modèle intrahépatique.	161
4. Discussion et perspectives.....	163
4.1 Agoniste du BCG.....	163
4.2 Méthode d'analyse de l'infiltrat lymphocytaire.....	163
4.3 Mise en place du modèle intrahépatique	164
V. DISCUSSION GENERALES/PERSPECTIVES.....	167
VI. REFERENCES	173
VII. ANNEXES.....	197

Tables des figures et tableaux

Figure 1 Incidence et mortalité du cancer colorectal en France.	13
Figure 2 Descriptions des changements histologiques et génétiques acquis pendant la phase de développement du polype au cancer..	17
Figure 3 Les stades du cancer colorectal.	18
Figure 4 Les sous-types moléculaires CMS dans le CCR.....	20
Figure 5 Preuve expérimentale de l'immunosurveillance dans le cancer.	24
Figure 6 Le concept d'immunoediting	25
Figure 7 Représentation schématique de l'interaction des cellules DC et T.	28
Figure 8 Les MDSC dans la progression tumorale.....	32
Figure 9 L'immunoscore.....	34
Figure 10 Décision thérapeutique dans le cancer colorectal métastatique	36
Figure 11 Les principaux traitements locorégionaux pour le traitement des métastases hépatiques	40
Figure 12 Mécanismes de réponse immune par la thermoablation.	45
Figure 13 La mort cellulaire et la réponse immunitaire.....	46
Figure 14 Composants de l'immunothérapie dans le cancer colorectal.....	48
Figure 15 Les CAR T cells	55
Figure 16 Les principaux checkpoint activateurs et inhibiteurs	56
Figure 17 L'injection intratumorale d'agents immunostimulants pour un priming efficace de la réponse immunitaire antitumorale.	61
Figure 18 Intérêt des hydrogels à transition de phase Sol-Gel.....	82
Figure 19 Structure chimique des poloxamères	82
Figure 20 Auto-assemblage des poloxamères en solution	83
Figure 21 Infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs distantes chez le rat BDI-X.....	115
Figure 22 Synthèse de l' IFN- γ par les lymphocytes T de souris vaccinées au BCG après stimulation in vitro au PPD.....	151
Figure 23 Dosage de l' IFN- γ sécrété par les lymphocytes T par méthode ELISA après stimulation au PPD	152
Figure 24 Suivi de croissance des tumeurs secondaires par imagerie de Bioluminescence.	152
Figure 25 Méthode de la LQLI appliquée sur coupe de tumeurs colorectale chez l'homme	154
Figure 26 Illustration des différentes étapes de la nouvelle méthodologie proposée pour la quantification de l'infiltrat lymphocytaire.....	155
Figure 27 Illustration de la séparation du marqueur Diaminobenzidine (DAB) et Hématoxyline.	155
Figure 28 : Elimination du bruit de fond du à la fibrose dans la zone d'intérêt.	156
Figure 29 : Obtention de l'infiltration lymphocytaire à partir des Iso-courbes générées	156

Figure 30 : Comparaison des profils d'infiltration lymphocytaire obtenus avec Visilog	157
Figure 31 : Injection des cellules CT26-Luc dans la capsule hépatique du lobe gauche.....	159
Figure 32 : Suivi de la croissance des tumeurs CT26-Luc dans le foie.	160
Figure 33 : Marquages histologiques des foies implantés avec des cellules CT26-Luc.	161
Figure 34 Analyse des populations immunitaires dans des modèles de tumeurs colorectales	162
Figure 35 Stratégie d'immunomodulation locale pour augmenter le contrôle des tumeurs locales et à distance.....	170

Abréviations

5-FU: 5-fluorouracile	HSP: Heat Shock Protein
ACT: Adoptive cell transfer	IDO: indoleamine-2,3-dioxygenase
ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	IFN-γ: Interferon- γ
ADN : Acide Desoxyribonucléotide	IL: Interleukin
APC Adenomatous Polyposis Coli	IRE: Irreversible Electroporation
BCG : Bacille de Calmette et Guérin	KRAS: Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral Oncogène homolog
BRAF : B-Raf proto-oncogène	LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3
CAR-T: Chimeric antigen receptor T	LT: Lymphocyte T
CCR : Cancer Colorectal	MAPK: Mitogen-activated protein kinases
CCRm: Cancer Colorectal métastatique	MCA: méthylcholanthrène
CD : Cluster of differentiation	MDSC: Myeloid-derived suppressor cell
CEA: Carcinoembryonic antigen	MLH: MutL alpha
CIMP: CpG Island Methalator Phenotype	MSH : MutS protein homolog
CIN voie d'instabilité chromosomique	MSI : Microsatellite instability
CMH : complexe Majeur Histocomptabilité	MSS: Microsatellite stable
CMS : Consensus molecular subtypes	MUC: Mucin
CSH : Cellule Souche Hématopoeitique	MWA: Microwave Ablation
CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	NF-κB: nuclear factor-kappa B
DAMP: Damage-associated molecular pattern	NK: Natural killer
DC: Dendritic Cell	NKT: Natural Killer T
dMMR D Mismatch Repair	NO: Nitrogen Oxyde
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	OLS : Organes lymphoïdes secondaires
EPCAM: Epithelial cell adhesion molecule	P53 : protein 53
FDA: Food and Drug Administration	PAMP: Pathogen-associated molecular pattern
FGF : Fibroblast growth factor	PD-1: Programmed cell death 1
FoxP3: forkhead box P3	PDL-1: Programmed cell death 1 Ligand
GM-CSF: Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor	RFA: Radiofrequency Ablation
GSK-3 β: glycogen synthase kinase-3 β	ROS : reactive oxygen species
HAI: Hepatic Arterial Infusion	SDF1 : Stromal cell-derived factor 1
HCC: Hepatocellular Carcinoma	SIRT: Selective internal radiation therapy
HCG: Human Chorionic Gonadotropin	STAT3: signal transducer and activator of transcription 3
HM: Hypermuté	TAA: Tumor Autologous Antigen
HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer	TACE: Transarterial chemoembolization

TCR: T cell receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor B

Th: T Helper

TIM-3: mucin domain 3

TLR: Toll Like Receptor

TNF- α -: Tumor Necrosis Factor a

TNM: Tumor Nodes Metastases

Treg: T regulator

UM Ultramuté

VEGF : Vascular endothelial growth factor

AVANT PROPOS

Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde et l'apparition de métastases hépatiques en compliquent l'évolution dans 50 % des cas. L'efficacité des traitements actuels est limitée. Le traitement chirurgical à visée curative, traitement de référence, n'est possible que chez 30 % des malades. De plus, 50 % des patients ayant une résection hépatique complète développent une récurrence intra-hépatique suggérant l'existence de métastases occultes ou non-détectables. La chimiothérapie et les biothérapies ciblées ont permis d'améliorer la survie des malades mais leur efficacité est limitée du fait de leur toxicité et de l'acquisition d'une résistance au traitement.

Les traitements locaux sont indiqués chez les patients présentant des métastases hépatiques non résecables. Parmi ces traitements, la radiofréquence (RFA) est la plus utilisée en pratique clinique. Cette technique non invasive permet la destruction irréversible des tissus par hyperthermie grâce à une ou plusieurs électrodes positionnées dans la tumeur. L'hyperthermie augmente la libération, l'exposition des antigènes tumoraux. De plus, la mort nécrotique des cellules tumorales active des signaux de danger comme les nucléoprotéines et les protéines de choc thermique B1 hsp70 et gp96 pouvant activer les cellules dendritiques sur le site du tissu endommagé. Des études ont montré une activation de la réponse T spécifique chez des patients après RFA de métastases hépatiques. Cependant, cette réponse est insuffisante pour permettre une réponse complète et éviter la récurrence tumorale. Il serait ainsi nécessaire de l'amplifier pour obtenir un bénéfice clinique significatif.

L'efficacité de l'immunothérapie est fortement liée à l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs (TIL). Ainsi, les CCR les plus immunogènes MSI sont les seuls bénéficiaires de ce traitement mais ils ne représentent que 15 % de tous les CCR. Il serait ainsi nécessaire d'augmenter l'immunogénicité des CCR pour améliorer l'efficacité des traitements. La RFA pourrait ainsi être utilisée comme un inducteur de la réponse immunitaire et l'association d'une immunothérapie efficace permettrait d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale. A ce jour, la combinaison de la RFA avec les traitements locorégionaux n'a pas été validée.

Le but de ce travail de thèse est de mettre en place une stratégie d'immunomodulation locale qui permet d'augmenter la réponse immunitaire induite par la RFA afin d'obtenir une

efficacité significative. Nous avons ainsi choisi d'utiliser un hydrogel mucoadhésif permettant une libération prolongée d'immunomodulateurs (GM-CSF et BCG) dans la zone de RFA.

Après une synthèse sur le CCR et le concept de base de l'immunité antitumorale, seront exposés les traitements du stade métastatique et les différents mécanismes de réponse antitumorale aux traitements locorégionaux. Une revue en cours de rédaction présentera une synthèse de l'association des traitements locorégionaux et de l'immunomodulation locale dans les cancers digestifs. Les résultats seront présentés sous forme de deux articles soumis pour publication et en cours de finalisation, et commentés. Un chapitre complémentaire présentera les résultats non publiés. La discussion générale apportera une synthèse et proposera des perspectives au projet.

I. Introduction



1. Le cancer colorectal

1.1 Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des grandes causes de mortalité et de morbidité dans le monde (Favoriti et al. 2016). C'est le 3^{ème} cancer le plus fréquent avec 1 400 000 nouveaux cas et 700 000 décès enregistrés par an (Arnold et al. 2017). Ces dernières années, l'incidence et la mortalité du CCR ont augmenté, notamment dans les pays d'Europe de l'est, de l'Asie et de l'Amérique Latine contrairement aux pays d'Europe de l'ouest et les Etats-Unis (Ferlay et al. 2015).

En France, le CCR est un problème majeur de santé publique : 2^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme, après le cancer du sein, et 3^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme, après le cancer de la prostate et du poumon. L'amélioration des traitements ainsi qu'un large panel de tests de dépistage permettent aujourd'hui une meilleure prise en charge des patients, ce qui se traduit par une diminution de la mortalité (Stracci, Zorzi, et Grazzini 2014). Néanmoins, environ 45 000 nouveaux cas et 17 684 décès ont encore été recensés en 2017 (Figure 1).

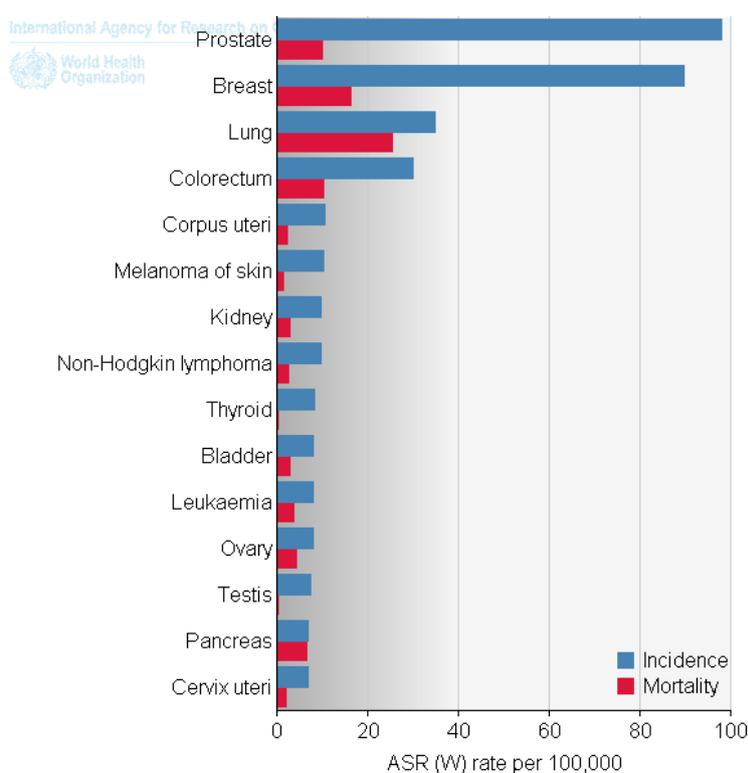


Figure 1 Incidence et mortalité du cancer colorectal en France (Ferlay et al. 2015).

1.2 Facteurs de risque

Les facteurs génétiques et environnementaux jouent un rôle important dans le développement du CCR. La majorité de ces cancers sont sporadiques mais 15 à 20 % des patients ont des antécédents familiaux.

1.2.1 Facteurs génétiques

Le CCR héréditaire le plus fréquent est le syndrome de Lynch. Ce syndrome est causé par une mutation de l'un des gènes de réparation de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, ou EPCAM). La réparation des mésappariements altérés au cours de la réplication donne lieu à l'accumulation de mutations de l'ADN, qui se produisent, en particulier, dans des fragments d'ADN microsatellite avec des séquences nucléotidiques répétitives. Le deuxième CCR héréditaire le plus commun est associé aux polyposes familiales et en particulier à la polypose adénomateuse familiale. Ce syndrome est lié à des mutations du gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), dont le produit d'expression est une protéine qui intervient dans la voie de signalisation Wnt.

1.2.2 Facteurs environnementaux

L'alimentation et le mode de vie ont été fortement associés au CCR. La consommation de fibres, la diminution de la consommation d'aliments transformés et de viandes rouges ainsi que la réduction de la consommation de l'alcool ont été liés à un risque plus faible de développer un CCR (Tuan et Chen 2016, Ryan-Harshman et Aldoori 2007). Depuis quelques années, des études ont suggéré que le microbiote intestinal pourrait avoir un rôle dans le développement du CCR (Hope et al. 2005). En effet, une différence de microbiote intestinal a été démontrée entre les patients et les volontaires sains (Viljoen et al. 2015). Plus tard, d'autres études ont confirmé la relation entre les bactéries pathogènes comme, *Streptococcus bovis* ou les entérotoxigènes et ce cancer (Krishnan et Eslick 2014).

1.3 Stades et mécanisme de développement

Le CCR évolue progressivement et, souvent, le diagnostic clinique n'est possible qu'à un stade tardif. Sa croissance se fait en plusieurs étapes impliquant un processus complexe de changements histologiques, morphologiques et génétiques dans la paroi interne du côlon ou du rectum. Ces transformations provoquent la formation de polypes bénins précancéreux qui prolifèrent dans la muqueuse intestinale (dysplasie muqueuse évolutive) (Frank 2007). Lorsqu'ils ne sont pas retirés, une faible proportion de ces polypes peut se transformer et envahir les tissus voisins pour s'étendre au-delà de la paroi du côlon et du rectum. La tumeur localisée et maligne devient néo-vascularisée, ce qui permet la propagation des cellules cancéreuses vers des organes distants par les systèmes lymphatique et circulatoire. Sur des critères histologiques et génétiques, on différencie deux types de polypes néoplasiques, pouvant évoluer vers un cancer (Figure 2).

1.3.1 Les adénomes

Les adénomes peuvent former un CCR suite à des mutations moléculaires faisant intervenir deux des trois voies décrites dans la littérature : La voie d'instabilité chromosomique (voie CIN) et la voie de Lynch qui représentent respectivement 65 % à 70 % et environ 3 % de tous les CCR.

La voie CIN est caractérisée par des mutations sur le gène *APC* impliqué dans la division, la différenciation, l'apoptose cellulaire et la ségrégation chromosomique, qui se traduisent par l'activation de la voie Wnt. Ainsi, *APC* intervient dans la voie Wnt par interaction avec la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) et la β -caténine. La phosphorylation de la β -caténine par la GSK-3 β entraîne une suppression du signal Wnt. *APC* muté favorise l'augmentation des taux cytoplasmiques de β -caténine qui transloque dans le noyau et entraîne la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et l'invasion tumorale.

Des mutations dans l'oncogène *KRAS* (Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogène homolog) sont également retrouvées chez 30 % à 50 % des patients atteints de CCR. *KRAS* agit sur la croissance, la différenciation, et la survie cellulaire à travers des effecteurs bien caractérisés. Par exemple, la voie Raf-MEK-ERK active des enzymes impliquées dans le contrôle de la

progression du cycle cellulaire mais son rôle dans la pathogenèse du CCR n'est pas très clair et des études ont montré que les inhibiteurs de MEK sont inefficaces dans le traitement du CCR (Haigis et al. 2008). Enfin, les mutations des gènes *APC* et *KRAS* peuvent entraîner une perte de fonction du gène *p53* (protein 53). En effet, *p53* est un régulateur majeur qui contrôle la transcription de certaines de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, la migration, l'angiogenèse, et la réponse immunitaire. La dysfonction du gène *p53* a été rapportée dans 50 % à 75 % des CCR (Pino et Chung 2010). En effet, les mutations du gène *p53* induisent la synthèse de protéines inactives p63 et p73 fonctionnellement et structurellement apparentées à p53. Bien que ces protéines aient été observées dans plusieurs types de tumeurs, leur implication dans le développement du CCR n'a pas encore été démontrée (DeYoung et Ellisen 2007).

Le syndrome de Lynch, qui ne concerne que 3 % des CCR, est aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ; HNPCC). Il se caractérise par une charge de mutation élevée due à des anomalies des gènes, *MLH1*, *MLH 2*, *MLH6* et *PSM2*, qui contrôlent la réparation des erreurs survenues lors de la réplication de l'ADN (Sinicrope 2018).

1.3.2 Les polypes striés sessiles (SSP)

Les SSP, une autre classe de polypes précancéreux, sont considérés comme des précurseurs des autres CCR. Le développement des SSP en cancer est fréquemment associé à des mutations dans le gène *BRAF*. La méthylation de la région promotrice de *BRAF* empêche sa transcription, ce qui inhibe différents gènes cibles et provoque une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire (Yamane 2014).

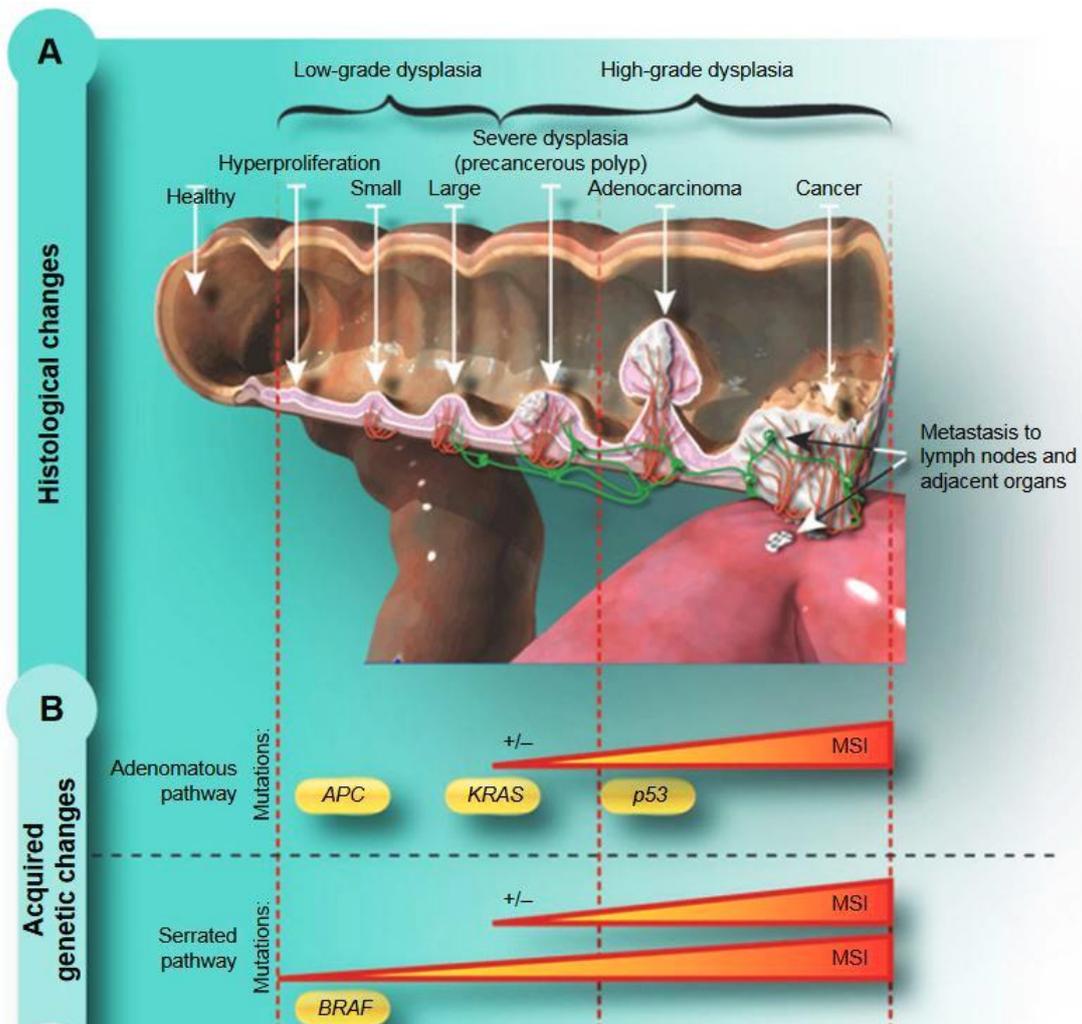


Figure 2 Descriptions des changements histologiques et génétiques acquis pendant la phase de développement du polype au cancer. Adapté de (Balchen et Simon 2016).

1.4 Classification TNM du cancer colorectal

La classification Tumor Nodes Metastases (TNM) a été établie par l'American Joint Committee on Cancer. C'est la seule classification utilisée en clinique pour établir le pronostic des patients atteints de CCR. Le T représente la tumeur primitive et est noté de T0 à T4 selon le volume de la tumeur et sa propagation dans la muqueuse colique. Le N représente le nombre de ganglions lymphatiques envahis et leur localisation. Enfin, le M est relatif à la présence de métastases dans des organes distants.

Dans le CCR, cinq stades sont distingués en fonction de l'extension de la tumeur dans la paroi du colon ou du rectum, des ganglions lymphatiques et de la dissémination extra colique (Figure 3).

- Le stade 0 : les cellules tumorales ne dépassent pas la muqueuse.
- Le stade I : la tumeur se développe dans la sous-muqueuse (T1N0).
- Le stade II : la tumeur atteint la musculature du colon ou du rectum sans atteinte des ganglions lymphatiques (T2-T3/N0).
- Le stade III : la tumeur a atteint la séreuse. Il peut exister une atteinte ganglionnaire (T4N0 ou T4N+).
- Le stade IV : Le cancer colorectal est métastatique. En effet, la tumeur s'est propagée à d'autres organes principalement le foie, le poumon ou le péritoine formant ainsi des métastases.

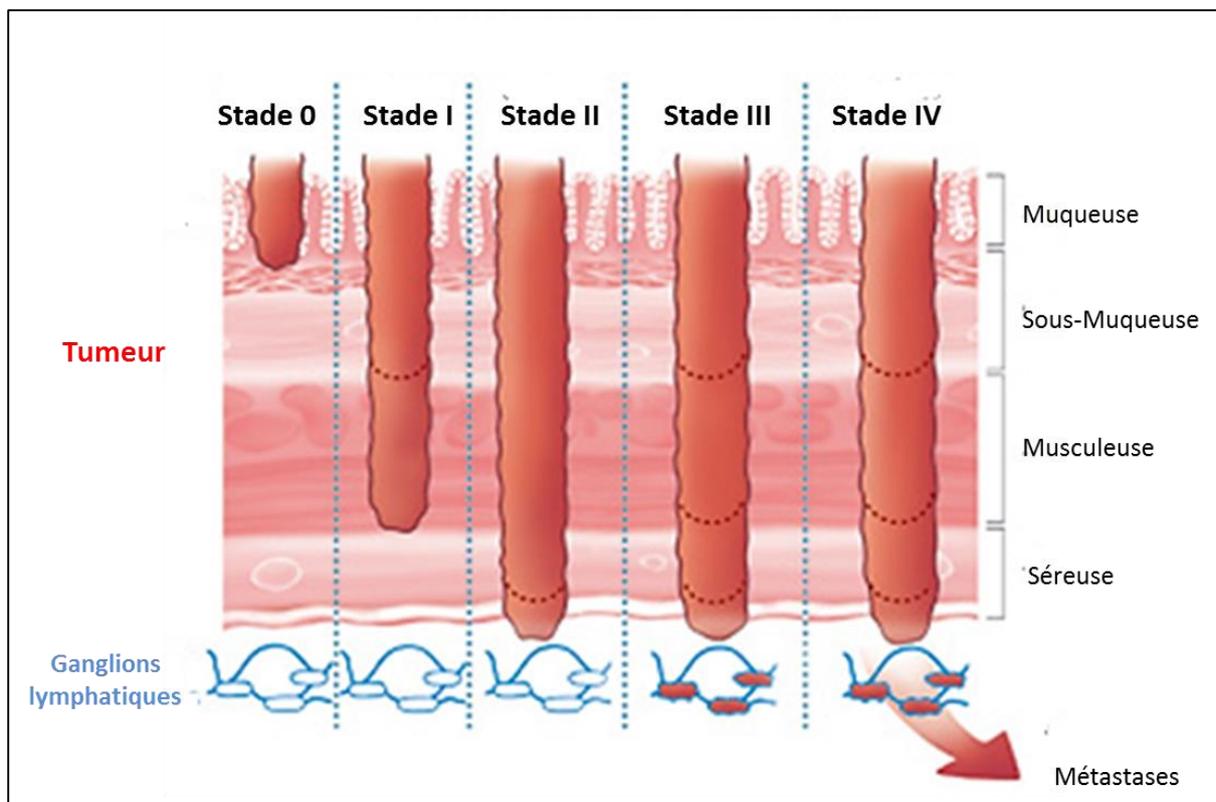


Figure 3 Les stades du cancer colorectal. Adapté de e-cancer.fr

La classification TNM est basée sur l'analyse anatomopathologique et ne permet pas de distinguer les sous-groupes d'évolution entre le stade de tumeur primitive et d'invasion métastatique (J. Li et al. 2016). L'efficacité des traitements est très variable chez des patients atteints de CCR de même stade TNM (Nagtegaal et al. 2011). D'autres classifications indépendantes basées sur des analyses moléculaires et génétiques ont été proposées mais ne sont pas utilisées en clinique (De Sousa E Melo et al. 2013 ; Schlicker et al. 2012 ; Roepman et al. 2014 ; Sadanandam et al. 2013).

1.5 Classification moléculaires des CCR

Le CCR est classé en 4 sous-types moléculaires (Consensus molecular subtypes : CMS) et un cinquième sous-type non classé (Guinney et al. 2015). Le CMS1 comprend les tumeurs associées à une instabilité microsatellite (MSI) en majorité mais également des tumeurs ayant un phénotype méthylateur CIMP et des mutations au niveau de l'oncogène *BRAF*. Le CMS2 (canonique, 37%) est un sous-type de tumeurs épithéliales avec une instabilité chromosomique (CIN). La classe CMS3 (métabolique, 13%) est une classe de tumeurs avec des mutations au niveau de l'oncogène *KRAS* et présentent des caractères épithéliaux et des dérèglements métaboliques. Enfin, le CMS4 (mésenchymateux, 23%) inclut des tumeurs ayant un phénotype mésenchymateux et un phénotype CIMP fréquent. La classe CMS1, est la plus immunogène (Figure 4).

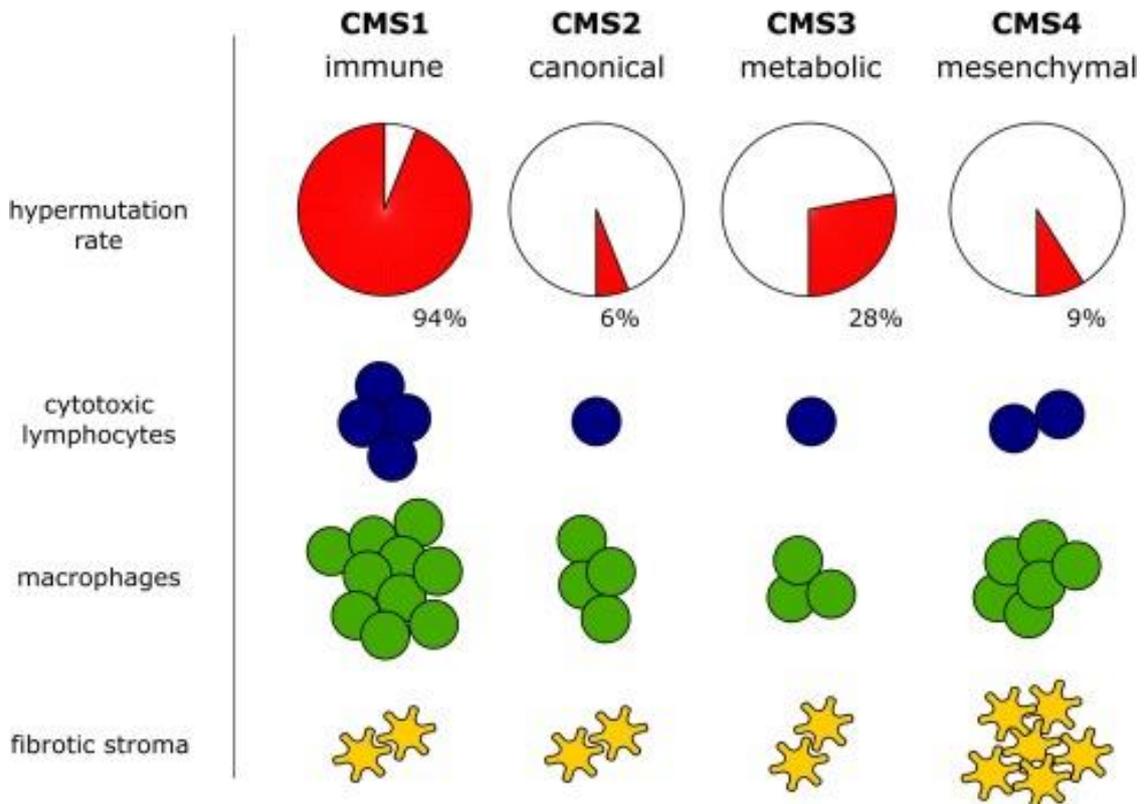


Figure 4 Les sous-types moléculaires CMS dans le CCR.

1.5.1 La classe CMS1

- Les MSI

La classe CMS1 concerne principalement des tumeurs de types MSI. Ces tumeurs sont caractérisées par une fréquence accrue de mutations (Hypermuté; HM) et une altération des gènes de réparation de l'ADN (DNA mismatch repair : dMMR)(Boland et Goel 2010). En effet, le système dMMR répare les erreurs de base dans les microsatellites lors de la synthèse de l'ADN pour maintenir la stabilité génomique. Les microsatellites sont des séquences courtes, répétées, qui apparaissent dans tout le génome. Ce système est composé de 4 gènes *MMR* qui codent pour les protéines MLH1, MSH2, MSH6, et PMS2. L'inactivation de MLH1 et MSH2 est observée dans 90% des tumeurs MSI. Une altération du système dMMR entraîne la production de protéines non fonctionnelles responsables de l'instabilité microsatellitaire (Kawakami, Zaanani, et Sinicrope 2015).

Environ 60% des tumeurs MSI sont caractérisées par une inactivation épigénétique du gène *MLH1*, des mutations dans l'oncogène *BRAF* mais une faible fréquence mutationnelle dans les

gènes *APC* et *KRAS*. Les 40% restants présentent une fréquence plus importante de mutations et sont classées dans un sous-groupe de tumeurs ultra mutées (UM). Ces tumeurs sont caractérisées par une fréquence accrue de mutations dans les gènes *APC* et *KRAS* et une fréquence réduite de mutations dans l'oncogène *BRAF* (Kudryavtseva et al. 2016).

Les tumeurs MSI sont les plus immunogènes. En effet, les tumeurs MSI-high ont un taux mutationnel 20 fois supérieur à celui des tumeurs microsatellites stables (MSS) à l'origine de l'expression d'une charge plus élevée de néo-antigènes, condition nécessaire à l'efficacité de l'immunothérapie (Kocarnik, Shiovitz, et Phipps 2015). Les patients atteints de tumeurs de type MSI ont par conséquent un meilleur pronostic que les patients atteints de tumeurs MSS, particulièrement dans les stades précoces du cancer. Ainsi, l'amélioration de la survie de ces patients peut être lié à l'infiltration du microenvironnement tumoral par des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, de lymphocytes T CD4⁺ et de cellules NK (Saridaki 2014).

- Les CIMP

La classe CMS1 comprend également des tumeurs caractérisées par une instabilité épigénétique et une hyper méthylation des îlots CpG (cytosine précédant la guanine) promoteurs, entraînant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou modifiant l'expression d'autres gènes liés aux tumeurs (Lao et Grady 2011). La régulation épigénétique de l'expression des gènes est un mécanisme général qui intervient dans la préservation de la stabilité génomique, dans le développement embryonnaire et dans la différenciation des tissus (Deaton et Bird 2011). Les îlots CpG sont des régions du génome riche en dinucléotides Cytosine-Phosphate-Guanine. Dans les cellules tumorales, les îlots CpG peuvent être hyperméthylés et entraîner la tumorigenèse par la dérégulation de l'expression de gènes clés (Kaneda et Yagi 2011).

En fonction de la densité de l'hyper méthylation de l'îlot CpG (CpG Island Methylator Phenotype ; CIMP), trois groupes de tumeurs peuvent être définis : des tumeurs à haut degré d'hyper méthylation dans 65% des cas (CIMP-H), à faible degré d'hyperméthylation dans 21 % des cas (CIMP-L) et des tumeurs négatives dans 14% des cas (CIMP-N) (Mojarad et al. 2013). Des études ont montré que le phénotype CIMP-H est associé à une diminution de la survie des patients atteints de CCR, mais ces résultats sont controversés (Ward et al. 2003 ;

Barault et al. 2008). Dans les tumeurs MSS, le phénotype CIMP-H est associé à un mauvais pronostic (De Sousa E Melo et al. 2013).

1.5.2 Les autres classes

La classe CMS2 qui représente 37 % des CCR est caractérisée par une instabilité chromosomique qui induit la perte du gène suppresseur de tumeur *APC*, suivie d'une dysfonction de *KRAS* et de la perte de *p53*. De plus, les tumeurs CMS2 sont activées par les voies de transduction du signal WNT- β catenine et de *Myc*. Une fréquence plus faible de mutations est observée dans cette classe par rapport à la classe CMS1 (Müller, Ibrahim, et Arends 2016). Paradoxalement, la survie globale à 5 ans pour ce groupe est plus élevée comparé aux autres groupes (Guinney et al. 2015).

La classe CMS3 représente 13 % des CCR et possède des caractéristiques génomiques comparables à ceux de la voie CIN. Environ 30 % des tumeurs CMS3 sont considérées comme hypermutées (moins courantes que les tumeurs CMS1, mais plus que les tumeurs de type CMS2 ou 4). En effet, 68 % de ces tumeurs ont une mutation au niveau de *KRAS* (Müller, Ibrahim, et Arends 2016). Cette mutation est associée à une récurrence plus rapide après chimiothérapie chez les patients présentant un CCR de stade III (Blons et al. 2014).

Les tumeurs CMS4 ont une forme mésoenchymateuse généralement de statut MSS avec des fréquences faibles de mutations. Elles sont caractérisées par une angiogenèse accentuée et un microenvironnement riche en cellules T régulateurs (Tregs), en cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et en macrophages associés aux tumeurs. Les patients de ce groupe ont un mauvais pronostic avec des taux de survie globale et de survie sans récurrence plus faibles que les autres groupes (Thanki et al. 2017).

2. La réponse immunitaire et le cancer

2.1 La preuve de concept d'immunosurveillance dans les cancers

Le premier concept de réponse immunitaire anti-tumorale remonte au début du 20^{ème} siècle, lorsque W. Coley, a constaté une régression spontanée de tumeurs de sarcome chez des patients développant parallèlement une infection (Starnes 1992). Suite à ces observations, William B. Coley a injecté des organismes streptococciques chez un patient atteint d'un cancer inopérable. Au cours des années suivantes, 1 000 patients atteints de cancer ont reçu des bactéries ou des produits bactériens et ces études ont montré des résultats prometteurs, en particulier dans les sarcomes des os et des tissus mous (McCarthy 2006).

Le rôle du système immunitaire dans l'élimination des tumeurs a été démontré sur des modèles murins. En effet, il a été reporté que des tumeurs dérivées de souris Rag2^{-/-} déficientes en lymphocytes sont rejetées lorsqu'elles sont implantées chez des souris immunocompétentes (Shankaran et al. 2001). D'autres études ont montré une augmentation du taux de tumeurs induites par le méthylcholanthrène (MCA) chez les souris déficientes en lymphocytes T (Figure 5). Les cellules de l'immunité innée Natural Killer (NK et NKT) sont aussi essentielles dans l'élimination des cellules malignes. Ainsi, les souris déplétées en cellules NK ou en NKT ont un nombre plus élevé de tumeurs induites par le carcinogène MCA (Smyth, Crowe, et Godfrey 2001). Enfin, il a été démontré que l'IFN- γ contrôlait le taux de croissance tumorale chez des souris atteintes de sarcome. En effet, l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T cytotoxiques aux fonctions effectrices antitumorales permet le contrôle de la croissance et la propagation des tumeurs chez la souris (Street, Cretney, et Smyth 2001).

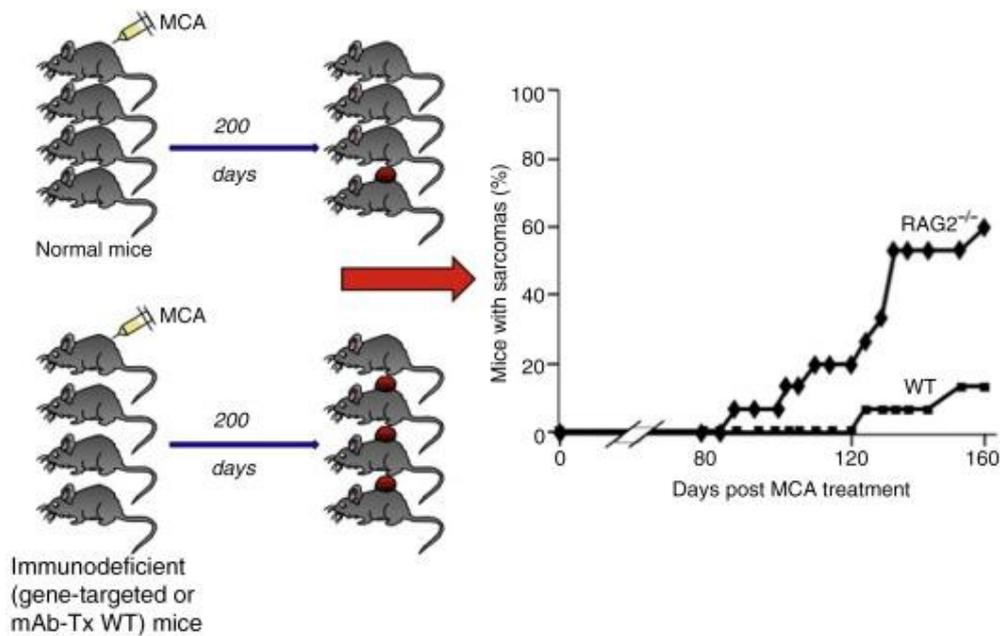


Figure 5 Preuve expérimentale de l'immunosurveillance dans le cancer. Les souris immunodéficientes ont développé plus de tumeurs après injection de MCA que les souris de type wild-type (Shankaran et al. 2001).

Chez l'homme, le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral a été suggéré dans des cohortes de patients immunodéprimés. En effet, ces patients ont un risque plus élevé d'apparition de cancer (Boshoff et Weiss 2002). Une observation rapportant l'apparition d'un mélanome métastatique chez des patients ayant reçu la greffe d'un rein prélevé chez un donneur atteint de mélanome des années auparavant (MacKie, Reid, et Junor 2003). Une autre preuve de l'existence d'une immunosurveillance chez l'homme dans le cancer est la forte corrélation entre les TILs (Tumor infiltrating cells) et la survie des patients (Dunn et al. 2002).

2.2 L'immunosurveillance dans le cancer

Trois phases depuis la transformation des cellules normales en cellules malignes à l'apparition du cancer sont décrites. Ces trois phases successives : élimination, équilibre et échappement sont illustrées Figure 6. Dans la phase d'élimination, l'immunité innée et adaptative fonctionnent ensemble pour détruire les tumeurs. Si la réponse n'est pas efficace, le système immunitaire et la tumeur entrent en phase d'équilibre. Au cours de cette phase, la croissance de la tumeur est limitée par les effecteurs de l'immunité adaptative. Toutefois, des variants

de cellules tumorales peuvent apparaître et ne plus être reconnus par l'immunité adaptative ou induire un état d'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral. Ces cellules tumorales peuvent alors entrer dans la phase d'échappement, dans laquelle leur croissance n'est plus bloquée par l'immunité. Ces cellules tumorales émergent pour causer une maladie cliniquement apparente (Schreiber, Old, et Smyth 2011a).

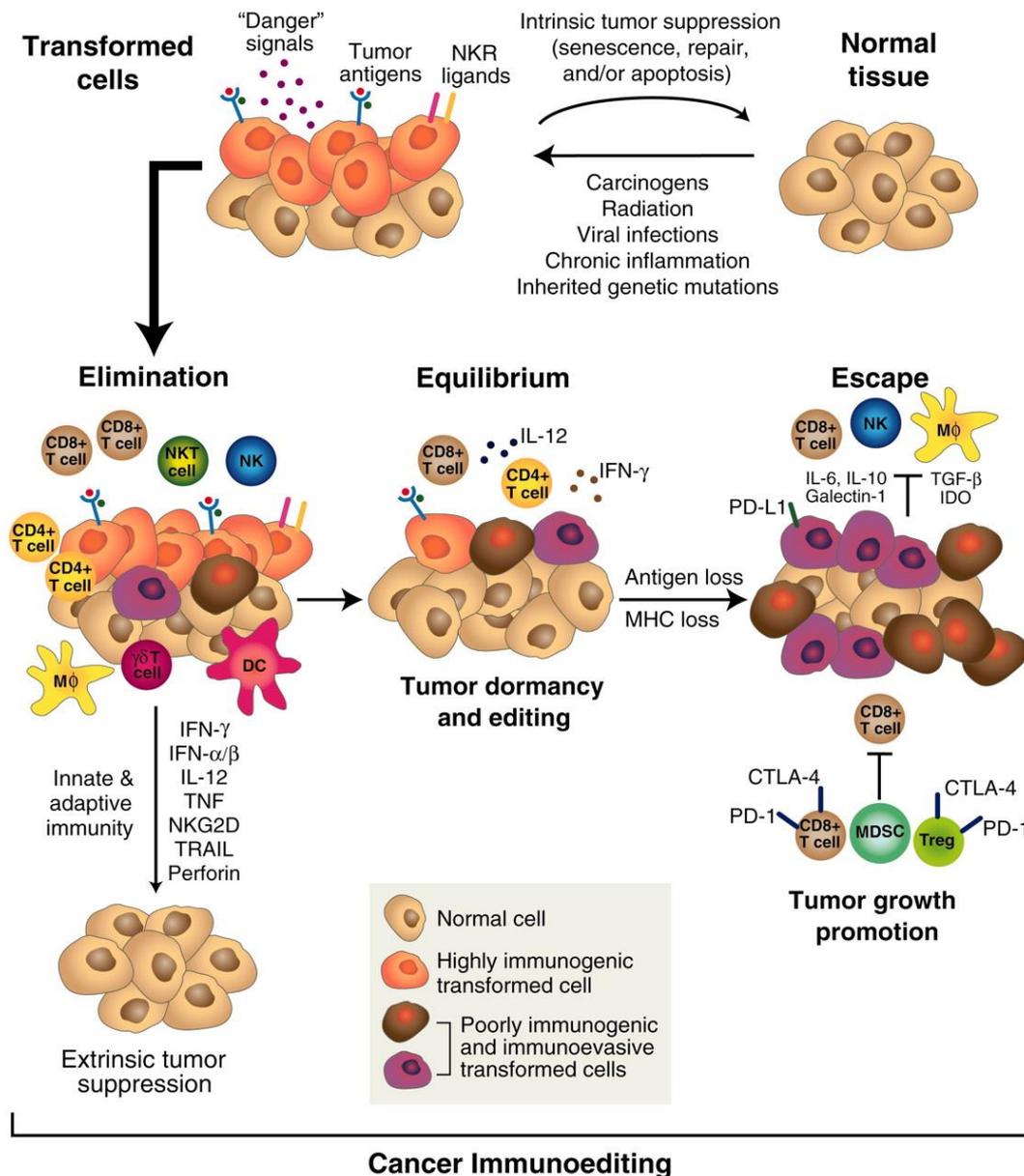


Figure 6 Le concept d'immunoediting (Schreiber, Old, et Smyth 2011a).

2.2.1 La phase d'élimination

Les cellules normales peuvent subir des transformations malignes suite à divers stimuli mais le système immunitaire est capable de les reconnaître et de les éliminer. La réponse immunitaire se traduit par l'activation de la réponse innée et de la réponse adaptative et fait intervenir les cellules NK, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes.

- Les cellules NK

Les cellules NK constituent une population de leucocytes granulaires découverte chez l'homme et la souris en 1975. Ces cellules sont des composants de l'immunité innée capables de lyser directement les cellules infectées et les cellules tumorales (Hanahan et Weinberg 2011). Les cellules NK reconnaissent des ligands exprimés par les cellules tumorales, ce qui déclenche leur cytotoxicité par des mécanismes semblables à ceux des lymphocytes T CD8⁺, essentiellement par la libération de perforine et de granzyme. De plus, les cellules NK possèdent à leur surface un ligand (Fas-L) capable d'interagir avec son récepteur Fas sur la cellule cible et provoquer la mort cellulaire par apoptose (H. L. Chua, Serov, et Brahmi 2004). Les cellules NK sont aussi capable de sécréter des cytokines, en particulier, l' IFN- γ , le TNF- α Tumor Necrosis Factor α et des chimiokines qui participent à l'activation des cellules dendritiques et des macrophages et à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (Maghazachi 2010).

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et se subdivisent principalement en deux grandes catégories: Les DC conventionnelles (cDC) sont des cellules migratoires ou résidentes des tissus lymphoïdes, caractérisées par l'expression de l'intégrine- α ou CD11c, et les DC plasmacytoïdes (pDC) impliquées dans la réponse antivirale (Schraml et Reis e Sousa 2015). Les DC sont de puissantes CPA qui jouent un rôle crucial dans la réponse innée et adaptative. En effet, les DC sont des cellules sentinelles capables de capturer les antigènes par des systèmes de phagocytose, de micropinocytose (antigène soluble) ou d'endocytose grâce à des signaux de danger exogènes (PAMP) ou

endogènes (DAMP). Les antigènes dégradés sont ensuite présentés à la surface des DC par des molécules du CMH (complexe d'histocompatibilité). Ces cellules deviennent ainsi matures, perdent la capacité de phagocytose et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. L'activation des lymphocytes T naïfs induit leur différenciation en cellules effectrices de la réponse immunitaire adaptative T (Koido et al. 2013).

- Les macrophages

Les macrophages sont des cellules qui éliminent les cellules malignes par un mécanisme de phagocytose. Après activation par des signaux inflammatoires, ces cellules libèrent des substances appelées métalloprotéinases dégradant la matrice cellulaire. Les macrophages peuvent détruire des cellules recouvertes d'anticorps par un mécanisme ADCC (cytotoxicité dépendante des anticorps) car ils expriment à leur surface un récepteur pour le fragment constant des immunoglobulines. Il existe deux grandes familles de macrophages : Les macrophages M1 agissent comme des cellules effectrices de la réponse Th1 en libérant des cytokines comme l'IL-1, le TNF- α et l'IL-12, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO), lysant ainsi cellules tumorales (Pan 2012). Les macrophages M2 ont un rôle immunosuppresseur par la sécrétion de facteur de croissance transformant (TGF- β) ou d'IL-10. Dans la tumeur, ils stimulent l'angiogenèse et la croissance tumorale par la sécrétion de cytokines IL-17 et d'IL-23 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)(Dhabekar, Dandekar, et Kingaonkar 2011).

- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4⁺, généralement appelées cellules T auxiliaires (T helper ; Th), agissent comme des régulateurs de la réponse inflammatoire. Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent l'antigène présenté par les molécules de CMH de classe II, via leur récepteur TCR (T cell receptor). L'interaction entre les molécules de Co-stimulation CD80⁺/CD86⁺ et le récepteur CD28 est nécessaire à l'activation des lymphocytes T (Figure 7). Une fois activées, les cellules T CD4⁺ se différencient en cellules CD4⁺ Th1 et CD4⁺ Th17 qui stimulent la production et

l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (LT CD8⁺) par la sécrétion de IFN- γ , du TNF- α , et des interleukines IL-2 et IL-17 (Ankathatti Munegowda et al. 2011).

Les LT CD8⁺ reconnaissent via leur TCR les antigènes liés au CMH de classe I sur les CPA, particulièrement les DC. Une fois activés, les LT CD8⁺ induisent la lyse directe des cellules tumorales grâce aux systèmes perforine/granzyme et Fas/FasL. De plus, ces cellules sont capables de sécréter de IFN- γ , qui polarise la réponse T vers une réponse Th1 (Tougeron, Fauquembergue, et Latouche 2013).

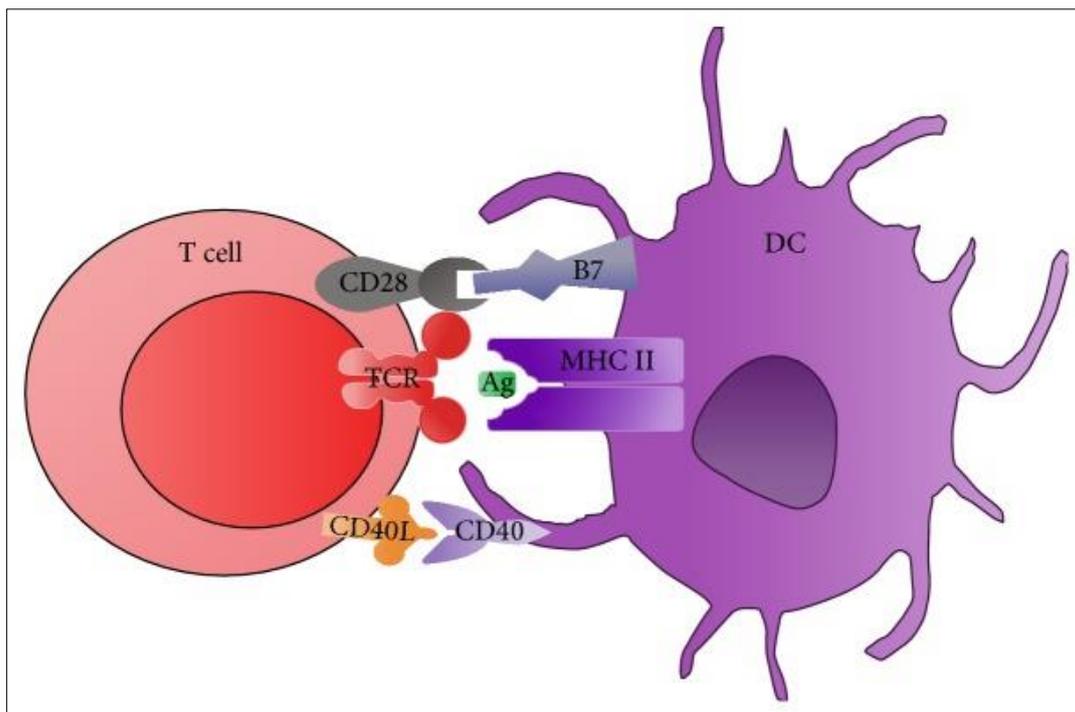


Figure 7 Représentation schématique de l'interaction des cellules DC et T. L'activation du lymphocyte T implique des interactions entre les récepteurs de Co-stimulation des lymphocytes T, les CD28 avec leurs ligands, CD80⁺ avec CD86⁺ (famille B7) et CD40L avec CD40⁺. (Silva et al. 2015).

- Les NKT

Les cellules NKT (Natural killer T) sont une population particulière de la réponse immunitaire innée qui partage certaines caractéristiques avec les cellules NK (propriétés cytotoxiques et sécrétion de cytokines). Elles reconnaissent une molécule apparentée au CMH (CD1d) grâce à un ligand glycolipidique spécifique. Lorsqu'elles sont activées, les NKT sont capables de produire de grandes quantités de GM-CSF (Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor) et des cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-2 et le TNF- α . Les cellules NKT sont

regroupées en deux types : Les NKT de type I favorisent l'activation des lymphocytes T, des cellules NK et possèdent une activité cytolytique directe apparentée à celle des cellules NK, tandis que les NKT de type II activent les Tregs, réduisent le nombre de NKT de type I et inhibent leur activité cytolytique (Terabe et Berzofsky 2007).

Ainsi, ces populations cellulaires ont un rôle dans l'élimination des cellules tumorales. Lorsque les cellules tumorales ne sont pas éliminées le système immunitaire entre en phase d'équilibre.

2.2.2 La phase d'équilibre

Les cellules tumorales sont des cellules du soi et bien qu'elles soient anormales, elles sont très faiblement inductrices de réponse immunitaire. Ainsi, des variants de cellules tumorales ne sont pas complètement éliminés, et entrent dans une phase d'équilibre dynamique avec les cellules du système immunitaire. Cette phase peut donc expliquer la longue période de latence entre la transformation tumorale, la phase d'échappement et l'émergence d'une maladie maligne. Durant cette phase, seuls les acteurs de l'immunité adaptative interviennent. En effet, des travaux ont montré que la déplétion des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺) ou des cytokines favorisant l'immunité adaptative (IFN- γ et IL-12) induisait la croissance rapide des sarcomes, tandis que l'inhibition des cellules NK n'avait pas d'effet (Koebel et al. 2007).

Ces 2 phases sont importantes dans l'induction et le contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale, néanmoins, les cellules tumorales peuvent échapper au contrôle du système immunitaire conduisant à l'apparition d'un cancer.

2.2.3 La phase d'échappement

La phase d'échappement est décrite comme l'échec du système immunitaire à éliminer les cellules tumorales. En effet, à ce stade, les cellules tumorales ont acquis des modifications génétiques et épigénétiques leur permettant d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire, ce qui favorise la croissance des tumeurs et le cancer devient cliniquement détectable.

L'échappement tumoral à la réponse immunitaire peut être lié à :

- La cellule tumorale
- L'environnement tumoral et aux cellules effectrices du système immunitaire.

- Mécanismes inhérents aux cellules tumorales

Les cellules tumorales peuvent échapper à la réponse immunitaire par des mécanismes de résistance à la lyse, la perte d'expression membranaire du récepteur Fas, des mutations de *TP53*, ou la perte d'expression antigénique.

Certaines cellules tumorales sont capables de synthétiser des facteurs de croissance qui les stimulent de manière autocrine. Par exemple, l'IL-6 impliquée dans de nombreux cancers est l'un des facteurs de croissance les plus importants agissant de manière autocrine sur la cellule tumorale. Cette cytokine induit l'activation de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) qui permet l'échappement des cellules tumorales en bloquant la production des signaux inflammatoires par le système immunitaire (Grivennikov et Karin 2010).

Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent perdre leur antigénicité suite à diverses mutations ce qui empêche leur reconnaissance par le système immunitaire. La perte d'antigénicité peut résulter de la sélection immunitaire par les cellules cancéreuses ou de défauts de présentation des antigènes liés à la perte ou à la régulation négative du CMH de classe I (Schreiber, Old, et Smyth 2011a). En effet, une étude a montré une baisse d'expression des molécules CMH I dans 20-60 % des tumeurs (Campoli et Ferrone 2008). En outre, les modifications des molécules CMH de classe I et II sont considérées comme des facteurs pronostiques indépendants. La perte des molécules de co-stimulation, en particulier B7 ou l'expression de molécules inhibitrices telles que B7-H1 par les cellules tumorales ont également été rapportées (Sconocchia et al. 2014).

- Mécanismes inhérents au microenvironnement tumoral et au système immunitaire

La tumeur représente une structure complexe intégrée dans un environnement immunosuppresseur qui favorise la progression tumorale. Par exemple, l'activation et la maturation des DC dépend du microenvironnement local et peut être bloquée ou polarisée par des facteurs spécifiques responsables de la différenciation en DC tolérogènes et immunosuppressives (Y. Ma et al. 2013). Par ailleurs, les cellules NK exprimant le récepteur inhibiteur PD-1 (Program of Death-1) peuvent perdre leur activité cytolytique et favoriser la progression tumorale (Pesce et al. 2017).

Les cellules tumorales peuvent produire des cytokines immunosuppressives, telles que le VEGF, TGF- β , la galectine ou l'indole-amine 2,3-dioxygénase (IDO), qui recrutent des cellules immunitaires immunosuppressives, essentiellement des Tregs, des MDSC et les macrophages associés aux tumeurs (Vesely et al. 2011).

- Les MDSC

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) dérivent de cellules myéloïdes par modulation pathologique de la myélopoïèse par des médiateurs inflammatoires. Elles représentent une population hétérogène de cellules qui comprend des granulocytes, des macrophages ou des DC. Ces cellules s'accumulent au cours de l'inflammation chronique et de la progression tumorale et présentent des activités immunosuppressives puissantes (Parker, Beury, et Ostrand-Rosenberg 2015). Ainsi, les MDSC consomment les acides aminés (arginine et cystéine) essentiels à la prolifération des cellules T (Schreiber, Old, et Smyth 2011b). De plus, elles produisent du No et des ROS qui provoquent la nitration des récepteurs TCR et induisent ainsi l'apoptose des lymphocytes (Bogdan 2001).

Les MDSC ont également la capacité d'intervenir directement sur le développement et la néoangiogénèse de la tumeur (Umansky et al. 2016). En effet, ces cellules produisent du VEGF et un facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) qui favorisent la néoangiogénèse tumorale (Yang. 2004). De plus, les MDSC infiltrant les tumeurs produisent des protéines inflammatoires S100A8 et S100A9 induites par le VEGF et le TGF- β qui renforcent leur activité immunosuppressive et favorisent l'activation des voies de signalisation MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et NF- κ B (nuclear factor-kappa B)

dans les cellules tumorales (Hiratsuka et al. 2006), stimulant ainsi la progression tumorale (Figure 8).

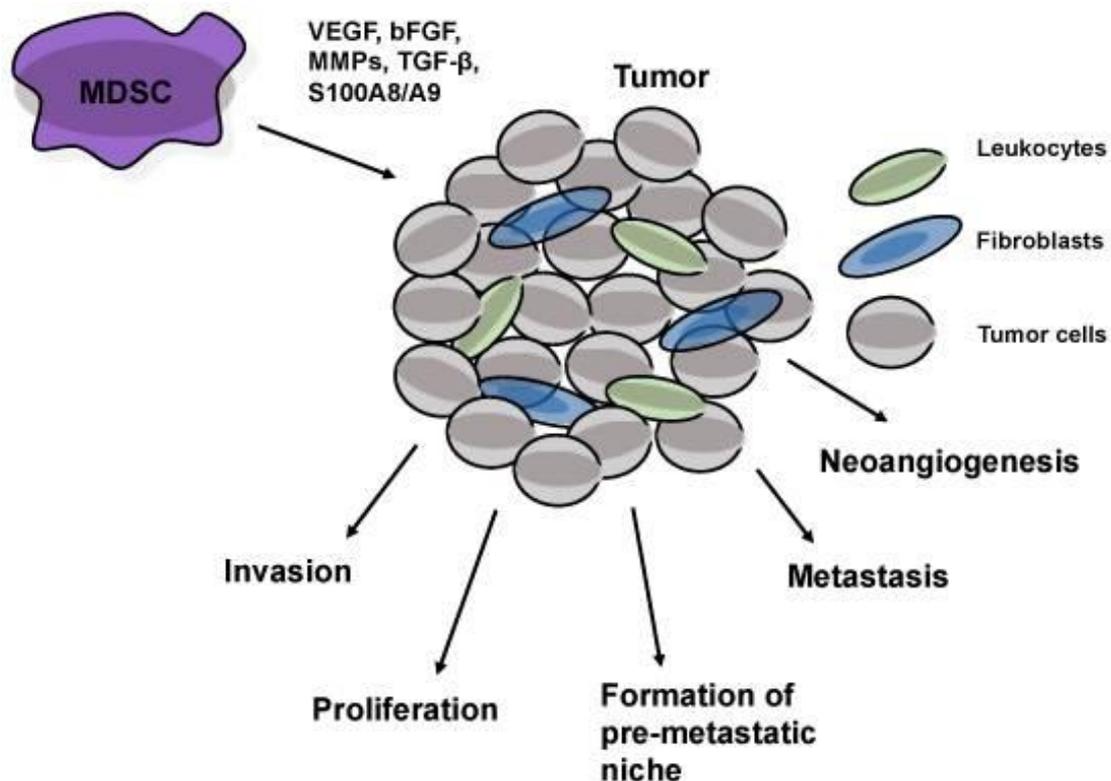


Figure 8 Les MDSC dans la progression tumorale. Les MDSC sécrètent des facteurs comme le MMP, le VEGF, ou le TGF- β qui peuvent stimuler la néoangiogenèse, la prolifération tumorale et l'apparition de métastases. (Umansky et al. 2016).

- Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les Tregs sont des lymphocytes T CD4⁺ qui expriment constitutivement CD25 et le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3). Ils inhibent les lymphocytes T en produisant des cytokines immunosuppressives, telles que l'IL-10 et le TGF- β ou en exprimant des molécules inhibitrices comme CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1 (Programmed cell death protein 1) et PD-L1 (Programmed death-ligand 1). De plus, les Tregs consomment l'IL-2 nécessaire au maintien de la fonction des cellules T cytotoxiques (Moon, Kim, et Seoh 2015). Il a été rapporté une augmentation du taux de Tregs dans les cancers (Mougiakakos et al. 2011).

2.3 Le microenvironnement immunitaire dans le CCR

Le développement du CCR est régulé en majeure partie par le système immunitaire. En effet, les cellules du système immunitaire peuvent agir aussi bien comme des inhibiteurs de développement tumoral que comme des promoteurs de prolifération, d'infiltration et de métastases (Markman et Shiao 2015). Ainsi, le système immunitaire peut influencer l'efficacité des thérapies comme la chimiothérapie et des thérapies ciblées (Boissière-Michot et al. 2014), et les drogues comme le 5-FU (5-fluorouracile) ou les radiations peuvent activer le système immunitaire contre les cellules cancéreuses (Vincent et al. 2010 ; Gou et al. 2014).

2.3.1 Les effecteurs immunitaires dans le CCR

- Les TILs

Il a été montré que le système immunitaire a un rôle crucial dans le contrôle de la progression tumorale. Le pronostic des CCR est fortement corrélé aux TILs (tumor infiltrating lymphocytes) (J. Galon 2006 ; Emile et al. 2017). En effet, une densité importante de T CD8⁺/CD45Ro⁺ est associée à un risque diminué de récurrence tumorale et à une augmentation de la survie des patients (Pagès et al. 2005). De plus, lorsque les ganglions ne sont pas envahis, un taux plus important de CD3⁺ est observé dans la tumeur et est corrélé à un risque inférieur de présence de tumeurs métachrones (Laghi et al. 2009). L'infiltration lymphocytaire est plus importante dans les CCR type MSI pour lesquels le nombre élevé de mutations induit une forte antigénicité (Tougeron et al. 2009).

Au vu de l'intérêt des TILs dans le pronostic des patients, des études se sont intéressées à la mise en place de méthodes standardisées pour leur quantification. L'immunoscore est une méthode de quantification des TILs qui fournit des informations plus robustes que la classification TNM (Jérôme Galon et al. 2012). Cette méthode est basée sur la quantification des populations lymphocytaires (CD3⁺ et CD8⁺) dans la zone tumorale et la marge invasive des tumeurs colorectales (Figure 9). L'immunoscore fournit un score allant d'immunoscore 0 (I0) lorsque la densité lymphocytaire est faible à immunoscore 4 (I4) lorsque la densité lymphocytaire est élevée. Plusieurs études ont confirmé la forte valeur pronostique de l'immunoscore chez les patients atteints de CCR (Figure 9). En effet, seulement 4,8 % des patients de classe I4 ont récidivé et 86,2 % étaient encore en vie après 5 ans. En revanche,

72 % des patients avec un faible score (I0 et I1) ont récidivé et seulement 27,5 % étaient en vie à 5 ans (Jérôme Galon et al. 2014).

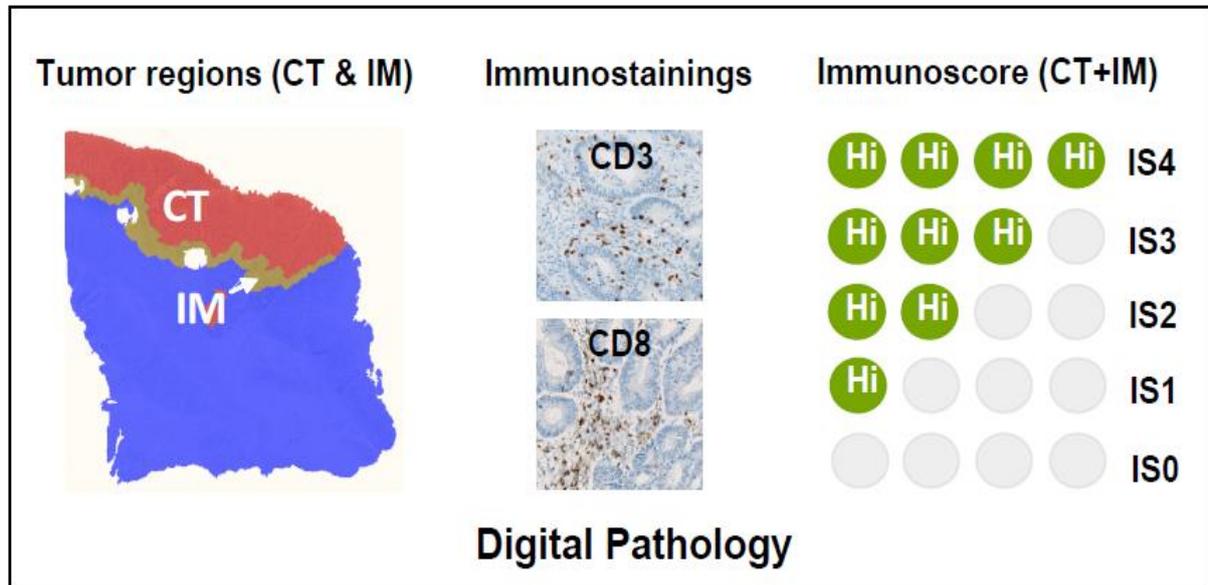


Figure 9 L'immunoscore. Les lymphocytes T $CD3^+$ et T $CD8^+$ sont quantifiés dans le centre de la tumeur (CT) et le front tumoral (IM). Selon la densité lymphocytaire dans les deux zones, un score allant de 0 à 4 est fourni. (Immunoscore.org).

D'autres méthodes de quantification des TILs dans la tumeur ont été développées. Par exemple, la quantification linéaire des lymphocytes est une méthode automatisée et reproductible pour l'évaluation de l'infiltrat lymphoïde (Allard et al. 2012). Cette méthode a montré une première validation de preuve de la valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire dans les cancers du côlon (Emile et al. 2017).

- Les biomarqueurs sanguins

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est une glycoprotéine retrouvée dans le tissu embryonnaire et les tumeurs colorectales. Il est le seul marqueur tumoral utilisé à ce jour dans la surveillance de la récurrence du CCR (Gonzalez-Pons et Cruz-Correa 2015). En effet, des taux élevés d'ACE ont été corrélés à la progression tumorale et un mauvais pronostic. Cependant, un taux élevé de ce marqueur dans le sang peut être détecté dans d'autres types

de cancers et ne peut être utilisé comme moyen de dépistage du CCR. L'antigène carbohydre (CA19-9) sanguin peut aussi être utilisé mais sa sensibilité est inférieure à celle de l'ACE (Gasser et al. 2007).

D'autres marqueurs comme Les acides nucléiques circulants, les protéines et les cellules tumorales sont étudiés mais ne sont pas utilisés en routine clinique (Lecomte et al. 2002 ; Eliasova et al. 2017).

- Les autres effecteurs

Chez les patients atteints de CCR, l'infiltration de la tumeur par les NKT, les macrophages, les polynucléaires éosinophiles, les mastocytes et les DC a également été corrélée au pronostic (Katz et al. 2009).

2.3.2 Immunosuppression dans le CCR

Le CCR peut échapper à la réponse immunitaire par différents mécanismes comme la perte d'expression de CMH de classe I dans plus de 70 % des cas, la dérégulation de la présentation antigénique et l'augmentation de l'expression des molécules immuno-inhibitrices (Markman et Shiao 2015). De plus, les cellules tumorales colorectales libèrent des facteurs immunosuppresseurs tels que TGF- β et recrutent des Tregs et MDSC, qui contribuent à l'échappement à la réponse immunitaire (Massagué 2008). Une polarisation des lymphocytes T en Th2 produisant également des agents immunosuppresseurs est fréquemment observée dans le microenvironnement du CCR.

Les cellules tumorales peuvent également échapper à la réponse immunitaire en développant des mécanismes de résistance à la lyse, notamment par la perte de l'expression membranaire de Fas. Parallèlement, les cellules cancéreuses expriment le Fas Ligand (FasL) et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T qui expriment Fas (Emambux et al. 2018).

3. Le cancer colorectal métastatique

En moyenne, 50-60 % des patients atteints de CCR développent des métastases, principalement dans le foie. Environ la moitié de ces patients présente des métastases

synchrones et l'autre moitié développe des métastases au cours de la maladie (Steele. 1989). Le pronostic du cancer colorectal métastatique (CCRm) est très faible. La survie à 5 ans est inférieure à 10 % (O'Connell, Maggard, et Ko 2004) et est limitée à une très faible proportion de patients pouvant subir une résection chirurgicale des métastases. La survie s'est améliorée au cours des dernières décennies grâce aux nouveaux traitements tels que les chimiothérapies et les biothérapies ciblées. En effet, la survie globale médiane s'est améliorée de 12 mois chez les patients traités par 5-fluorouracil-leucovorine (de Gramont et al. 2000) et de 20 mois avec l'association du Bevacizumab (Hurwitz et al. 2004 ; Saltz 2008).

Actuellement, il existe sept médicaments approuvés par la FDA pour le traitement du CCRm qui sont fréquemment utilisés en combinaison (Figure 10).

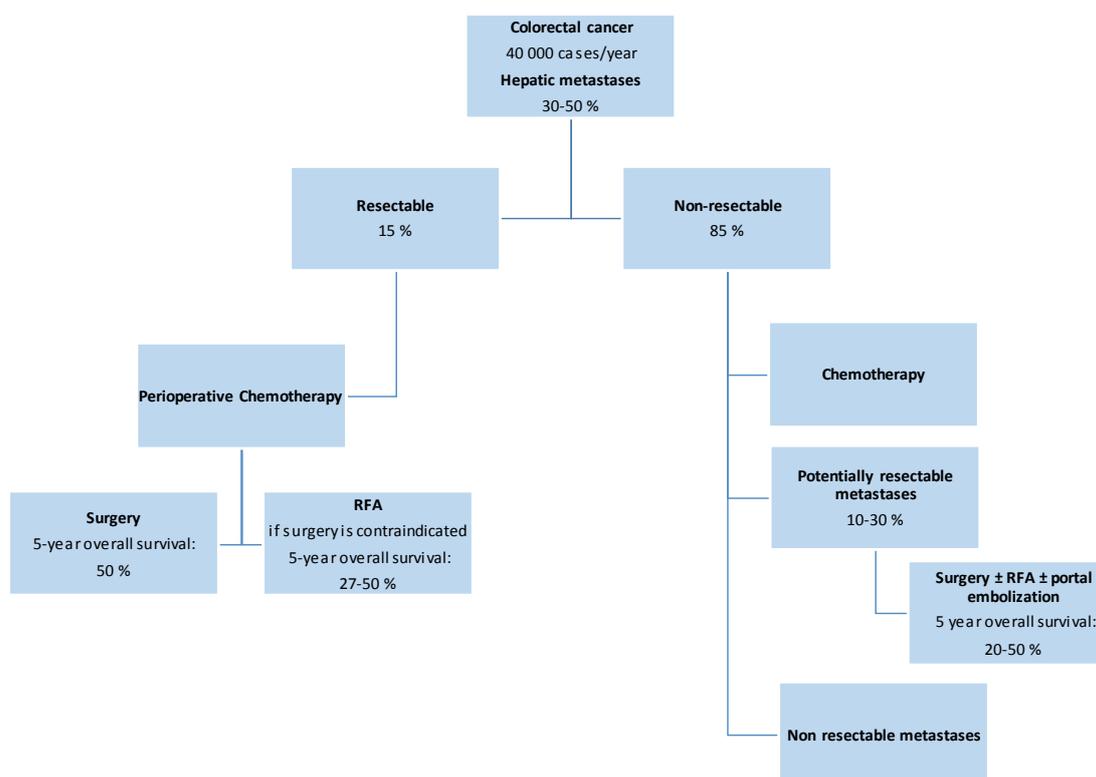


Figure 10 Décision thérapeutique dans le cancer colorectal métastatique (Stoltz et al. 2014)

3.1 La chirurgie

La chirurgie à visée curative est le traitement de référence des métastases hépatiques d'origine colorectale. Elle est possible chez moins de 25 % des patients atteints d'une maladie limitée au foie, c'est à dire chez 5 à 10 % des patients atteints d'un CCR ; en raison de la

distribution des tumeurs dans le foie, de la réserve fonctionnelle hépatique ou de la présence d'une maladie extra hépatique. La survie à 5 ans est de 30 % à 40 % lorsque la résection est jugée complète. Grâce à l'avancée des procédures chirurgicales, les indications de la chirurgie ont été élargies à une population de patients avec des métastases extra-hépatiques (Khatri, Petrelli, et Belghiti 2005). La survie dépend du site de la maladie extra-hépatique mais globalement la chirurgie a permis une amélioration considérable de la survie à 5 ans par rapport à la chimiothérapie seule (Adam et al. 2011 ; T. C. Chua et al. 2012). Cependant, les récurrences tumorales après résection curative des métastases hépatiques du CCR restent très élevées. En effet, 50 % à 75 % des patients présentent une récurrence dans les deux ans (Lintoiu-Ursut, Tulin, et Constantinoiu 2015).

La résection à visée curative est le traitement de choix de la récurrence après résection de métastases hépatiques mais seulement 40 % des patients sont candidats à une nouvelle chirurgie (Saiura et al. 2012). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la récurrence après hépatectomie. Ainsi, il a été démontré que la résection hépatique pourrait favoriser la croissance tumorale en activant le développement de métastases occultes. En effet, l'ablation chirurgicale d'une tumeur influence l'expression de nombreuses substances, en particulier des facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF et le facteur 1 dérivé du stroma (SDF1), capables d'activer la formation de micrométastases (Langenberg et al. 2010). La régénération hépatique après résection est caractérisée par la libération de facteurs qui accélèrent la croissance tumorale, comme le TGF- β et le facteur de croissance fibroblastique (FGF). L'augmentation des taux de TGF- β induite par la chirurgie pourrait activer les cellules stromales qui libèrent des cytokines pro-métastatiques telles que l'IL-11, provoquant ainsi la croissance de la tumeur et des métastases (Chen et al. 2017).

3.2 Les traitements systémiques

3.2.1 La chimiothérapie

Les agents de chimiothérapie utilisés habituellement sont le 5-Fluorouracil, la Leucovorine, la Capécitabine, l'Oxaliplatine et l'Irinotécan. Ces molécules interfèrent avec le processus de division cellulaire au sein des cellules malignes à croissance rapide.

La chimiothérapie peut être proposée dans les cas de métastases hépatiques non résécables pour réduire la masse tumorale et la rendre opérable, ou dans les cas de maladie disséminée pour retarder la progression et prolonger la survie (Bismuth et al. 1996 ,(B. Nordlinger et al. 1996).

Le 5-FU a été la première chimiothérapie utilisée dans le traitement du CCRm. Pendant plusieurs années, cette drogue, en monothérapie systémique, montrait un taux de réponse allant de 10 à 20 % et une survie moyenne de 10 mois. La survie de ces patients a doublé avec l'association de la leucovorine puis de l'oxaliplatine (Ocvirk et Cencelj 2010). Par ailleurs, il a été démontré que la chimiothérapie périopératoire avec FOLFOX4 (acide folinique, fluorouracile et oxaliplatine) augmentait la survie sans progression comparativement à la chirurgie seule pour les patients présentant des métastases hépatiques initialement résécables. Cependant, après un suivi à long terme, il n'y avait pas de différence de survie globale entre les patients des deux groupes.(Bernard Nordlinger et al. 2013)

La chimiothérapie présente une toxicité systémique affectant les tissus sains et une efficacité limitée. En effet, une maladie résiduelle persistante ou une récurrence précoce in situ a été observée chez 83 % des patients ayant eu une réponse complète après résection de métastases hépatiques associée à la chimiothérapie (Benoist et al. 2006). De plus, une résistance des tumeurs à la chimiothérapie a été démontrée dans plusieurs études (Douillard et Bennouna 2005).

3.2.2 Les biothérapies ciblées

La thérapie ciblée est un outil indispensable dans la prise en charge du CCRm. La survie globale a augmenté jusqu'à 24 mois avec l'association d'anticorps monoclonaux à la chimiothérapie conventionnelle (Hurwitz et al. 2004). Deux classes de médicaments sont validées dans le

traitement du CCRm en association avec la chimiothérapie : le Bevacizumab (anti-VEGF) et le Cetuximab (anti-EGFR).

- L'inhibition de la voie VEGF

Les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les fibroblastes du stroma produisent du VEGF. Il agit en se liant à son récepteur transmembranaire VEGFR (récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) qui possède une activité tyrosine kinase. L'activation du VEGFR induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des cellules. Ceci augmente la perméabilité des vaisseaux et provoque la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Dans le CCRm, la progression de la maladie et le pronostic global des patients ont été corrélés avec les taux de VEGF endogènes (Cascinu et al. 2000).

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF l'empêchant d'interagir avec son récepteur et empêchant, ainsi l'activation du récepteur VEGFR. Le Bevacizumab a été la première molécule à démontrer son efficacité dans le traitement du CCRm, en améliorant la survie des patients.

- L'inhibition de la voie EGFR

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est une protéine transmembranaire activée par liaison aux ligands EGF et TGF- β . Ainsi, la liaison d'un des ligands entraîne la dimérisation du récepteur EGFR et la phosphorylation des résidus tyrosine. Il s'ensuit une activation de plusieurs voies de signalisation et la transduction du signal responsable de la croissance et la migration des cellules tumorales, l'invasion cellulaire et la diminution de l'apoptose (J. Marshall 2006).

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal qui empêche la signalisation du récepteur EGFR en altérant la dimérisation des récepteurs et en favorisant leur internalisation et leur dégradation.

La toxicité des biothérapies est modérée contrairement aux chimiothérapies. Cependant, le choix de la drogue permettant d'obtenir une efficacité maximale et un taux de survie prolongé n'est pas évident. Actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs permettant de prédire l'efficacité des biothérapies dans le CCR, à l'exception du statut mutationnel de *KRAS* qui est corrélé à l'efficacité des anti-EGFR (Cacheux et al. 2011).

3.3 Les traitements locorégionaux

Le traitement chirurgical curatif peut être réalisé chez moins de 30 % des patients (Malafosse et al. 2001). Ainsi, les traitements locorégionaux sont indiqués chez les patients présentant des lésions non résecables, des petites métastases récidivantes, ou des comorbidités sévères contre-indiquant une résection hépatique. Parmi les traitement locorégionaux utilisés dans le traitement des métastases hépatiques (Park et al. 2014) on peut citer : la thermoablation par la radiofréquence (RFA) ou les micro-ondes (microwaves ablation MWA), la cryoablation et l'électroporation irréversible (IRE) (Figure 11) . La RFA et les MWA sont les techniques les plus utilisées.

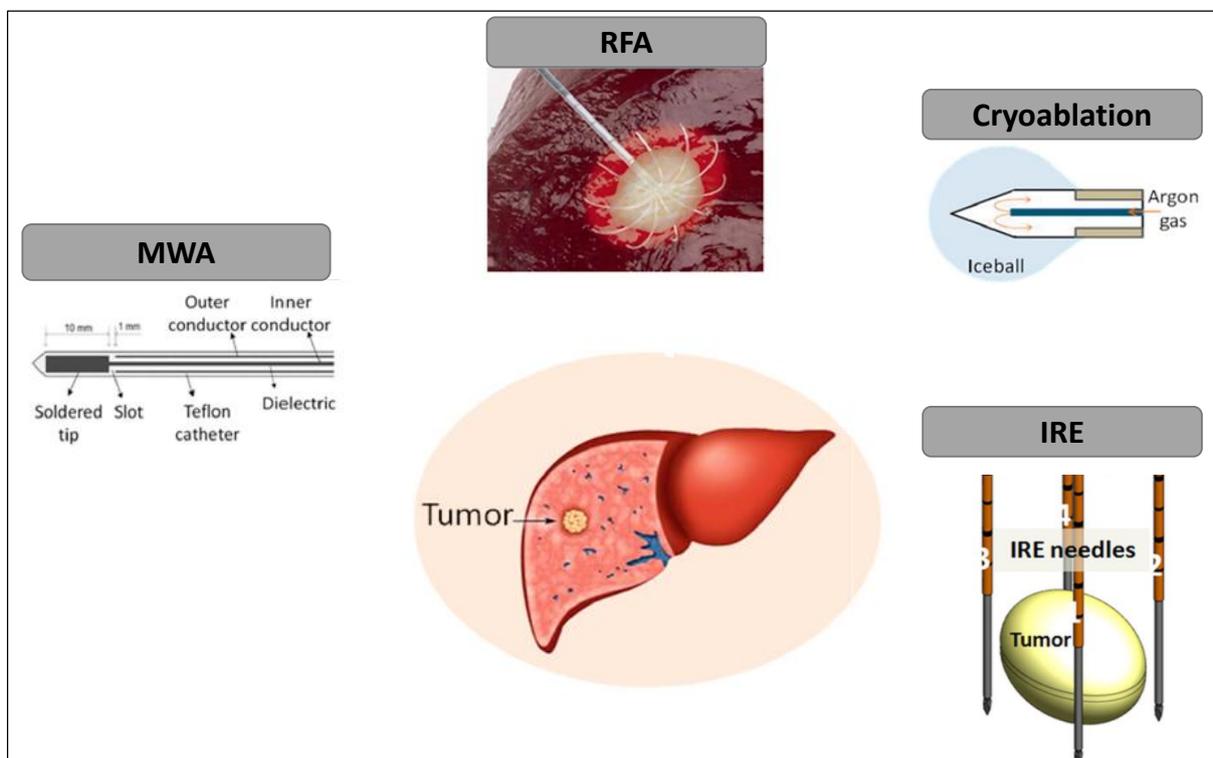


Figure 11 Les principaux traitements locorégionaux pour le traitement des métastases hépatiques. La radiofréquence (RFA), Les microondes, la cryoablation et l'électroporation irréversible (IRE). Adapté de (Schena et al. 2016)

3.3.1 La radiofréquence (RFA)

La RFA est la technologie la plus largement utilisée pour l'ablation locale des tumeurs primitives et métastatiques du foie. Les systèmes de RFA disponibles fonctionnent dans la gamme de fréquence de 375 à 500 KHz. Actuellement, la plupart des dispositifs utilisés sont monopolaires avec une seule électrode active émettant un courant dissipé sur une ou plusieurs plages de retour. Le courant alternatif généré induit une friction des molécules d'eau contenues dans les tissus et provoque leur échauffement, induisant ainsi une nécrose irréversible de la tumeur.

L'ablation par RFA peut être bénéfique aux patients atteints de CCR ayant des métastases hépatiques solitaires de 3 cm de diamètre maximum, avec aucune maladie extra hépatique (Hamada et al. 2012). Les taux de survie après RFA sont évalués à 38 - 49 % à 3 ans et à 22 - 24 % à 5 ans. Le temps de survie médiane est de 28,9 à 36,0 mois chez les patients présentant une métastase hépatique colorectale (Solbiati et al. 2001)(Berber, Pelley, et Siperstein 2005).

L'efficacité de de la RFA dans le traitement des métastases hépatiques est limitée par plusieurs facteurs : la résistance de la conduction tissulaire quand la température atteint 100 °C, une diffusion de la température sur de petites surfaces et des récurrences locales liées à la taille de la tumeur et à la proximité avec les vaisseaux (Gwak et al. 2011). En effet, un diamètre tumoral supérieur à 3 cm et une tumeur proche des vaisseaux à moins de 3 mm entraînent une récurrence importante après RFA. Des approches associant la chimioembolisation transartérielle et la RFA ont été utilisées pour augmenter l'efficacité de la RFA (Yamakado et al. 2017).

3.3.2 L'ablation par microondes (MWA)

L'ablation par microondes (MWA) est une technique d'ablation thermique par la chaleur qui s'applique particulièrement au traitement des tumeurs hépatiques. Les MWA peuvent générer des températures très élevées en très peu de temps, ce qui augmente l'efficacité de ce traitement sur des tumeurs plus grandes, avec une sensibilité moindre aux effets de dissipation de chaleur. Les systèmes MWA actuellement disponibles fonctionnent à des

fréquences de 915 MHz ou 2,45 GHz. Ces longueurs d'onde ont des propriétés physiques spécifiques en ce qui concerne la perméabilité des tissus. Plusieurs antennes micro-ondes peuvent être alimentées simultanément pour traiter une large tumeur ou plusieurs tumeurs au cours de la même procédure. Cette technologie continue de s'améliorer et apparaît comme une alternative à la RFA dans le traitement des métastases hépatiques (Lubner et al. 2010).

3.3.3 La cryoablation

Cette méthode détruit les tissus par congélation à environ -160°C , ou en alternant des cycles de congélation et de décongélation. Ainsi, les cellules tumorales subissent des effets cytotoxiques très importants par la perturbation des membranes cellulaires. Cependant, un syndrome de réponse inflammatoire sévère appelé 'cryoshock' peut être observé, généralement après la cryoablation d'une grosse tumeur hépatique. De plus, l'absence d'effets de cautérisation et de coagulation des vaisseaux lésés peut entraîner des complications hémorragiques. Cette technique a une application relativement limitée dans le traitement des tumeurs du foie jusqu'à présent, et les bénéfices d'efficacité et de sécurité sont actuellement à l'étude (Bala et al. 2013).

3.3.4 Electroporation irréversible (IRE)

Le terme IRE devrait être utilisé pour les technologies et les dispositifs qui provoquent la mort cellulaire par l'application répétée d'impulsions électriques de haute tension de courte durée créant des lésions irréversibles dans les membranes cellulaires. Bien qu'il puisse y avoir des effets sur les cellules liées à l'hyperthermie, le mécanisme de la mort cellulaire avec IRE est considéré comme étant essentiellement non thermique. L'IRE est réalisée sous anesthésie générale avec l'administration d'un agent bloquant neuromusculaire afin de prévenir la contraction musculaire et en utilisant la synchronisation cardiaque afin de prévenir les risques d'arythmies. Des expériences cliniques préliminaires ont suggéré que l'IRE préservait l'intégrité structurelle des voies biliaires et des vaisseaux et permettait un traitement fiable des tumeurs hépatiques situées à proximité de structures vitales (Wichtowski et al. 2016).

3.3.5 Les autres traitements locorégionaux

- Les traitements trans-artériels

Il existe un argument en faveur de l'utilisation de la chimiothérapie par perfusion artérielle hépatique (HAI) chez les patients atteints de CCRm. En effet, les métastases hépatiques sont vascularisées essentiellement par l'artère hépatique, tandis que le flux sanguin du tissu hépatique normal arrive par la veine porte. De plus, le traitement intra-artériel local contourne les effets de premier passage du foie, exposant les métastases hépatiques à des concentrations élevées de chimiothérapie, tout en réduisant la toxicité systémique de ces molécules (D. Wang, Louie, et Sze 2013).

La chimioembolisation trans-artérielle (TACE) a été principalement utilisée dans les tumeurs hyper vascularisées et consiste en la combinaison de l'injection d'une émulsion contenant des médicaments cytotoxiques suivie d'une embolisation avec des particules pour atteindre une concentration élevée de drogues dans la tumeur. Actuellement, le bénéfice de la TACE par rapport à la chimiothérapie systémique est incertaine ; aucun essai randomisé-contrôlé n'a été mis en place (Martin et al. 2012).

- La radioembolisation

La radioembolisation hépatique, ou traitement radio interne sélectif (SIRT), avec des microsphères chargées en radionucléide Yttrium-90 permet de cibler plusieurs métastases en une seule procédure. Cette technique fournit une dose élevée et localisée d'irradiation de la tumeur sur environ 14 jours tout en maintenant une exposition normale au rayonnement dans le tissu hépatique sain. Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation de microsphères de yttrium-90 + 5-FU ralentissait significativement la progression des métastases hépatiques en comparaison avec le 5-FU seul. Cependant, la survie globale des patients n'est pas améliorée. Cette procédure est donc proposée aux patients atteints de CCRm réfractaires à la chimiothérapie classique (Hendlisz et al. 2010).

3.4 Traitements locorégionaux et stimulation de la réponse immune

Ces dernières années, la capacité des traitements locorégionaux à induire une réponse immunitaire a été largement étudiée. Contrairement à la chirurgie, la tumeur n'est pas réséquée et le matériel antigénique et cellulaire est maintenu dans la zone d'ablation. Cet aspect des traitements locorégionaux est responsable de leur capacité à déclencher une réponse immunitaire antitumorale.

3.4.1 Réponse immune et RFA

L'hyperthermie par RFA augmente la libération, l'exposition ou la dénaturation des antigènes tumoraux qui sont captés par les DC (den Brok et al. 2004). En effet, la nécrose des cellules tumorales induit des signaux de danger et une activation du système du complément pouvant activer les DC sur le site du tissu endommagé et induire une réponse antitumorale T spécifique (Zerbini et al. 2006). De plus, le stress cellulaire augmente l'expression des molécules du CMH de type I qui activent les cellules NK, et les cellules T cytotoxiques (Gleimer et Parham 2003). La RFA induit également une diminution des Tregs (Fietta et al. 2009).

Par ailleurs, des effets pro-inflammatoires liés aux cellules nécrotiques, tels que l'activation des nucléoprotéines B1 et des protéines de choc thermique hsp70 (heat shock protein 70) et gp96, essentiels à l'activation d'une réponse cellulaire sont décrits. Après la RFA, les protéines de choc thermique libérées *in vivo* améliorent la réponse T spécifique (Hansler et al. 2006a). Ainsi, Hansler et al ont démontré une activation spécifique des lymphocytes T chez les patients ayant des métastases hépatiques colorectales traitées par RFA. Cependant, cet effet est insuffisant pour permettre une réponse complète et éviter la récurrence tumorale (Tanis et al. 2014), d'où la nécessité de l'amplifier pour obtenir un bénéfice clinique significatif (Figure 12).

3.4.2 Réponse immune et MWA

Cette technique étant moins utilisée que la RFA, seulement quelques études ont évalué les effets immunomodulateurs des MWA (Figure 12). Il a été montré une plus faible expression des protéines du choc thermique hsp70, et des cytokines IL-1 et IL-6 comparé à la RFA et à la cryoablation (Ahmad et al. 2010). Chez les patients, une augmentation des lymphocytes T

CD3⁺, des cellules NK et des macrophages a été observée dans les zones traitées par MWA et les tissus adjacents (Yan Liu et al. 2003).

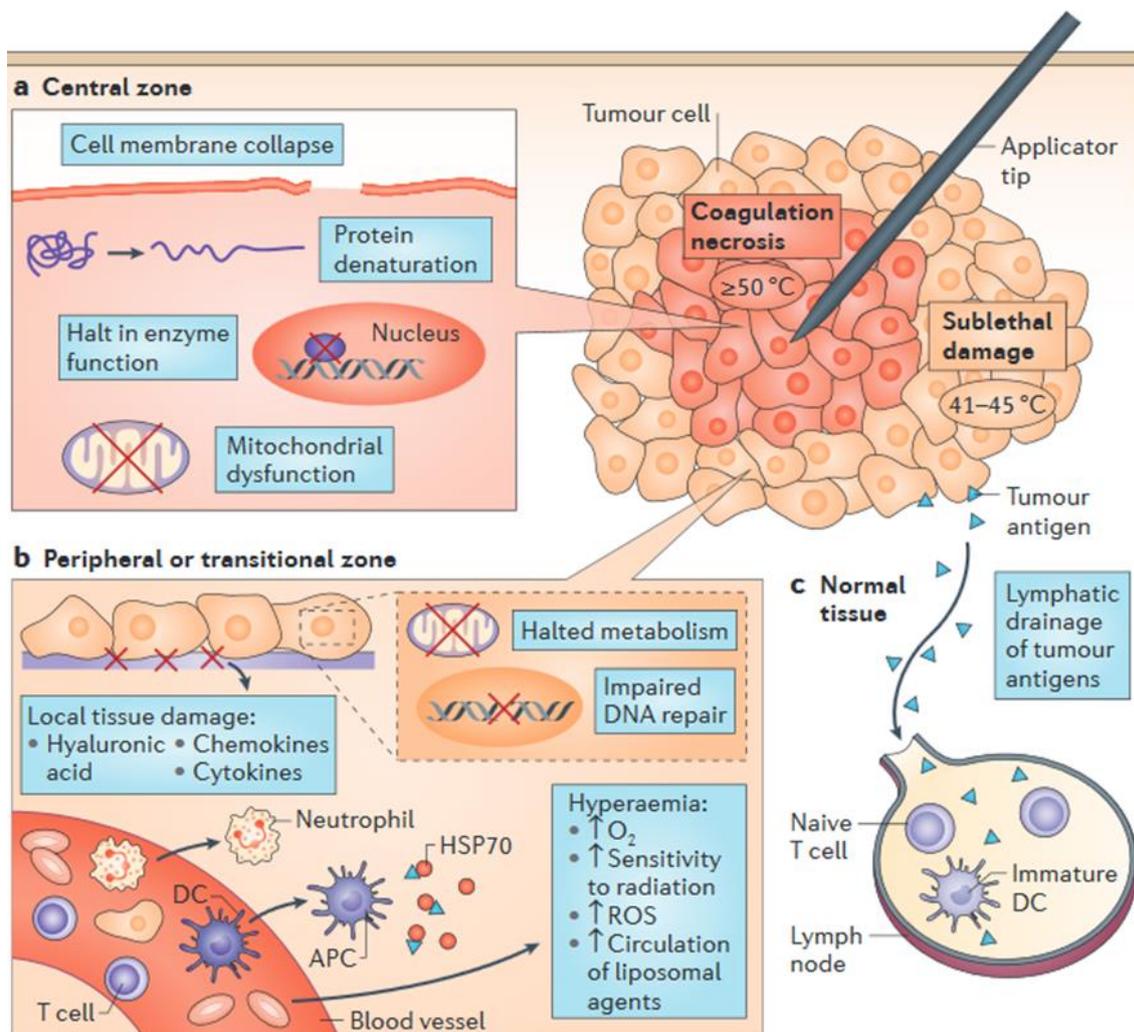


Figure 12 Mécanismes de réponse immune par la thermoablation. (a) La zone traitée subit une nécrose à des températures $\geq 50^\circ\text{C}$ et induit une dénaturation des protéines, l'arrêt de l'activité enzymatique et de la fonction ADN polymérase, et un dysfonctionnement mitochondrial. (b) La zone périphérique subit des dommages réversibles dus à la chaleur. Les fonctions métaboliques peuvent être perturbées. Le tissu local endommagé expose l'acide hyaluronique et des marqueurs de lésions endothéliales, ce qui stimule l'expression de molécules d'adhésion vasculaire et de chimiokines qui attirent les cellules immunitaires. Cette zone contient des infiltrats inflammatoires, notamment les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK, les DC, ainsi que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. La protéine de choc thermique 70 (HSP70) peut chaperonner les antigènes aux DC. (c) Dans les tissus environnants normaux, les vaisseaux sanguins provoquent un effet de dissipation thermique qui dissipe la température élevée et diminue l'efficacité de l'ablation. Les antigènes tumoraux libérés après la nécrose drainent vers les ganglions lymphatiques voisins, où ils peuvent stimuler les DC immatures et les cellules T naïves (Chu et Dupuy 2014).

3.4.3 Réponse immune et Cryoablation

Après cryoablation, les cellules subissent une nécrose libérant ainsi des antigènes tumoraux, des structures moléculaires associées au danger (DAMP) et des protéines de choc thermique associées à une augmentation des taux sériques d'IL-1, IL-6, et TNF- α (Basu et al. 2000). Les DC phagocytent les DAMP et activent la voie du facteur NF- κ B ce qui favorise l'expression de molécules Co-stimulatrices CD80⁺/CD86⁺ et la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T. Cependant, des études ont montré que la cryoablation pouvait induire à la fois des effets immunostimulants et immunosuppresseurs. Ceci dépend du taux de nécrose et d'apoptose qui varie en fonction du taux de congélation, du nombre de cycles de congélation et décongélation et de la taille de la zone de destruction. Ainsi, les cellules qui meurent par apoptose ne libèrent pas de DAMP essentiels à l'activation de la voie NF- κ B provoquant une anergie des DC et une suppression de la réponse immunitaire. La mort cellulaire par nécrose semble donc nécessaire à l'activation d'une réponse immunitaire (Sabel 2009). (Figure 13).

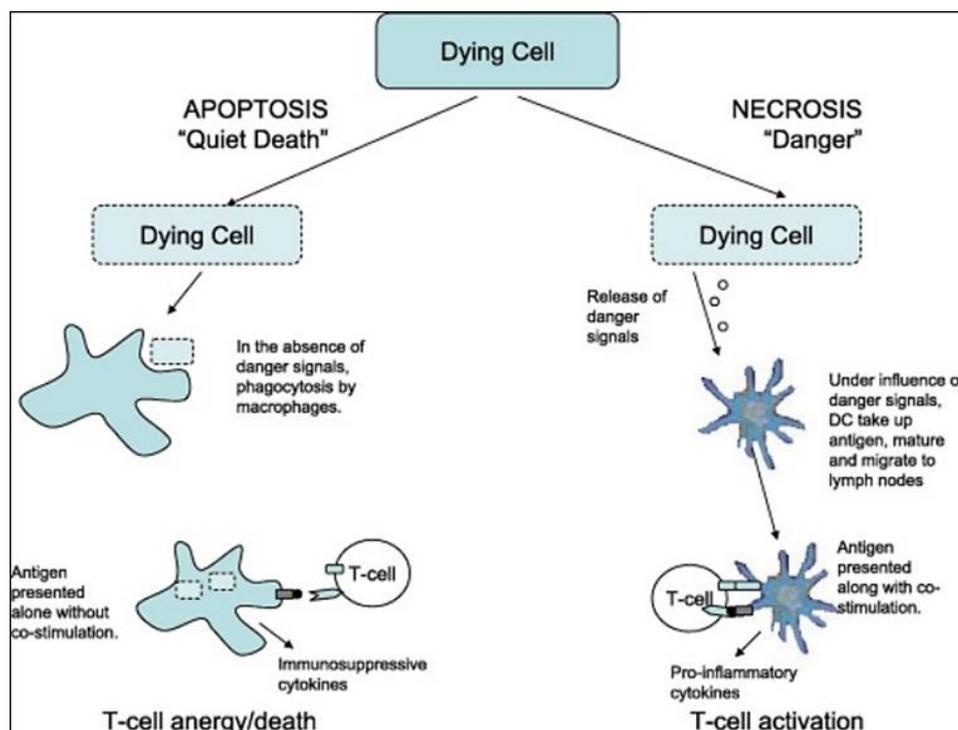


Figure 13 La mort cellulaire et la réponse immunitaire. La réponse immunitaire induite par la mort cellulaire dépend de la présence de signaux de danger. L'apoptose entraîne l'absorption de débris cellulaires sans provoquer d'inflammation ni libérer le contenu intracellulaire. Les CPA qui absorbent les cellules apoptotiques ne génèrent pas de réponse immunitaire et peuvent entraîner une délétion et une anergie. La mort cellulaire par nécrose est caractérisée par une dégradation cellulaire et une libération de contenu intracellulaire, dont les signaux de danger. Ces signaux favorisent la présentation croisée, la maturation des DC et l'activation des cellules T spécifiques à l'antigène.

3.4.4 Réponse immunitaire et radioembolisation

Les effets immunitaires de la radioembolisation sont encore peu étudiés. Les rayons émis provoquent la mort cellulaire et induisent la libération par les cellules tumorales de chimiokines comme le CXCL16, des cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-16, des signaux de danger ainsi que des antigènes tumoraux. Les DC captent et présentent les antigènes tumoraux aux cellules T CD4⁺ et T CD8⁺, entraînant une réponse immunitaire à médiation cellulaire systémique (Ghodadra et al. 2016).

3.5 L'immunothérapie dans le cancer colorectal

L'inefficacité des traitements dans le CCRm a conduit au développement de nouvelles molécules moins toxiques permettant d'améliorer la survie des patients. L'immunothérapie vise à restaurer la réactivité du système immunitaire pour lutter contre le cancer soit, en stimulant les réponses immunitaires ou en inhibant les mécanismes immunosuppresseurs (Figure 14). La possibilité d'utiliser le système immunitaire du patient pour le traitement du cancer été démontrée il y a plus de 100 ans lorsque Paul Ehrlich a proposé l'administration de cellules tumorales affaiblies (weakened tumor cells) comme vaccin contre la tumeur (Ehrlich 1909).

Puis, d'autres thérapies comme la thérapie cellulaire adoptive (ACT) ont été développées. L'ACT consiste à retirer les lymphocytes T des patients, à les exposer à des antigènes tumoraux spécifiques, puis à réinfuser les lymphocytes T ainsi activés. Les cytokines interviennent dans l'interaction entre les cellules CPA et les cellules T, ainsi que dans la conversion des cellules T naives en cellules CD8⁺. Les agonistes de TLR (par exemple, MGN1703) ont été testés dans le CRC. D'autres stratégies neutralisant les mécanismes immunosuppresseurs basées sur l'utilisation de la chimiothérapie par le cyclophosphamide, l'anti-CD25 qui neutralise les Tregs et, plus récemment, les anti PD-1 (Programmed cell death-1) et anti CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) qui empêchent l'inhibition des lymphocytes T par les cellules tumorales ou les cellules immunosuppressives ont été décrits (Farkona, Diamandis, et Blasutig 2016). PD-L1 et PD-L2 sont des ligands à la surface des cellules tumorales qui se lient aux récepteurs PD-1 sur les cellules T pour induire leur mort. Les anticorps anti-PD-1 se lient aux récepteurs PD-1, empêchant les interactions avec ses ligands. Les cellules T

expriment les antigènes CTLA-4, ceci représente une autre voie par laquelle le système immunitaire est régulé à la baisse. Les anticorps anti-CTLA-4 inversent l'effet immunosuppresseur lorsqu'ils se lient aux récepteurs CTLA-4 sur les cellules T (Lynch et Murphy 2016). Les cellules tumorales expriment des antigènes spécifiques qui peuvent activer les CPA en se liant aux molécules du CMH situées à leur surface cellulaire, qui à leur tour se lient aux TCR des cellules T. Les vaccins améliorent la réponse du système immunitaire contre les cellules cancéreuses en modulant l'interaction entre les CPA et les cellules T. (Figure 14).

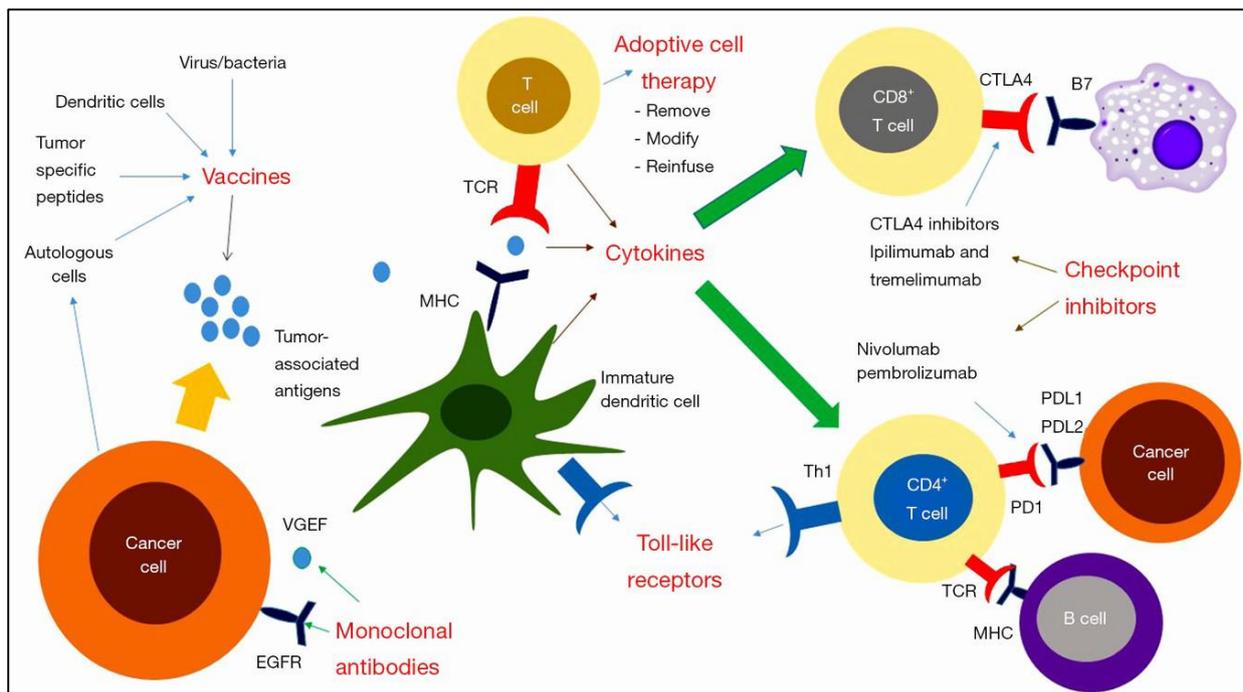


Figure 14 Composants de l'immunothérapie dans le cancer colorectal.

3.5.1 Les vaccins

Les vaccins ont été utilisés pour augmenter la réponse immunitaire dans de nombreux types de cancers. En effet, cette approche est basée sur la reconnaissance d'un ou plusieurs antigènes spécifiques de la tumeur par les cellules immunitaires. Plusieurs types de vaccins sont décrits dans la littérature : les cellules tumorales autologues, les vaccins peptidiques, les cellules dendritiques et les antigènes viraux et bactériens.

- Les vaccins autologues

Les cellules tumorales autologues sont extraites directement à partir de la tumeur du patient et expriment des antigènes entiers, connus ou non, spécifiques aux tumeurs de chaque patient. Cette approche diminue le risque d'échappement au système immunitaire comparé à des approches utilisant un seul peptide antigénique (Koido et al. 2005). Cependant, la majorité des antigènes dans le vaccin sont communs aux cellules normales et peuvent générer une réponse immunitaire non spécifique (Klebanoff et al. 2011). De plus, la difficulté de produire un vaccin universel qui pourrait être administré à tous les patients représente un inconvénient majeur de cette approche.

Les cellules tumorales autologues ont été largement utilisées dans le CCR mais leur efficacité est limitée. Les premiers essais cliniques ont utilisé des cellules tumorales associées au BCG comme adjuvant. Cependant, la plupart des études ne montrent aucune différence significative entre la survie des malades vaccinées et les témoins (Gray et al. 1989) ; (Harris et al. 2000). Plus tard, un vaccin antitumoral (OncoVax) contenant des cellules autologues irradiées et du BCG a été développé (Uyldegroot et al. 2005). Ainsi, chez les patients atteints d'un cancer du côlon de stade II, OncoVAX a augmenté le taux de survie à 5 ans de 15 %. De plus, le taux de récurrence a été réduit de 44 % chez les patients atteints d'un cancer du côlon stade II et III (Hanna, Jr 2012), mais ces patients ont développé beaucoup d'effets indésirables.

Une autre approche vaccinale avec des cellules tumorales irradiées infectées par le virus de la maladie de Newcastle a été proposée. Dans un essai clinique de phase II, des patients atteints de CCR ont été traités par les cellules tumorales irradiées après résection chirurgicale des métastases hépatiques. Environ 61 % des patients vaccinés ont développé une récurrence tumorale contre 87 % des patients avec reçu une résection seule (Schlag et al. 1992). Cependant, dans une étude randomisée de phase III incluant des patients atteints de CCRm, les patients vaccinés n'ont présenté aucune amélioration significative de la survie globale (Schulze et al. 2009).

- Les antigènes associés aux tumeurs

Contrairement aux cellules tumorales autologues dans lesquelles les antigènes ne sont pas identifiés, les vaccins peptidiques utilisent des épitopes identifiés d'un antigène pouvant être reconnus par les cellules T effectrices et induire une réponse immunitaire spécifique. Cette approche utilise des peptides dérivés des cellules tumorales, ce qui diminue le risque de maladies auto-immunes (Parmiani et al. 2002). Cependant, les vaccins peptidiques présentent une faible immunogénicité, ce qui favorise la récurrence tumorale (Bartnik, Nirmal, et Yang 2012).

Des antigènes associés aux tumeurs ont été la cible de vaccins peptidiques dans le CCR, par exemple ACE, EphA2 (Ephrin A2), β -hCG (human chorionic gonadotropin), SART3 (Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 3), p53, MUC-1 (Mucin-1), survivine 2B et RNF43 / TOMM34 (RING finger protein 43/ Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 34) (Lynch et Murphy 2016). La plupart des essais cliniques ont montré une induction d'une réponse immunitaire spécifique après la vaccination, médiée par des IgG spécifiques ou par l'activation des lymphocytes T ; cependant, peu d'essais ont montré une réelle augmentation de la survie des patients (Bartnik, Nirmal, et Yang 2012).

L'ACE est l'antigène le plus étudié dans le CCR. Il joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire et favorise l'apparition de métastases (Thomas et al. 2008). Le dosage plasmatique de l'ACE a été longtemps utilisé comme marqueur de la progression tumorale et de la récurrence post-chirurgicale. Cependant l'utilisation de l'ACE comme vaccin peptidique n'a pas montré d'amélioration de la survie des patients, probablement dû au manque de spécificité de cet antigène au CCR et sa présence dans les tissus normaux (Bilusic et al. 2014).

La β -HCG n'est pas exprimée par les tissus sains mais détectée chez 52 % des patients atteints de CCR. Son expression a été associée à une incidence plus élevée de métastases. De plus, cette hormone peut favoriser la néo-vascularisation et supprimer les réponses immunitaires (Lundin et al. 2001). Dans un essai de phase II, il a été montré une expression d'anti- β -hCG chez 73 % des patients vaccinés par le peptide ciblant le β -hCG mais la survie des patients n'était pas améliorée (Moulton et al. 2002). Plus récemment, un essai randomisé de phase II a étudié l'efficacité de la vaccination de patients atteints de CCRm avec des DC autologues modifiées pour exprimer le peptide ACE et MUC-1 simultanément. Cette association a induit

une réponse immunitaire spécifique contre ces antigènes et une amélioration de la survie des patients comparé aux patients non vaccinés (Morse et al. 2013).

Afin d'augmenter l'efficacité des vaccins peptidiques, des associations ciblant plusieurs épitopes antigéniques ont été proposées. Dans un essai de phase II, des patients atteints de CCRm ont été traités par un vaccin composé de cinq peptides dérivés de RNF43, TOMM34, KOC1 (chloroplast membrane 1), VEGFR1, et VEGFR2. Il n'a pas été observé de différence significative du taux de survie de ces patients (Hazama et al. 2014).

- Les antigènes viraux et bactériens

Le système immunitaire induit des réponses contre les agents infectieux, tels que les bactéries, les virus et les champignons. Ainsi, les vecteurs viraux ont été transfectés pour exprimer des antigènes tumoraux. De plus, leur immunogénicité naturelle agit comme un adjuvant pour aider à stimuler les réponses immunitaires spécifiques contre l'antigène tumoral.

Les lentivirus recombinants, les poxvirus, les adénovirus et les rétrovirus ont été utilisés dans les vaccins anticancéreux en raison de leur efficacité de transfection et de leur capacité immunomodulatrice (Mosolits, Nilsson, et Mellstedt 2005). Cependant, les vaccins viraux ont une efficacité limitée en raison des réponses immunitaires contre le vecteur, des coûts élevés et du potentiel pathogène et mutagène.

Plusieurs essais cliniques ont exploré l'efficacité de ces vaccins. Dans les années 1990, des patients atteints de CCR ont été immunisés par des vecteurs poxviraux recombinants exprimant l'ACE (J. Marshall 2006). Une réponse T cytotoxique spécifique à l'antigène ACE a été observée mais les réponses cliniques chez les patients vaccinés étaient faibles. Plus tard, des vecteurs poxviraux exprimant l'ACE ainsi que la molécule co-stimulatrice B7-1 ont été étudiés (von Mehren et al. 2000). Des essais cliniques plus récents incluant un poxvirus (le Fowlpox) exprimant l'ACE et les trois molécules co-stimulatrices B7-1, ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) et LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3) ont montré une meilleure efficacité, induisant des réponses immunitaires et produisant une stabilisation de la maladie chez 40 % des patients (J. L. Marshall et al. 2005).

Par ailleurs, des études précliniques se sont intéressées à l'utilisation de vecteurs viraux qui expriment MUC1 (Singh et Bandyopadhyay 2007) et GUCY2C (guanylyl cyclase C)(Snook et al. 2008) dans le CCR. En effet, MUC1 est une glycoprotéine exprimée dans la muqueuse intestinale et surexprimée dans 70 % des CCR, alors que GUCY2C est exprimée préférentiellement dans les CCRm. Ces études ont démontré des résultats prometteurs chez la souris, ce qui suggère l'utilisation de ces épitopes comme cibles de vaccins pour le traitement du CCR.

- Les cellules dendritiques

Les DC sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, l'utilisation de vaccins à base de DC pour le traitement du cancer est un concept décrit depuis plusieurs années. En effet, les DC de patients activées *ex vivo* avec des antigènes associés aux tumeurs (TAA) ou des lysats de cellules tumorales sont réinjectées au patient pour induire une réponse immunitaire spécifique à la tumeur (Sabado, Meseck, et Bhardwaj 2016). Actuellement, le Sipuleucel-T est le seul vaccin à base de DC approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du cancer de la prostate (Wesley et al. 2012).

Dans le CCR, les vaccins à base de DC activées par l'ACE, TAA présent sur la plupart des tumeurs colorectales, ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques. Ces vaccins étaient efficaces pour générer une réponse antitumorale spécifique à l'ACE (Nair et al. 1999). Cependant, aucun essai de suivi n'a pas démontré d'efficacité sur la survie des patients. Un autre essai clinique a évalué l'efficacité des vaccins DC à base de vecteurs antirétroviraux. Il a été ainsi observé une persistance de l'immunité antitumorale spécifique à ce vaccin pendant deux ans, associée à une prolongation de la survie des patients (Shimodaira et al. 2015). Malgré l'efficacité des vaccins DC dans le CCR, leur utilisation est limitée à cause des coûts importants de production et de la demi-vie courte des DC une fois administrées au patient.

3.5.2 Les TLR

Les TLR (Toll like receptor) tirent leur nom du gène Toll identifié chez la drosophile (Medzhitov, Preston-Hurlburt, et Janeway 1997) ; ce sont des récepteurs majeurs des cellules

de l'immunité innée. Actuellement dix TLR (TLR-1 à TLR-10) ont été identifiés chez l'homme (Thompson et al. 2011). Les divers signaux de danger DAMP qui peuvent être générés par la mort des cellules tumorales sont reconnus par les TLR qui se trouvent sur les CPA. Ceci favorise l'activation d'une cascade de signalisation des voies des MAP Kinases et de NF- κ B aboutissant à l'augmentation de la transcription des gènes qui codent pour les cytokines pro-inflammatoires. En effet, cette voie de signalisation induit l'augmentation de l'expression de CMH II, CD88⁺ et CCR7 sur les CPA permettant ainsi une augmentation de la présentation et de la reconnaissance des antigènes tumoraux. De plus, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IFN- γ augmente l'expansion et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Banerjee et Gerondakis 2007).

Il a été démontré que l'activation des TLR par les signaux de danger générés par la mort des cellules cancéreuses augmentait la réponse immunitaire. Actuellement, trois agonistes de TLR sont approuvés par la FDA dans le traitement du cancer : Le Bacille de Calmette-Guérin (BCG), le Monophosphoryl lipid A et l'imiquimod (Vacchelli et al. 2012).

En 1971, il a été démontré que l'administration intra-lésionnelle de BCG permettait de réduire le volume tumoral et d'éviter l'apparition de métastases (Zbar et Tanaka 1971). Vingt ans plus tard, le BCG a été approuvé par la FDA dans le traitement du cancer superficiel de la vessie. Le BCG induit une réponse immunitaire non spécifique après liaison aux récepteurs TLR2/TLR4 sur les CPA. En effet, l'injection intravésicale du vaccin augmente l'infiltration de la tumeur par les cellules granulocytaires et les macrophages et une augmentation de l'expression des cytokines Th1 comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12 (Böhle, Jocham, et Bock 2003). Plusieurs études cliniques ont testé le BCG comme adjuvant dans le cancer du sein (NCT00003184), du poumon (NCT00003279), de l'ovaire (NCT00003386), ou du mélanome (NCT00671554). Un essai de phase III a évalué l'efficacité de cellules tumorales autologues combinées au vaccin BCG après résection chirurgicale chez 412 patients atteints de cancer du côlon de stade II et III. Ainsi, 79 % des patients traités par cette stratégie ont développé une hypersensibilité retardée mais il n'y avait pas de d'augmentation de la survie sans récurrence et de la survie globale. Cependant, le taux de survie à 5 ans était supérieur pour les patients traités par cette stratégie (Harris et al. 2000).

D'autres agonistes des TLR ont été utilisés dans le traitement du CCR. Le TLR-9 protège la muqueuse colorectale de la transformation maligne (Eiró et al. 2012). Les premiers agonistes

de TLR-9 utilisés dans le traitement du cancer sont les CpG oligodésoxynucléotides (CpG-ODN). Cependant, ces molécules ont montré une faible efficacité et une haute toxicité chez les patients (Vollmer et Krieg 2009). Un autre agoniste TLR-9, le MGN1703, a été proposé comme traitement d'entretien chez les patients atteints de CCRm. Dans le cadre d'un essai de phase II, il a été observé une augmentation de la survie des patients ayant reçu le MGN1703 après une première ligne de chimiothérapie. Cependant ces résultats ont été contredits et associés à la présence d'une réponse immunitaire liée à la chimiothérapie (Schmoll et al. 2014).

3.5.3 La thérapie cellulaire adoptive (ACT)

La thérapie cellulaire adoptive (ACT) est une sorte d'immunothérapie passive basée sur le transfert de cellules immunitaires autologues activées ou modifiées *ex vivo* afin d'éviter leur inactivation par le microenvironnement tumoral une fois injectées (Restifo, Dudley, et Rosenberg 2012). La thérapie cellulaire par les lymphocytes T autologues infiltrant la tumeur a montré les résultats les plus intéressants dans le traitement des cancers (Rosenberg et al. 2011). Cependant, cette stratégie est limitée par la durée de vie des lymphocytes *in vivo* après injection, leur faible mémoire immunitaire et le temps et le coût associés à leur production (Xiang et al. 2013).

Dans le but d'améliorer l'efficacité de l'ACT, des modifications génétiques ont été apportées aux cellules T. Ainsi, les CAR T-cells (cellules T porteuses d'un récepteur chimérique) sont des lymphocytes T du patient, prélevés, puis modifiés génétiquement *in vitro* de manière à leur faire exprimer un récepteur artificiel, dit chimérique. Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extracellulaire reconnaisse spécifiquement un antigène tumoral. Tandis que la partie intracellulaire se compose de plusieurs domaines impliqués dans l'activation des lymphocytes T après fixation sur les cellules tumorales (Figure 15). Les CAR T-cells ont montré une grande efficacité dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (Grupp et al. 2013). Dans le CCR, les premières études ont montré des résultats intéressants. Ainsi, dans une étude de phase I / II, la survie à 24 mois était de 55 % chez les patients transfusés par des CAR T cells comparé à 17 % chez les témoins (H. Zhang et al. 2016).

CAR: Modular Design

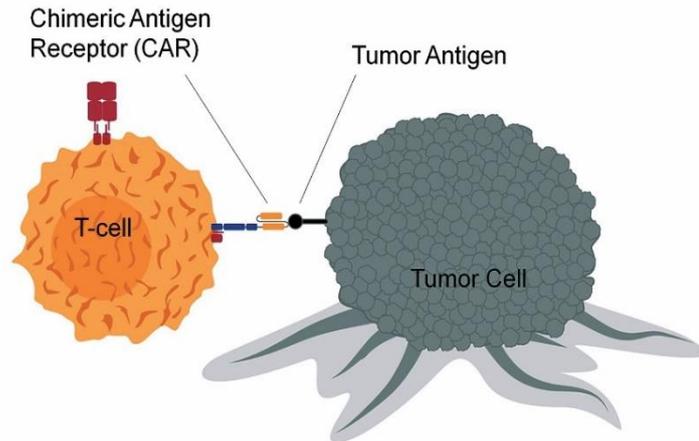
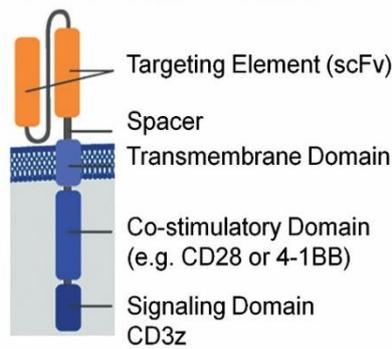


Figure 15 Les CAR T cells. Le domaine extracellulaire comprend le segment (scFv) de l'anticorps monoclonal qui est utilisé comme élément de ciblage. Ce scFv est lié à un domaine d'espacement. En liant le domaine extracellulaire à un domaine transmembranaire du CD28 humain ou au domaine cytoplasmique du 4-1BB humain, le récepteur est ancré dans la membrane cellulaire du lymphocyte T. Pour l'activation de la cellule T, un domaine de signalisation est alors utilisé, principalement CD3 (Helen Albert.2016).

3.5.4 Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines synthétisées par les cellules du système immunitaire et jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée et acquise. Ces protéines sont similaires aux hormones et peuvent agir de manière autocrine et paracrine. L'IFN- α et IFN- γ , l'IL-2, le GM-CSF et l'IL-12 sont les principales cytokines utilisées dans le traitement du cancer. Actuellement, seule l'IL-2 est approuvée par la FDA pour le traitement des cancers rénaux et du mélanome (Fyfe et al. 1995) ; (Atkins et al. 1999). Par ailleurs, peu d'études ont évalué l'efficacité des cytokines dans le traitement du CCR, probablement à cause de leur toxicité.

3.5.5 Les inhibiteurs de l'immunité checkpoint

Les inhibiteurs du checkpoint ont suscité un grand intérêt ces dernières années dans le traitement du cancer. Les cellules tumorales ont la capacité de réguler les molécules Co-inhibitrices du complexe CMH-TCR, comme PD-1, PD-L1, PD-L2 (Programmed death-ligand 2), CTLA-4, TIM-3 (mucin domain 3), IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase) et LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) pour inhiber la réponse immunitaire et entraîner une apoptose ou un dysfonctionnement des lymphocytes T. Les inhibiteurs du checkpoint sont des anticorps

monoclonaux capables de réactiver le système immunitaire afin de contrôler la prolifération des cellules tumorales (Figure 16).

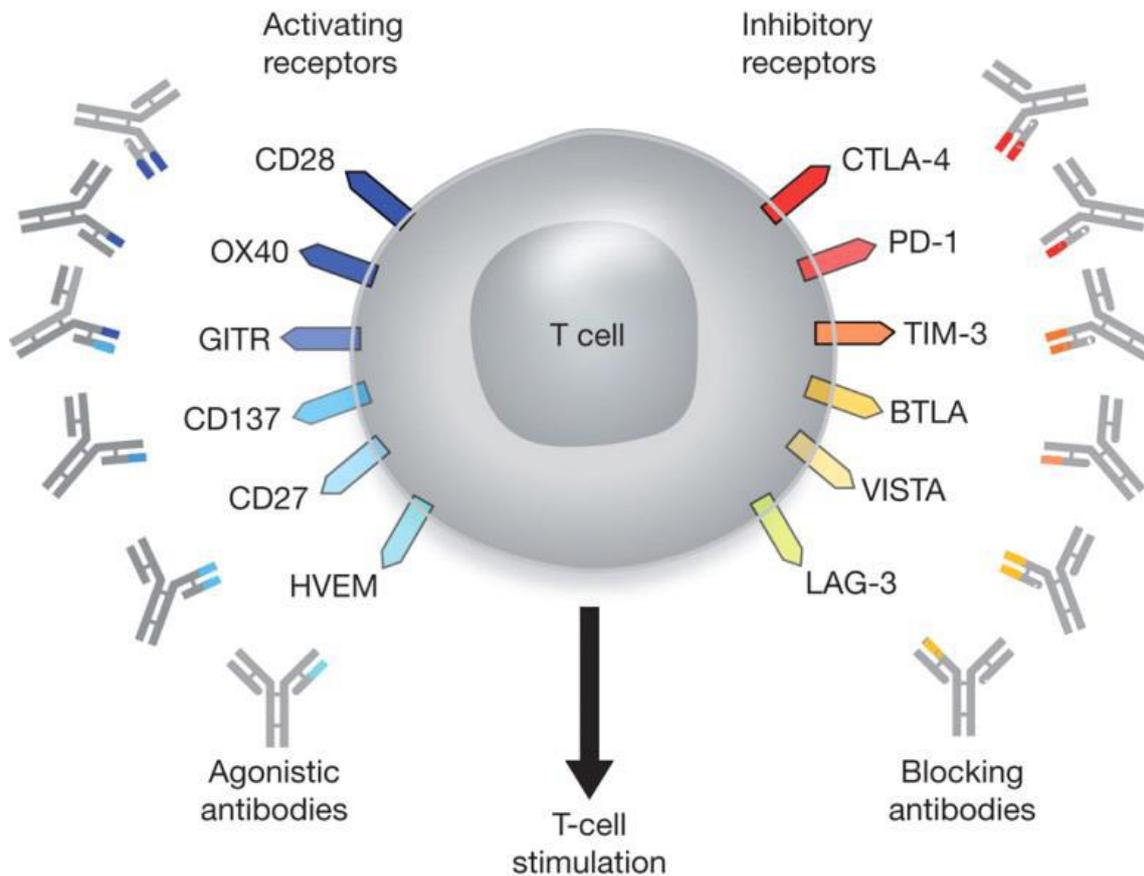


Figure 16 Les principaux checkpoint activateurs et inhibiteurs. Des agonistes anti-CD28, anti-OX-40 principalement sont utilisés pour activer les récepteurs CD28 et OX-40. Des antagonistes anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-TIM-3, et anti-LAG-3 permettent de bloquer les récepteurs inhibiteurs CTLA-4, PD-1, TIM-3 et LAG-3.

- PD-1

PD-1 (CD279) est exprimé sur de nombreux types de cellules, notamment les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, les cellules NK, les cellules B et les monocytes activés. PD-1 possède deux ligands : PD-L1 (B7-H1, CD274) ou PD-L2 (B7-DC, CD272). Le PD-L1 est généralement exprimé à la surface des cellules tumorales mais également, de façon constitutive, sur les cellules T et B, les DC, les macrophages, les cellules souches mésenchymateuses et les mastocytes dérivés de la moelle osseuse. De plus, l'expression de PD-1 est augmentée dans les TILs, tandis que PDL-1 est surexprimé dans les tumeurs. La liaison de PD-1 à ses ligands PD-L1 et PD-L2 inhibent directement l'apoptose des cellules tumorales, favorisent l'exhaustion des lymphocytes T effecteurs et induit leur différenciation en Tregs (Francisco et al. 2009). La

régulation à la hausse de PD-L1 sur les tumeurs inhibe la réponse locale antitumorale médiée par les lymphocytes T (W. Ma et al. 2016). Il a été montré que le blocage de la liaison PD-L1 / PD-1 augmente le nombre de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ périphérique ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ infiltrant la tumeur sont augmentés alors que l'expression de cytokines suppressives comme l'IL-10 est diminuée.

Actuellement, deux inhibiteurs de PD-1 sont utilisés en clinique : le Nivolumab dans le traitement du mélanome, du cancer du poumon non à petites cellules, du rein, de la tête et du cou, et de la vessie. Le Pembrolizumab est utilisé dans le traitement du mélanome, du cancer du poumon, du rein et de la tête.

Dans le CCRm, l'efficacité du Nivolumab est limitée aux tumeurs de type MSI qui ne représentent que 15% des CCR (Smith et Desai 2018). Aucune réponse objective n'a été montrée chez les patients atteints de CCR de type MSS (Le et al. 2015). Ceci peut être expliqué par la plus forte expression des molécules CTLA-4, PD-1 et LAG-3 dans les CCRm MSI par rapport aux tumeurs MSS (Llosa et al. 2015).

- CTLA-4

La molécule CTLA-4 est exprimée sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et se lie avec une forte affinité aux molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) présentes sur les CPA. La liaison entre le récepteur CD28 et CTLA-4 empêche le contact entre le CD80⁺/CD86⁺ et leur récepteur, CD28, exprimé sur les lymphocytes T et induit un signal inhibiteur conduisant à la diminution de la prolifération des lymphocytes T et de l'expression d'IL-2. L'anticorps anti-CTLA-4 induit une réponse partielle dans le CCRm (Chung et al. 2010), mais les patients traités déclenchent des effets secondaires majeurs, comme les maladies auto-immunes, ce qui limite son utilisation (Di Giacomo, Biagioli, et Maio 2010).

- TIM-3

TIM-3 contribue aussi à l'épuisement des lymphocytes T CD8⁺ (Zhou et al. 2015). En effet, TIM-3 est exprimé sur les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur, se fixe la Galectin-9 exprimée par les cellules tumorales. Ceci entraîne une perturbation du cycle cellulaire qui

conduit à l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ et une diminution de la sécrétion des cytokines effectrices IFN- γ , IL-2 et TNF- α . De plus, les Tregs exprimant TIM-3 produisent de grandes quantités de molécules suppressives tel l'IL-10 qui inhibent également l'activité des cellules T CD8⁺ infiltrant la tumeur (Anderson 2014). Des études récentes se sont intéressées au blocage de la voie TIM-3 dans les cancers. Il a été démontré, dans un modèle murin, que l'administration d'un anticorps anti-TIM3 diminue l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ et inhibe la croissance tumorale par le blocage de la voie de signalisation TIM-3/Galectin-9 (Kang et al. 2015). Actuellement, les anticorps anti-TIM-3 sont en phase I de développement clinique dans le CCR. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de TIM-3 dans les CCR a été associée à un faible pronostic chez les patients (M. Yu et al. 2017).

- IDO

IDO est une enzyme intracellulaire qui catabolise le tryptophane en Kynurenine qui induit une inhibition de l'activation des cellules T, une augmentation des Tregs et une sécrétion d'IDO par les DC. De plus, la déplétion du tryptophane, acide aminé essentiel aux fonctions cellulaires, accentue la mort des cellules T. Une surexpression de IDO provoque, donc une tolérance immunitaire aux antigènes tumoraux par la suppression de l'activité des cellules T et NK, la génération des cellules suppressives de l'immunité et l'augmentation de l'angiogenèse tumorale (Prendergast et al. 2014). Une étude a montré que l'inhibition de IDO, chez la souris, est associée à une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et à une diminution du taux de Tregs, cependant il n'a pas été observé de régression des tumeurs (Takamatsu et al. 2015). Dans les CCR, la surexpression de IDO est associée à l'apparition de métastases hépatiques et à la diminution de la survie globale des patients (Ferdinande et al. 2012). Un essai clinique en cours propose l'association d'une molécule anti-IDO (Epacadostat) avec le Pembrolizumab et l'azacitidine dans le traitement du CCR de type MSS (NCT02959437).

- LAG-3

D'autres molécules inhibitrices telles que LAG-3 sont exprimées sur les lymphocytes T activés. LAG-3 interagit avec le CMH de classe II, ce qui inhibe la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ (Huard et al. 1994). De plus, LAG-3 agit en synergie avec PD-1 et induit une exhaustion des

lymphocytes T CD8⁺ aboutissant à un état tolérance immunitaire (Grosso et al. 2007). LAG-3 a été associé à la progression du CCR et sa surexpression dans les type MSI en fait une cible pour l'utilisation des inhibiteurs de LAG-3 (Llosa et al. 2015). Actuellement, une étude de phase II (NCT02060188) propose d'associer un anti-LAG-3 avec le nivolumab dans le traitement des CCR MSI.

- OX-40

OX-40 (CD 134) est une glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes T activés. Elle agit comme une molécule Co-stimulatrice des cellules T par le biais de la voie du facteur de transcription NF- κ B. OX-40 possède un ligand OX-40L présent à la surface des CPA, des cellules endothéliales activées, et des lymphocytes B et T. Une régulation positive de l'OX-40 est observée sur les lymphocytes T CD4⁺. En effet, les cellules T CD4⁺ activées reçoivent un signal Co-stimulateur médiée par l'OX-40 qui provoque une prolifération accrue, une production de cytokines et une augmentation de la survie des cellules T mémoires spécifiques de l'antigène (So et al. 2006). Par ailleurs, OX-40 est fortement exprimé sur les cellules Tregs, cependant, le mécanisme induit n'est pas totalement élucidé. Certaines études soutiennent que l'exposition aux anti-OX-40 favorise la réponse des cellules Tregs et d'autres suggèrent que les anti-OX-40 bloquent les fonctions suppressives des Tregs (Aspeslagh et al. 2016).

Une étude préclinique a montré que l'administration d'un agoniste OX-40 entraînait une progression tumorale retardée et un bénéfice significatif de la survie dans un modèle murin de CCR (Bulliard et al. 2014). Chez l'homme, il a été observé une forte expression de OX-40 sur les TILs dans 50 % des tumeurs colorectales corrélée à une meilleure survie globale des patients (Petty et al. 2002). Un essai clinique est actuellement en cours pour l'évaluation de l'anticorps monoclonal anti-OX-40 chez les patients atteints de CCRm (NCT02559024).

3.6 Combinaison traitements locorégionaux et immunothérapie

Les traitements locorégionaux ont montré un potentiel immunomodulateur dans le traitement du CCR. Non seulement ces techniques détruisent la masse tumorale, mais elles libèrent également du matériel antigénique, induisent une inflammation et génèrent des

signaux de danger. Un avantage potentiel de ces traitements est qu'ils génèrent une source permanente d'antigènes tumoraux capable d'induire une réponse antitumorale. Cependant, cette réponse seule ne suffit pas pour éviter la récurrence locale et l'apparition de tumeurs distantes. Les combinaisons avec l'immunothérapie devraient améliorer les réponses antitumorales (Fagnoni et al. 2008).

Nous nous sommes intéressés aux principales études combinant les traitements locorégionaux et l'immunothérapie. Chez l'homme, deux essais cliniques sont décrits. Une étude a évalué l'efficacité de la cryothérapie associée à l'administration de cellules T allogéniques activées (NCT00861107) dans le CCRm. Les résultats de cette étude n'ont pas été publiés. Une étude de phase II en cours évalue l'efficacité de la RFA combinée à un anti-PDL-1 et un anti-CTLA-4 chez des patients ayant des métastases du foie (NCT03101475).

Chez la souris, la plupart des études menées sur des modèles de CCR se sont intéressées à l'amélioration de la réponse immunitaire induite par la RFA. Ainsi, l'association de la RFA à l'administration de DC activées *in vitro* induisait une inhibition de la croissance tumorale chez les souris porteuses de tumeurs de colon MC38 (Nakagawa et al. 2014). Une autre étude a montré une inhibition de la récurrence locale et une amélioration de la survie des animaux traités par la RFA et le vaccin ACE (Gameiro et al. 2013). Plus récemment, Shi et al ont décrit une amélioration de l'efficacité de la RFA par le blocage de la voie PD-1/PDL-1 (Shi et al. 2016).

4. L'immunomodulation locale

L'administration systémique d'immunothérapie fournit des concentrations de vaccins très faibles sur le site de la tumeur limitant ainsi leur biodisponibilité locale. De plus, ce mode d'administration expose les tissus sains aux agents immunomodulateurs, ce qui peut induire des effets indésirables liés au système immunitaire. Ainsi, La délivrance locale d'immunothérapie permettra d'augmenter les concentrations des vaccins et leur biodisponibilité dans la tumeur. De plus, l'immunothérapie intratumorale entraîne une diffusion systémique plus faible et réduit l'exposition des tissus sains aux immunomodulateurs, limitant ainsi leur toxicité systémique. Cette stratégie favorise une réponse immunitaire locale qui permet d'induire un effet à distance (Figure 17). Enfin, l'immunothérapie intratumorale offre la possibilité d'effectuer des tests locaux de dose à effet (A Marabelle et al. 2017).

Dans ce chapitre, nous proposons une revue qui décrit l'intérêt de l'immunomodulation locale dans les cancers digestifs. En effet, le traitement des tumeurs digestives peu par les traitements locorégionaux est une source d'antigènes tumoraux. L'immunomodulation intratumorale permettrait d'augmenter la réponse immunitaire spécifique à ces antigènes et induire ainsi des effets sur les tumeurs traitées et les tumeurs à distance.

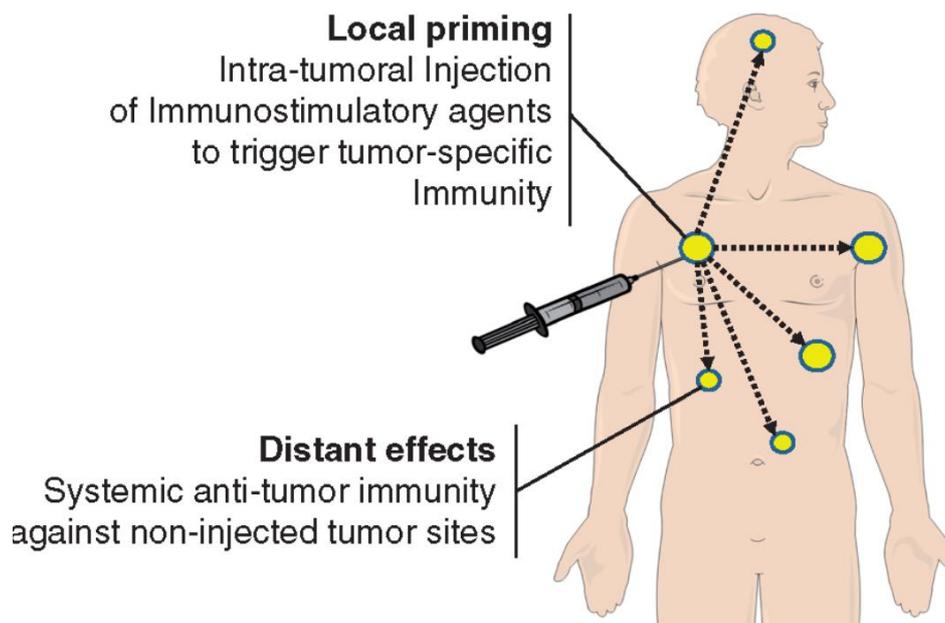


Figure 17 L'injection intratumorale d'agents immunostimulants pour un priming efficace de la réponse immunitaire antitumorale. Lors de la circulation dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins, les effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale peuvent attaquer les tumeurs à distance.

Local immunomodulation in digestive cancers (Manuscrit en cours de rédaction)

1. Digestive cancers

Digestive cancers remain the most common cancers in the world. Than more 300 000 new cases were estimated in 2017 (Siegel, Miller, et Jemal 2017). Between 2005 and 2015, 832,000 deaths from colorectal cancer (CRC), 818.9,000 from gastric cancer (GC), 810.5,000 from liver cancer (LC) and 439,000 from cancer of the esophagus (OC) have been registered (H. Wang et al. 2016).

Digestive organs developed from primitive gut tube, sharing similar lining of epithelium and structures. They are strongly associated with chronic inflammation status, including the infection of hepatitis B or C virus in hepatocellular carcinoma (HCC) (M. W. Yu et Chen 1994). H. pylori infection in gastric cancer and inflammatory bowel diseases in colorectal cancer (Watanabe et al. 1998) (Mantovani et al. 2008). However, the mechanisms of chronic inflammation in carcinogenesis of digestive cancer do not completely well understand.

Actually, therapies of digestive cancers are limited. Surgery still the standard treatment when it is possible (Malafosse et al. 2001). Locoregional treatments, such as radiofrequency ablation (RFA), microwave (MWA), or cryoablation were developed to treat unresected lesions (Park et al. 2014). These techniques revealed systemic immune response in patients; however this effect is not sufficient to avoid local and distant recurrence (Hansler et al. 2006a). Some studies investigated the immune response potential of these techniques and the methods to increase their efficacy (Chu et Dupuy 2014). In this literature review, we will expose the different locoregional treatments used on clinical practice for the treatment of digestive cancers and their clinical outcomes. Then, we will discuss the use of local immunotherapy in clinical trials and animal studies. Finally, we will demonstrate the benefit of locoregional treatment combined with local immunotherapy.

2. Locoregional treatment techniques

The term “tumor ablation” is defined as the direct application of chemical or energy-based (thermal and non-thermal) therapies to treat focal tumors.

1.1 Radiofrequency ablation (RFA)

RFA is the most widely used technology for local ablation of primitive and metastatic liver tumors. The available RFA systems operate in the frequency range from 375 to 500 KHz. Currently, most of the used devices are monopolar with a single active electrode emitting a dissipated current. The generated alternating current induces tissues heating and causes irreversible necrosis of the tumor (1). The ability of RFA to achieve complete tumor eradication appears to be dependent on the tumor size and location. Tumor diameter greater than 3 cm and tumor adjacent to vessels of 3 mm or more result in a substantial drop in the rate of complete tumor ablation (2).

1.2 Microwave Ablation (MWA)

Microwave ablation (MWA) is a thermal ablation technique used on the treatment of hepatic tumors. MWA can produce very high temperatures in a very short period of time, which increases the effectiveness of this treatment on larger tumors. The currently available MWA systems operate at frequencies of 915 MHz or 2.45 GHz. These wavelengths have specific physical properties for the tissues permeability. Multiple microwave antennas can be served simultaneously to treat a large tumor or multiple tumors in the same procedure. This technology seems an alternative of RFA on the treatment of hepatic metastases (3).

1.3 Cryoablation

This method destroys tissues by freezing at -160°C , or by alternating freezing and thawing cycles. Thus, tumor cells undergo very significant cytotoxic effects by disruption of cell membranes. However, a severe inflammatory response syndrome called 'Cryoshock' can be observed, usually after the cryoablation of a large hepatic tumor. The absence of and coagulation effects of injured vessels can lead to hemorrhagic complications. This technique has a relatively limited application in the treatment of liver tumors. The efficacy and safety of cryoablation are currently on study 4.

1.4 Irreversible Electroporation (IRE)

The term IRE is used for technologies and devices that cause cell death by repeated application of short-lived, high-voltage impulses that create irreversible lesions in cell

membranes. The IRE is performed under general anesthesia with the administration of agent to prevent muscle contraction under cardiac synchronization to prevent the risk of arrhythmias. Preliminary clinical studies have suggested that IRE maintain the structural integrity of vessels and allows reliable treatment of hepatic tumors near vital organs structures (5).

2. Locoregional treatment applications in digestive cancers

2.1 Hepatocellular carcinoma (HCC)

Radiofrequency ablation (RFA) is the recommended locoregional treatment on HCC, as an alternative to surgery or transplantation (6). The efficacy of RFA is comparable to surgery on small hepatocellular carcinoma associated with less post-surgical complications. (7). RFA demonstrated a complete response on 90 % of treated patients; however, the overall survival at 1 and 3 years was less than surgery (8). Several data showed that RFA can activate a specific immune response to the tumor antigen in metastatic liver patients associated with an increase of circulating T cells after stimulation with tumor autologous antigens (9,10). However, no study demonstrated an enhancement of TILs on distant metastases after RFA. Researchers are beginning to investigate the ability of additive immunotherapies to enhance the immune response of RFA on cellular hepatocarcinoma.

MWA is proposed to overcome RFA limits and to treat metastases more than 2.5 cm. Complete ablation was showed in 97 % of patients and the local recurrence rates was 8.5 % at 11 months (11). Recently, MWA was considered as effective and safe way to treat early-stage HCC adjacent to large vessels (12). However, the published data comparing RFA and MWA are contradictory. The first retrospective study compared two groups of patients who received RFA or MWA for the treatment of 2.5 cm tumor diameter. They showed non-significant difference in local recurrence between RFA and MWA; 21 % and 11 % respectively (13). Moreover, on Phase II study, it was not found that MWA was more effective than RFA for treatment of hepatocellular carcinoma lesions of 4 cm or smaller and the proportion of local recurrence was comparable on the both techniques (14). In contrast, Facciorusso

showed on a meta-analysis study on 774 patients that MWA is more effective to treat larger HCC neoplasm as compared to RFA (15).

2.2 Colorectal cancer metastases

More than half of all patients with colorectal cancer (CRC) develop liver metastases during the disease, and 15–25 % of these patients have liver metastases at the time of the diagnosis. Surgery still the standard treatment of colorectal liver metastases, however, approximately 80% of patients with colorectal liver metastases are not candidates to the surgery because of the liver tumor distribution, hepatic functional reserve, or presence of extrahepatic disease. Many studies have demonstrated outcomes of RFA for colorectal liver metastases and patients who can benefit from patients with colorectal liver metastases who have a solitary liver metastasis 3 cm or smaller in diameter, no extrahepatic disease, or controllable lung metastases (16). The survival rates after RFA have been reported as 38–49 % at 3 years and 22–24 % at 5 years, with a median survival time of 28.9–36.0 months in patients with colorectal liver metastasis (17,18).

The limitations of RFA on colorectal liver metastases are the same as on Hepatocellular carcinoma; such as resistance of tissue conduction at 100°, a diffusion of temperature on a small areas and local recurrences related to the size of the tumor and the proximity with vessels (2). Actually, only few data described long term outcomes with MWA on colorectal liver metastases. ENG et al showed on a retrospective study of 33 patients that MWA is safe and feasible for the treatment of tumor smaller than 5cm. Indeed, 13 patients developed a recurrence at 18 months. Overall survival was 35.2% at 4 years, with a 19.3% disease-free survival at 3.5 years. (19). In a recent study, MWA efficacy was compared to resection; no significant differences were observed (20). A cohort of 134 patients which compared RFA to MWA showed a lower recurrence on the treated site after microwave ablation (21). The MWA has received a real interest in recent years for the treatment of liver metastases. The lack of current prospective study about the real clinical advantage of MWA; as compared to other techniques; prevents us from concluding.

Most studies on RFA treatment for lung metastases from GI cancers have focused on CRC. Indeed, 15% of colorectal metastases appear on the lung. The main treatment of lung

metastases is the resection and a small proportion of patients are selected for surgical resection due to the characteristics of disease such as severe pulmonary disease associated with low pulmonary function. In recent years, RFA has taken an important place in the treatment of pulmonary metastases from CRCs and considered as an alternative to the metastatic pulmonary resection. Von Meyenfeldt et al reported a progression-free survival rates of 49% at 1 year and 20% at 3 years with RFA, the control tumor rate was estimated at 65% on the literature (22). The use of MWA on lung metastases of CRC showed a better control of local recurrence, however no difference on the progression and survival of patients was identified. However, more pulmonary complications were reported with MWA treatment. (23).

2.3 Gastric cancer

Liver metastases from gastric cancer are represent approximately 10% of patients with primary gastric cancer (24). The resection still the most first line treatment, however the real advantage of surgery is not evident. Most patients are not candidates for curative resection because of tumor location or dissemination, or inadequate functional hepatic reserve and advanced primary tumor staging (25; 26). Grimes et al showed that few patients with gastric liver metastases are suitable for hepatectomy and only patients with metachronous presentation of a single metastasis should be considered for resection (27).

Only few data have been reported to the use of RFA in liver metastases from gastric cancer. Recently, it was shown that RFA could be used as a safe ablation technique to patients who are not candidates for surgical treatment. Therefore, the benefit of RFA was associated to the number of metastases; the survival of patients presenting a solitary liver metastasis was increased than patients with multiple metastases (28, 29). Otherwise, it was demonstrated that RFA followed by chemotherapy is more beneficial to prolonged survival than chemotherapy alone for patients who underwent gastrectomy. (30).

2.4 Esophageal cancer

Esophagus cancer is the eight most predominant cancer in the world. In Europe, esophageal adenocarcinoma (EAC) which appeared on patients diagnosed for Barrett's esophagus has become the most common type of esophageal cancer. Endoscopic resection is the standard

treatment for the superficial lesions associated with a small recurrence rate (1-10%) and no mortalities related to the procedure were reported.

RFA was recently reported as a safe and effective technique for the treatment early neoplasia in Barrett's esophagus with 84% of complete eradication at 12 months, 2% endoscopic neoplastic progression after 2 RFA sessions (31). However, for the lack of randomized trials demonstrated the positive value of RFA, its use in early stages of esophageal cancer is not recommended. (32)

2.5 Pancreatic cancer

Recent studies demonstrated the safety and the feasibility of RFA on locally advanced pancreatic adenocarcinoma (LAPC). Indeed, RFA is used during open or laparoscopic surgery and showed an improvement in the overall rate survival (33). Recently, a novel probe has been developed to perform RFA under endoscopic ultrasound (EUS) demonstrated the first evidence of RFA to induce immunomodulation in LAPC (34). An activation of adaptive response along with a decrease of immunosuppression was observed. Actually, no study evaluated the benefit of immunotherapy combination with RFA on LAPC.

3. Local Immunomodulation on digestive cancers

✓ Animal studies

Several animal studies used local immunomodulation as a way to increase immune response and to treat different cancer such as breast cancer, melanoma, and lung cancer. IL-12 is a heterodimeric cytokine secreted by dendritic cells and phagocytes, its main function appears to be induction of IFN- γ production. The use of IL-12 was increased since the role of IFN- γ on anti-tumor response has been demonstrated. In mouse digestive cancer models, IL-12 has been used to treat colorectal tumors (34). The bioavailability of this cytokine on the tumor was increased using gene encoding IL-12 or nanoparticles delivering IL-12 (35). These strategies control the release of cytokines avoiding systemic toxicity and increasing local bioavailability of the drug.

Toll like receptor (TLR) are a family of pattern recognition receptors (PRR) that function in innate immune system to recognize the pathogen. Agonists of these receptor are showed the enhancing of immune response and eliciting anti-tumor activity. TLR-4, TLR-9. TLR-4 has been investigated in CRC. TLR4 have been associated with an increased risk in prostate cancer, gastric cancer and CRC. (36). Davis et al showed that intratumoral administration of TLR4 agonist associated with Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) secreting whole cell tumor cell vector (GVAX) improves antitumor responses on CT26 mice model. Indeed, 50 % of mice showed a regression the treated tumor mediated by T CD4⁺ and CD8⁺ infiltration. Other data demonstrated that injection of TLR-4 agonist induce only T CD4⁺ infiltration without effective antitumor immune response effect (37). It has been shown that TLR-9 can protect malignant transformation in colorectal mucosa. The intratumoral injection of SD-101 (TLR-9 agonist) increased CD8⁺ TILs and anti-PD1 response on MC38 colon tumor model, as compared to systemic PD-1 therapy alone (38).

✓ Clinical trials

The most clinical trials using intratumoral immunotherapy are, actually, proposed on some cancers but not on digestive cancer; probably due to the poor immunogenicity of these tumors and the suppressive micro-environment. The deficiency of an antitumor immune response on digestive cancer may be related to poor recognition of tumor antigens or lack of expression of tumor antigens or failure of the effector response. Only few human studies were described about the intratumoral injections of immunotherapy on gastrointestinal cancers.

The Oncolytic viruses offer an opportunity to provide intra-tumoral danger signals for the immune system and an immunogenic cell death of cancer cells (43). Sangro et al demonstrated the feasibility of intratumoral injection of adenovirus oncoding IL-12 on patients with advanced digestive cancer. No toxicities were observed; however, a partial objective reduction of tumor size was observed in a patient with hepatocellular carcinoma. No progression disease was observed in 29% of patients with primary liver cancer (44). A Phase I clinical trial evaluated intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal

carcinomas. The strategy was safe and tolerated but associated with a few rate responses on patients (45).

Other studies focused on intratumoral administration of dendritic cells to prime antitumor response. Ex vivo matured dendritic cells were injected into the tumor of 5 patients with esophageal cancer. The results suggested that the intratumoral administration of mature DC on these tumors did not lead to DC migration from the primary tumor to the draining lymph nodes, and therefore, might not achieve an optimal clinical response (46).

TLR agonist are used clinically either alone or combination with other immunotherapy. A Phase I/II study evaluated the efficacy of intratumoral injection of DC combined with TLR-4 agonist (OK-432), on 20 patients with pancreatic cancer. No results were published about the study (NCT00795977).

4. Association between physical methods and immunotherapy

Locoregional treatments of cancer such as RFA and cryoablation have shown immunomodulatory potential. These techniques not only destroy the tumor mass but also release antigenic materials, induce inflammation and generate danger signals. One potential advantage of thermal ablation is that it generates a permanent source of tumor antigen to elicit systemic antitumor immunity. However, the ablative techniques may induce a weak anti-tumor effect. Combinations with other approaches are expected to improve anti-tumor response. Immunotherapy is thus appropriate for combination aimed at eliminating residual disease and prevention recurrences (47).

4.1 Association between locoregional treatment and systemic immunotherapy

For HCC, RFA is the most common physical procedure associated with systemic immunotherapy treatments. Reviews about RFA and immunotherapy models have already established the potential for immunotherapies to enhance the effects of RFA in animal models and prolong survival in clinical trials (48). Recently, immunotherapies based on DC (49); glypican-3 (GPC3) peptide vaccine (50) and Tremelimumab further demonstrate the potential for multimodal therapies. Alternately, MWA is another common ablative method used in association with systemic immunotherapy (51).

RFA is also the standard treatment for unresectable CRC liver metastases. Combinatory treatments are under investigation. Shi L et al. showed that RFA alone is not sufficient to prevent cancer progression in murine models due to immune-suppressive mechanisms (52). De Jong et al used RFA in combination with adjuvant radio immunotherapy in colorectal liver metastases rat models, but the treatment did not increase survival after RFA. One active Phase I/Ib study combined RFA in liver metastatic lesions with monoclonal antibody OX-40 (NCT02559024). Another clinical trial was proposed with association of cryotherapy ablation with AlloStim® for patients with metastatic CRC (NCT02380443).

Local ablations combined with systemic immunotherapies have been proposed to pancreatic cancers. Niu L retrospectively assessed the effects of a combination of cryoablation with immunotherapy in metastatic pancreatic cancer. They compared cryoablation associated with immunotherapy after a 4-year follow up in 106 patients. They found that median overall survival (OS) was highest in the cryoablation associated with immunotherapy group (53). Another clinical study investigated the safety of IRE associated with allogenic natural killer cell therapy for treating stage III/IV pancreatic cancer. Both of median progression-free survival (PFS) and OS were higher in IRE-NK group than in the control, thus showing the potential of a combined modality (54).

Thus far, no extensive studies have been published which associate ablation with systemic immunotherapies. In 2006, Suchi K et al. reported a case of immunotherapy using systemic administration of OK-432 in combination with RFA for recurrent tumors of esophageal cancer of a 60-year-old patient. While RFA induced a significant therapeutic effect on the tumor, no apparent size reduction was seen in the metastatic lymph nodes (55). Jiongyuan proposed

association between immunotherapy, and percutaneous cryoablation to prolong overall survival of patients with metastatic esophageal cancer (56). Currently the Fuda Cancer Hospital recruiting patients with advanced esophageal cancer for evaluation of cryosurgery and NK combination immunotherapy (NCT03008343).

4.2 Rationale of local immunotherapy

In systemic immunotherapy, drug concentrations remain very low at the tumor site, such that bioavailability is uncertain and suboptimal. Moreover, it exposes healthy tissues to the drug which can break self-immune tolerance or activate unexpected immune related adverse events to the immune system (irAEs). Some immunostimulatory drugs cannot be delivered systematically because of their toxicity. Other systemic immunotherapies are poorly tolerated when administered (57).

Local or intratumoral immunotherapy aims to provide a potent priming of antitumor immune response. Direct intratumoral delivery allows access to high local concentrations of a drug and increases the bioavailability of immunostimulatory agents at the tumor site with lower doses than the usual systemic doses. Intratumoral immunotherapy leads to a lower systemic diffusion and lowers exposure of healthy tissues to the drugs, thus decreasing systemic toxicity. It is highly personalized vaccine because the antitumor immune response is adapted to the patient's own tumor. This strategy can induce both local and abscopal effects. It although allow the use of multiple combinations of immunostimulatory drugs avoiding their systemic toxicities. Moreover, intratumoral immunotherapy provides the opportunity for local testing and takes advantage of the dose-effect correlation of drugs while avoiding their systemic toxicity (57).

4.3 The recent studies of locoregional treatment associated with local immunotherapy

✓ Hepatocellular carcinoma (HCC)

A recent study investigated the effects of intratumoral immunomodulator injection, using cytokine sustained-release microsphere (CytoMPS) containing IL-2 and GM-CSF after MWA in murine HCC. In the complete treatment group compared to the control, the combined

treatment significantly increased the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood and enhanced the specific anti-tumor response (58). patients with HCC are currently recruiting for a Phase 2/3 trial testing percutaneous MWA combination with adoptive immunotherapy (cytokine induced killer cell). This objective of this study is to observe the safety, survival and immunologic effect of the combination therapy (NCT02851784).

✓ CRC metastases (mCRC)

Actually no clinical experiment reported the association of locoregional treatment and local immunomodulation. Several preclinical studies were performed. Data from a preclinical study using OK-432-stimulated DC in combination with RFA in a murine model of CRCm showed enhancement of CD4⁺ and CD8⁺ T cells proportion and reduction of the Tregs/CD4⁺ ratio. Moreover, this strategy induced and increased of CD4⁺ TILs into untreated tumor. However, the effect on distant tumor was similar in all groups (59). Udagawa et al combined cryoablation with BCG-CWS stimulated DC to observe the antitumor effect on large tumors in subcutaneously murine CT26 colon cancer model (60). While cryoablation alone was insufficient to show antitumor effects, the administration of intratumoral stimulated DC resulted in immune response related to specific CD8⁺ TILs. In a similar murine model, Saji et al. proposed another loco-regional treatment: photodynamic therapy (PDT). This method induces ROS production and cell death allowing to tumor regression. They showed systemic antitumor immunity with PDT associated with intratumoral injection of *in vitro* generated DC (61). Johnson et al. combined RFA with IL-2 in murine CT26-KS colon adenocarcinoma model. They showed significant inhibition of tumor growth, survival enhancement and antitumor response with activation CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Moreover, this association demonstrated abscopal effect and immunological memory. However, the combination of RFA and cytokine resulted in complete tumor inhibition in only 50% of mice (62).

5. References

1. Hong, K. & Georgiades, C. Radiofrequency Ablation: Mechanism of Action and Devices. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 21, S179–S186 (2010).
2. Gwak, J. H., Oh, B.-Y., Lee, R. A., Chung, S. S. & Kim, K. H. Clinical Applications of Radio-Frequency Ablation in Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *Journal of the Korean Society of Coloproctology* 27, 202 (2011).
3. Lubner, M. G., Brace, C. L., Hinshaw, J. L. & Lee, F. T. Microwave Tumor Ablation: Mechanism of Action, Clinical Results, and Devices. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 21, S192–S203 (2010).
4. Bala, M. M., Riemsma, R. P., Wolff, R. & Kleijnen, J. Cryotherapy for liver metastases. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2013). doi:10.1002/14651858.CD009058.pub2
5. Wichtowski, M., Nowaczyk, P., Kocur, J. & Murawa, D. Irreversible electroporation in the treatment of locally advanced pancreas and liver metastases of colorectal carcinoma. *Współczesna Onkologia* 1, 39–44 (2016).
6. Rhim, H. & Lim, H. K. Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma: Pros and Cons. *Gut and Liver* 4, S113 (2010).
7. Xu, Q., Kobayashi, S., Ye, X. & Meng, X. Comparison of Hepatic Resection and Radiofrequency Ablation for Small Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis of 16,103 Patients. *Scientific Reports* 4, (2015).
8. Xie, X. et al. Local Recurrence after Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma: Treatment Choice and Outcome. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 19, 1466–1475 (2015).
9. Hansler, J. et al. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *World J. Gastroenterol.* 12, 3716–3721 (2006).
10. Napoletano, C. et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int. J. Oncol.* 32, 481–490 (2008).
11. Baker, E. H. et al. Operative microwave ablation for hepatocellular carcinoma: a single center retrospective review of 219 patients. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 8, 337–346 (2017).
12. Dou, J. et al. Outcomes of microwave ablation for hepatocellular carcinoma adjacent to large vessels: a propensity score analysis. *Oncotarget* 8, (2017).
13. Lu, M.-D. et al. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study. *Journal of Gastroenterology* 40, 1054–1060 (2005).
14. Vietti Violi, N. et al. Efficacy of microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: a randomised controlled phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 3, 317–325 (2018).
15. Facciorusso, A., Di Maso, M. & Muscatiello, N. Microwave ablation versus radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Hyperthermia* 32, 339–344 (2016).
16. Hamada, A. et al. Radiofrequency ablation for colorectal liver metastases: prognostic factors in non-surgical candidates. *Jpn J Radiol* 30, 567–574 (2012).

17. Solbiati, L., Ierace, T., Tonolini, M., Osti, V. & Cova, L. Radiofrequency thermal ablation of hepatic metastases. *Eur J Ultrasound* 13, 149–158 (2001).
18. Berber, E., Pelley, R. & Siperstein, A. E. Predictors of survival after radiofrequency thermal ablation of colorectal cancer metastases to the liver: a prospective study. *J. Clin. Oncol.* 23, 1358–1364 (2005).
19. Eng, O. S. et al. Outcomes of microwave ablation for colorectal cancer liver metastases: A single center experience: Microwave Ablation Colorectal Liver. *Journal of Surgical Oncology* 111, 410–413 (2015).
20. Song, P. et al. The clinical utility and outcomes of microwave ablation for colorectal cancer liver metastases. *Oncotarget* 8, (2017).
21. Correa-Gallego, C. et al. A Retrospective Comparison of Microwave Ablation vs. Radiofrequency Ablation for Colorectal Cancer Hepatic Metastases. *Annals of Surgical Oncology* 21, 4278–4283 (2014).
22. von Meyenfeldt, E. M. et al. Local progression after radiofrequency ablation for pulmonary metastases. *Cancer* 117, 3781–3787 (2011).
23. Belfiore, G. et al. Patients' survival in lung malignancies treated by microwave ablation: our experience on 56 patients. *European Journal of Radiology* 82, 177–181 (2013).
24. Saiura, A. et al. Clinicopathological features and outcome of hepatic resection for liver metastasis from gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 49, 1062–1065 (2002).
25. Thelen, A. et al. Liver resection for metastatic gastric cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 34, 1328–1334 (2008).
26. Kakeji, Y., Morita, M. & Maehara, Y. Strategies for treating liver metastasis from gastric cancer. *Surgery Today* 40, 287–294 (2010).
27. Grimes, N. et al. The role of hepatectomy in the management of metastatic gastric adenocarcinoma: A systematic review. *Surgical Oncology* 23, 177–185 (2014).
28. Lee, J. W. et al. Radiofrequency ablation for liver metastases in patients with gastric cancer as an alternative to hepatic resection. *BMC Cancer* 17, 185 (2017).
29. Chen, J. et al. Radiofrequency ablation for liver metastasis from gastric cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 39, 701–706 (2013).
30. Kim, H. R. et al. Efficacy and feasibility of radiofrequency ablation for liver metastases from gastric adenocarcinoma. *International Journal of Hyperthermia* 26, 305–315 (2010).
31. Akiyama, J., Roorda, A. & Triadafilopoulos, G. Managing Barrett's esophagus with radiofrequency ablation. *Gastroenterology Report* 1, 95–104 (2013).
32. Barret, M. Diagnosis and treatment of superficial esophageal cancer. *Annals of Gastroenterology* (2018). doi:10.20524/aog.2018.0252
33. Scopelliti, F. et al. Technique, safety, and feasibility of EUS-guided radiofrequency ablation in unresectable pancreatic cancer. *Surg Endosc* (2018). doi:10.1007/s00464-018-6217-x
34. Giardino, A. et al. Triple approach strategy for patients with locally advanced pancreatic carcinoma. *HPB* 15, 623–627 (2013).
35. Starnes, C. O. Coley's toxins in perspective. *Nature* 357, 11–12 (1992).

36. McCarthy, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 26, 154–158 (2006).
37. Böhle, A., Jocham, D. & Bock, P. R. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J. Urol.* 169, 90–95 (2003).
38. Xu, B. et al. Interleukin-12 prevents colorectal cancer liver metastases in mice. *OncoTargets and Therapy* 523 (2013). doi:10.2147/OTT.S44161
39. Hallaj-Nezhadi, S., Lotfipour, F. & Dass, C. Nanoparticle-mediated interleukin-12 cancer gene therapy. *J Pharm Pharm Sci* 13, 472–485 (2010).
40. Awasthi, S. Toll-Like Receptor-4 Modulation for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 5, (2014).
41. Davis, M. B. et al. Intratumoral Administration of TLR4 Agonist Absorbed into a Cellular Vector Improves Antitumor Responses. *Clinical Cancer Research* 17, 3984–3992 (2011).
42. Wang, S. et al. Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E7240–E7249 (2016).
43. W. Tong, A. et al. Oncolytic Viruses for Induction of Anti-Tumor Immunity. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13, 1750–1760 (2012).
44. Sangro, B. et al. Phase I Trial of Intratumoral Injection of an Adenovirus Encoding Interleukin-12 for Advanced Digestive Tumors. *Journal of Clinical Oncology* 22, 1389–1397 (2004).
45. Mazzolini, G. et al. Intratumoral Injection of Dendritic Cells Engineered to Secrete Interleukin-12 by Recombinant Adenovirus in Patients With Metastatic Gastrointestinal Carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 23, 999–1010 (2005).
46. Narita, M. et al. Immune responses in patients with esophageal cancer treated with SART1 peptide-pulsed dendritic cell vaccine. *International Journal of Oncology* 46, 1699–1709 (2015).
47. Fagnoni, F. F., Zerbini, A., Pelosi, G. & Missale, G. Combination of radiofrequency ablation and immunotherapy. *Front. Biosci.* 13, 369–381 (2008).
48. Li, G. & Staveley-O’Carroll, K. F. Potential of Radiofrequency Ablation in Combination with Immunotherapy in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Trials* 06, (2016).
49. Lee, J.-H. et al. Adjuvant immunotherapy with autologous dendritic cells for hepatocellular carcinoma, randomized phase II study. *OncImmunity* e1328335 (2017). doi:10.1080/2162402X.2017.1328335
50. Sawada, Y. et al. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. *OncImmunity* 5, e1129483 (2016).
51. Takahashi, Y. et al. Immunological effect of local ablation combined with immunotherapy on solid malignancies. *Chinese Journal of Cancer* 36, (2017).
52. Shi, L. et al. PD-1 Blockade Boosts Radiofrequency Ablation-Elicited Adaptive Immune Responses against Tumor. *Clinical Cancer Research* 22, 1173–1184 (2016).
53. Niu, L. et al. Combination Treatment With Comprehensive Cryoablation and Immunotherapy in Metastatic Pancreatic Cancer: *Pancreas* 42, 1143–1149 (2013).

54. Lin, M. et al. Percutaneous irreversible electroporation combined with allogeneic natural killer cell immunotherapy for patients with unresectable (stage III/IV) pancreatic cancer: a promising treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143, 2607–2618 (2017).
55. Suchi, K. et al. [A case of immunotherapy using OK-432 in combination with RFA for CRT-resistant recurrent tumors of esophageal cancer that presented itself in the intramediastinal omentum of gastric tube]. *Gan To Kagaku Ryoho* 33, 1733–1735 (2006).
56. Jiongyuan, X. et al. Percutaneous comprehensive cryoablation for metastatic esophageal cancer after failure of radical surgery. *Cryobiology* 67, 363–368 (2013).
57. Marabelle, A., Tselikas, L., de Baere, T. & Houot, R. Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy. *Annals of Oncology* 28, xii33–xii43 (2017).
58. Wu, H., Chen, B. & Peng, B. Effects of intratumoral injection of immunoactivator after microwave ablation on antitumor immunity in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 15, 1914–1917 (2018).
59. Nakagawa, H. et al. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63, 347–356 (2014).
60. Udagawa, M. et al. Enhancement of Immunologic Tumor Regression by Intratumoral Administration of Dendritic Cells in Combination with Cryoablative Tumor Pretreatment and Bacillus Calmette-Guerin Cell Wall Skeleton Stimulation. *Clinical Cancer Research* 12, 7465–7475 (2006).
61. Saji, H. Systemic Antitumor Effect of Intratumoral Injection of Dendritic Cells in Combination with Local Photodynamic Therapy. *Clinical Cancer Research* 12, 2568–2574 (2006).
62. Johnson, E. E. et al. Radiofrequency Ablation Combined with KS-IL2 Immunocytokine (EMD 273066) Results in an Enhanced Antitumor Effect against Murine Colon Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 15, 4875–4884 (2009).

5. Objectifs des travaux de thèse

Nous avons vu que l'efficacité des traitements du CCRm étaient limitée. Par ailleurs, les traitements locorégionaux, principalement la RFA ont montré un potentiel dans l'activation de la réponse immunitaire systémique des patients après traitement des métastases hépatiques du CCR. Cependant, cet effet est insuffisant pour permettre une réponse complète et éviter la récurrence tumorale. Il serait ainsi nécessaire de l'amplifier pour obtenir un bénéfice clinique significatif.

Le but de mon travail, au cours de cette thèse, était de mettre en place une stratégie de délivrance locale d'immunomodulateurs afin d'amplifier la réponse immunitaire induite par RFA pour obtenir un bénéfice clinique significatif. Dans ce contexte, cette thèse comporte deux objectifs :

-Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'une formulation d'hydrogel mucoadhésif permettant une délivrance prolongée des immunomodulateurs dans la tumeur. En effet, ces gels sont des polymères inertes approuvés par la FDA et décrits dans différentes études pour la délivrance in situ de principes actifs. Ces résultats sont décrits dans l'article 1 'Mucoadhesive hydrogel for intratumoral delivery of immunomodulatory agents' page 83.

Nous sommes ensuite intéressés à l'évaluation de l'association de la formulation de gel immunomodulateur et la RFA sur des modèles murins de tumeurs colorectales. Dans un premier temps, la combinaison complète a été testée sur un modèle CT26 reproduisant une situation adjuvante, c'est à dire le traitement d'une lésion jugée unique avec la présence de micrométastases distantes occultes. Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité de cette approche combinée dans un modèle de macrométastases distantes en association avec un inhibiteur de l'immunocheckpoint. Ces résultats sont décrits dans l'article 2 'Local immunomodulation combined to radiofrequency ablation results in a complete cure of local and distant colorectal carcinoma' page 107.



II. Hydrogel mucoadhésif pour la libération intratumorale d'immunostimulants



1. Introduction

1.1 Généralités

Les hydrogels sont des polymères hydrophiles qui gonflent en contact de molécules d'eau ou de liquides biologiques, formant des réseaux réticulés. Ils sont largement utilisés dans les applications biomédicales ; comme la délivrance de principes actifs, la formation de matrice pour la régénération tissulaire et les lentilles de contact (Patel et al. 2011).

Les hydrogels sont classés en hydrogels physiques et hydrogels chimiques en fonction de la nature des liaisons formant les réticulations.

-Les hydrogels chimiques possèdent des réseaux réticulés formés par des liaisons covalentes, qui une fois formés, ne peuvent être modifiés.

-Les hydrogels physiques ou 'réversibles' sont formés par des liaisons de type hydrogènes, ioniques ou hydrophobes. La formation d'un hydrogel physique est provoqué par des stimuli physiques ; telle que la température ou chimiques tels que le PH ou la force ionique ou biochimiques comme les enzymes ou les antigènes (Qiu et Park 2001). Ainsi ces hydrogels, dont la transition de phase est induite par des facteurs environnementaux, sont appelés 'hydrogels intelligents' ou de transition de phase 'Sol-Gel' (Patel et al. 2011).

1.2 Les hydrogels à transition de phase 'Sol-Gel'

Les Sol-Gel ont des propriétés intéressantes dans la conception de forme liquide injectable pour la délivrance de médicaments en libération prolongée. En effet, les micelles formées à l'état 'sol' constituent une maille permettant une libération prolongée du principe actif.

La formule du Sol-Gel peut être optimisée de façon à obtenir une forme 'Sol' à la température d'injection et 'gel' à la température corporelle. Ainsi, la forme 'Sol' permet une facilité de préparation et d'homogénéisation du gel et une possibilité d'incorporation d'excipients et d'ajustement des doses de principes actifs (PA). De plus, une stérilisation est possible avant toute administration afin de garantir les conditions d'asepsie requises pour toute préparation pharmaceutique. Par ailleurs, le passage à la forme gel permet une protection une

stabilisation des molécules fragiles comme les protéines, une possibilité de bioadhésion locale et de gélification *in situ* afin d'augmenter la biodisponibilité du PA (Figure 18).

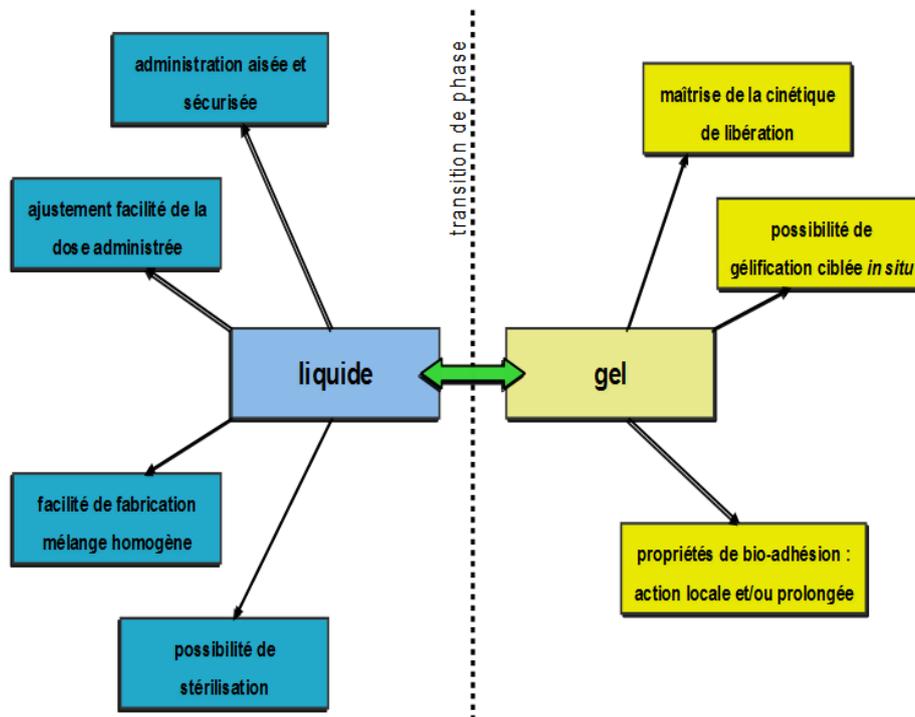


Figure 18 Intérêt des hydrogels à transition de phase Sol-Gel

1.3 Les poloxamères

Les poloxamères sont des copolymères tri blocs non ioniques de longueur variable formés par des monomères de polyéthylène glycol (PEG) et de polyoxyéthylène glycol (POEG) sous la forme $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$. (Figure 19). Les groupements latéraux PEG sont hydrophiles, tandis que le groupement central POEG est hydrophobe. Ainsi, leur caractère amphiphile leur confère des propriétés tensioactives (Rowe. 2005)

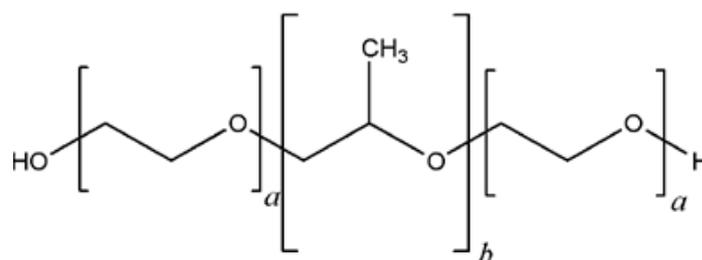


Figure 19 Structure chimique des poloxamères

Le poloxamère 407 est un polymère présenté par La Food and Drug Administration (FDA) comme un excipient « inerte » pour différentes préparations pharmaceutiques et cosmétiques (injectable, orale, ophtalmique, topique). En solution aqueuse, le Poloxamer 407 possède des propriétés thermoréversibles. Ainsi, en dessous d'une certaine température, ils présentent un état de solution dit 'état sol' et au-dessus d'une certaine température, ils présentent un état de gel dit 'état gel'. Lorsque la température augmente, les polymères s'auto-organisent et s'auto-assemblent sous forme de micelles (phase de micellisation) constituées d'un cœur de PPG et d'une couronne de PEG. Plus la température augmente, plus les chaînes de PEG se déshydratent et se rapprochent et les micelles s'organisent pour former un réseau tridimensionnel (phase de gélification) (Jeong, Kim, et Bae 2012)

On appelle la concentration minimale de formation de la première micelle la concentration micellaire critique (CMC), qui dépend de la température. La température d'une CMC est dite température de micellisation (T_{mic}) (Figure 20). La concentration de gélification critique (CGC). Est la concentration minimale en dessous de laquelle les micelles ne formeront pas de gel. Enfin, cette transition, appelée 'transition sol-gel' se caractérise par une température critique dite température de transition sol-gel ou température de gélification (T_{gel}) (Figure 20). La température de gélification augmente lorsque la concentration du poloxamère diminue.

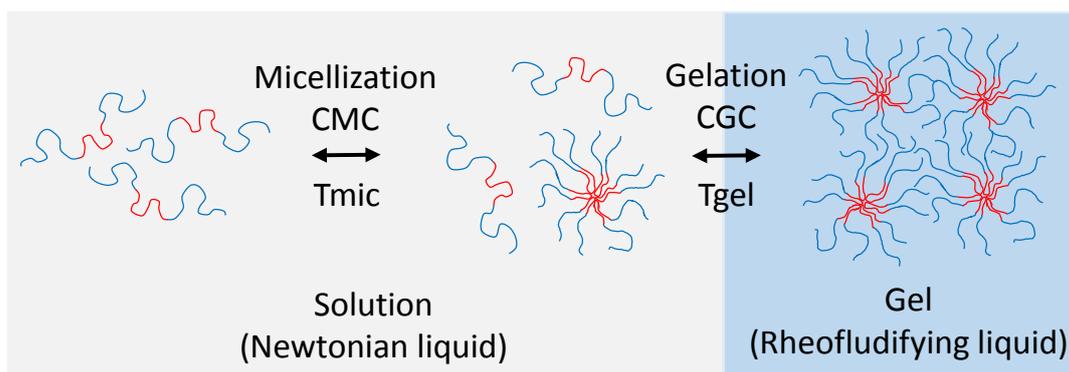


Figure 20 Auto-assemblage des poloxamères en solution

1.4 Intérêt des poloxamères

Actuellement, les poloxamères sont utilisés comme excipients dans la formulation de certains médicaments. En effet, leurs propriétés galéniques (mouillantes, dispersantes, détergentes, émulsifiantes, solubilisantes, moussantes) et le fait d'améliorer l'absorption in vivo en font des excipients très intéressants pour des préparations pharmaceutiques et cosmétiques à diverses voies d'administration intraveineuse, orale, ophtalmique ou topique (Ramya. 2013). Le poloxamère 407 est considéré comme excipient inertes par la FDA et des polymères de grade pharmacopée sont disponibles sur le marché. De plus, il augmente la stabilité des PA comme les protéines et les peptides (Dumortier et al. 2006). Ainsi, le poloxamère 407 est décrit dans la formulation de diverses spécialités médicamenteuses comme excipient (Tableau 1).

Nom commercial	PA	Classe thérapeutique	Forme galénique
Remex 5% ^R	Aciclovir	Antiviral	Crème
Myk 1 ^R -10mg/ml	Sulconazole nitrate	Antifongique local	Solution pour application cutanée
Neurontin ^R	Gabapentine	Antiépileptique	Solution pour application cutanée
Mutlaq ^R	Dronedarone	Antiarythmique III	Comprimé pelliculé
Isentress ^R	Raltegravir	Antiviral	Comprimé pelliculé
Omeprazole R158 ^R	Oméprazole	Inhibiteur de la pompe à proton	Capsule à libération prolongée

Tableau 1 Exemple de médicaments sur le marché avec le poloxamère 407 comme excipient

Le poloxamère 407 est particulièrement intéressant dans la préparation de formes locales qui permet d'augmenter la biodisponibilité des PA à courte demi-vie dans la tumeur et d'augmenter ainsi leur efficacité. De plus, la forme locale permet de diminuer les concentrations plasmatiques de ces drogues et donc leur toxicité systémique.

Plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation d'hydrogels à base de Poloxamère pour la délivrance intratumorale de cytokines (Driessens et al. 2011) et d'agents de chimiothérapie

(Amiji et al. 2002). Actuellement, peu d'études cliniques ont évalué l'efficacité des hydrogels à base de poloxamère pour la délivrance intratumorale de PA. Actuellement, deux hydrogels sont approuvés par la FDA pour la libération intratumorale d'agents de chimiothérapie. OncoGel™, une formulation à base de paclitaxel incorporé dans un hydrogel de structure tribloc poly (d, l lactide-co-glycolide) (PLGA) and polyéthylène glycol (PEG). Cette formulation a été conçue pour une administration intratumorale de paclitaxel afin de fournir une cytotoxicité ciblée et limiter les toxicités systémiques associées à l'administration conventionnelle de paclitaxel. Ainsi, OncoGel permet une libération continue de paclitaxel directement dans la tumeur et les tissus environnants pendant 6 semaines (Elstad et Fowers 2009).

OncoGel a été utilisé dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement du Glioblastome (NCT00479765) et des tumeurs de l'œsophage. (NCT00573131). Une autre formulation composée de Mitomycine incorporé dans un hydrogel à base de poloxamère 407 (RTGel) a été conçue pour le traitement des cancers de la vessie. (NCT02674269).

1.5 La mucoadhesion

Grâce à ses propriétés de cohésion et de résistance mécanique, un hydrogel possède des propriétés d'adhésion contribuant à sa résidence au site d'injection. Cependant, ils s'érodent rapidement en solution aqueuse. Afin d'augmenter le temps de résidence de l'hydrogel, des agents mucoadhésifs peuvent être ajoutés à la formulation. Ces agents confèrent à l'hydrogel des propriétés d'adhésion à la mucine, glycoprotéine contenue dans le mucus. Le mécanisme de bioadhésion peut reposer sur des interactions électrostatiques, la formation de liaisons hydrogènes ou encore par enchevêtrement mécanique. Les agents mucoadhésifs sont le plus souvent des polysaccharides de haut poids moléculaire avec des chaînes ramifiées ou non. On peut citer la gomme xanthane, les polysaccharides et l'alginate de sodium. Au vu des travaux antérieurs réalisés au laboratoire, nous avons choisi d'utiliser la gomme xanthane comme agent mucoadhésif dans nos formulations d'hydrogels. Ce polymère, biocompatible et biodégradable, est composé d'unités de d-glucose et de d-mannose et permet d'augmenter la bioadhésion et le temps de résidence in situ de l'hydrogel (Zeng. 2015).

2. Résumé de l'article

Le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) est un adjuvant capable d'améliorer la réponse immunitaire antitumorale en induisant aussi bien la prolifération la maturation et la migration des cellules dendritiques (DC) que l'expansion et la différenciation des lymphocytes. L'administration systémique de GM-CSF à faibles doses induit des effets immunostimulants mais les injections doivent être répétées, alors que des doses élevées induisent une immunosuppression. Les mycobactéries tuées ; comme les HKMT sont utilisées dans plusieurs études comme agoniste TLR-2 pour augmenter la maturation de DC. L'injection intratumorale de gels biocompatibles est de plus en plus utilisée pour la délivrance de médicaments et de vaccins. Nous proposons une formulation de gel mucoadhésif pour la libération intratumorale de GM-CSF et de HKMT afin d'améliorer l'activation des DC et améliorer la réponse immunitaire. Les propriétés du gel ont été étudiées par des tests rhéologiques et des tests de mucoadhésion. Le temps de résidence du gel et de la protéine dans la tumeur a été démontré par imagerie optique. Enfin, la capacité du gel chargé en GM-CSF et en HKMT à activer les DC et la réponse immunitaire *in vivo* a été démontrée. Le gel sélectionné a des propriétés rhéologiques qui confèrent une bonne élasticité et un temps de résidence dans la tumeur supérieure à 3 jours, augmentant ainsi le recrutement des DC. L'injection *in situ* a induit un contrôle du volume tumoral sur un modèle murin de tumeurs CT26, ce qui a confirmé l'efficacité de la stratégie combinée.

3. Article 1 : (Soumis à Biomaterials).

Mucoadhesive thermosensitive hydrogel for the intratumoral delivery of immunomodulatory agents

Katia Lemdani^{1,2,3}, Johanne Seguin², Christelle Lesieur², Chantal Al Sabbagh², Cyrille Richard², Olivia Bawa⁶, Claude Capron^{1,4}, Robert Malafosse^{1,3}, Vincent Boudy^{2,5}, Nathalie Mignet*²

¹ EA4340 BCOH, Versailles University, Paris-Saclay University, Boulogne-92100, France.

² CNRS, UTCBS UMR 8258, F-75006 Paris, France ; Paris Descartes University, Sorbonne-Paris-Cité, F-75006 Paris, France ; INSERM, UTCBS U1022, F-75006 Paris, France ; Chimie Paris-Tech, PSL Research University, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), F-75005 Paris, France.

³ Department of Surgery and Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

⁴ Immunology and hematology Department, Ambroise Paré Hospital Boulogne-92100, France.

⁵ Pharmaceutical R&D Department, Agence Générale des Equipements et des Produits de Santé (AGEPS), AP-HP, 7, rue du Fer à moulin, F-75005 Paris, France.

⁶ Unité de pathologie expérimentale de l'IRCIV, Gustave Roussy, Villejuif 94805, France.

Key words

Dendritic cells, Thermosensitive gel, bioadhesivity, local immunomodulation, antitumor immune response.

Abstract:

Intratumoral injection of biocompatible gels is increasingly used for the sustained delivery of drugs and vaccines and enhance the anti-cancer immune response. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) has become an attractive vaccine adjuvant thanks to its ability to boost the antitumor immune response by inducing dendritic-cell (DC) proliferation, maturation and migration, as well as expansion and differentiation of lymphocytes. Systemic administration of GM-CSF at low doses induces immunostimulatory effects and must be repeated, whereas administration of high doses induce immunosuppression. Killed Mycobacteria, such as Heat-killed Mycobacterium tuberculosis (HKMT) have been used in several studies as TLR-2 agonists to increase maturation of DC. In this study, we conceived a mucoadhesive thermosensitive gel formulation for the intratumoral delivery of GM-CSF and HKMT combination in order to enhance DC activation and improve the antitumor immune response. The mucoadhesive thermogel was selected based on its elastic and mucoadhesive properties obtained tanks to rheological studies, and to non invasive in vivo optical imaging

in order to insure a residence time above 5 days. Then, the ability of the GM-CSF-HKMT loaded thermogel to activate DC and induce an immune response was demonstrated. The selected thermogel exhibit rheological properties which confer a good elasticity and increased residence time of the immunostimulatory agents in the tumor, thus increasing the recruitment of DC. The *in situ* injection resulted in the control of the tumor volume on CT26 model which confirmed the efficacy of the combined strategy.

1. Introduction

Dendritic cells (DC) based immunotherapy is a promising strategy in the treatment of cancer. DC are the most important antigen presenting cells (APCs) involved in the regulation of innate and adaptive immunity and play a central role in the antitumor immune response [1]. Indeed, DC mature quickly after exposure to stimuli and get the ability to migrate and activate naive lymphocytes into cytotoxic T cells [2].

In the past two decades, there has been a growing attempt to enhance immune responses by immunizing cancer patients with their own DC that have been isolated and activated *ex vivo* [3]. Several studies used *ex vivo* activated DC of patients to treat various cancers such as kidney cancer, breast cancer, prostate cancer and colorectal carcinoma [4] [5]. However, these clinical trials lost their interest because of the low effectiveness of DC therapy related to their short viability and the suppressive immune environment of the tumor [6]. It was also shown that generated cells have a low *in vivo* migration capacity [7].

To overcome these limits, studies focused on direct *in vivo* targeting of DC adjuvants such as TLR, Cytokines or Interleukins [8]. Toll-like-receptors agonists, such as TLR2, TLR7 or TLR9 were used to mature DC *in vivo*. For example, CpG-DNA is a TLR 9 agonist which is used as an effective adjuvant to enhance immune response [9]. The clinical trials using CpG-DNA showed less successful efficacy than in animal studies due to the differential expression of TLR9 in DC between mice and human [10]. BCG (Bacilli of Calmette-Guerin) is a TLR-2/4 agonist approved as an adjuvant for non-invasive bladder cancer treatment [11]. However, local and systemic infections have been identified in treated patients [12]. TLR agonists administered by systemic pathways, were not well tolerated because they induce the release of high levels of cytokines, including IFNs, which are believed to cause most of the observed adverse reactions. In order

to avoid these side effects, some studies demonstrated the interest of killed mycobacteria as an adjuvant in cancer immunotherapy of multiple cancers [13]. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) has been demonstrated to be a potent cytokine in the recruitment, the differentiation and the maturation of DC, enhancing the antitumor immune response [14]. Systemic administration of GM-CSF at low doses induces immunostimulative effects but require repeated injection because of its short half-life [15]. However, injection of GM-CSF high doses induce immunosuppression [16]. Further systemic high concentrations of GM-CSF can also result in immune suppression, explained through the mobilization of Gr1⁺CD11b⁺ Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC), inhibition of DC migration and also down-regulation of the CCL19 CCR7 and MHCII receptors expression [17].

Considering cytokines and TLR agonists adverse effects, *in situ* controlled release may be the most efficient way to create a microenvironment where host DC must migrate, proliferate and differentiate [18]. Direct injection of viral vectors containing the tumor antigen or cytokines has been shown to induce immune responses against tumors. However, viral gene therapy demonstrated some adverse effects in patients [19]. Intratumoral injection of biocompatible gels is increasingly used for the enhancement of drug delivery. Local delivery of immunomodulatory agents using biomaterials such as, microspheres or gel, has been proposed to enhance vaccine efficacy, avoid the side effects of the systemic delivery, and also protect encapsulated degradable molecules from denaturation. The first example showing the potential of this approach was given by Drissens et al. with pluronic entrapped GM-CSF [20]. Since then, GM-CSF sustained delivery and preserved integrity were shown using PLGA microspheres encapsulation [21]. Moreover, delivery of multiple TLR agonists with PLGA particles enhanced innate and adaptive immune responses [22]. However, even if PLGA polymers are considered as biodegradable biomaterials, toxicological studies demonstrated pro-inflammatory tissue reactions at the site of administration [23].

Some poloxamers are FDA approved copolymers. Upon temperature and concentration increase, they undergo a sol-gel transition phase [24]. Because of their low toxicity and biocompatibility, poloxamer-based gels have been selected in this study for *in situ* immunomodulation approaches. However, their use might be limited by the fast dissolution of the gels under physiological conditions [25].

In order to overcome this issue, we have chosen to improve the physico-chemical properties of the gel by increasing its viscosity and bioadhesivity. Based on our previous study, we chose a combination of poloxamer and xanthan gum which was found to enhance the thermogel strength and sustained small drug release [26]. Here, we incorporated a combination of cytokine and TLR agonist to promote local immunostimulation. Our study shows that the increased viscosity and bioadhesivity of poloxamer based thermogels induce increased residence time of the thermogel and its content resulting in an *in situ* immunomodulation effect evidenced by tumor infiltrating lymphocytes.

2. Material and methods

2.1 Materials, cell culture and animals

P407 polymer (Kolliphor® P407) and xanthan gum (SATIAXANE CX 930) were purchased from BASF, France. Mucin from porcine stomach Type II (M2378-100G) and 4-nitrophenyl chloroformate were bought from Sigma Aldrich, France. Triethylamine, dichloromethane, methanol and DMSO were purchased from Carlo-Erba, France

GM-CSF (130-095-735) was bought from Miltenyi, France. HKMT (tlrl-hkmt-1) was purchased from Invivogen, France. Antibodies of CD11c, CD86 CD80, Ki-67 FITC and Annexin V Apoptosis Detection Kit were obtained from Becton Dickinson, France. Anti-CD3 was bought from Dako, France. Anti-CD4 was purchased from e-Bioscience, France, anti-B220 from BD Pharmingen, France. Anti-CD8 was bought from Neomarkers LabVision, US, and anti-Fox P3 from Abcam, France. Peroxidase/diaminobenzidine Rabbit PowerVision kit was purchased from ImmunoVision Technologies, US and Polink 2 plus HRP detection kit from GBI Labs, US. The transwell plates with 0.45 µm pore filters were bought from Sigma Aldrich, France.

CT26 colon adenocarcinoma cell line (CRL-2638) was purchased from American Type Culture Collection LGC Standards, France. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Life Technologies, France), 100 µM of streptomycin, 100 U/mL of penicillin (Gibco Life Technologies, France). The TF-1 cell line comes from the Gustave Roussy Institute, France. Growth of TF-1 cells is completely dependent on GM-CSF or IL-3. They were cultured in RPMI 1640 medium (RPMI, Gibco Life Technologies) supplemented with 10% FBS and 1% of streptomycin/penicillin. Cells were seeded three a times week with fresh culture medium containing 5 ng/ml of GM-CSF

Six to 8 week old female BALB/c mice were obtained from Janvier laboratories, Le Genest de l'île, France. Studies were conducted following the recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Use for Experimentation and the local Ethics Committee on Animal Care and Experimentation, Paris Descartes university. (APAFIS # 11352).

2.2 Thermogels preparation

Thermogels were prepared according to the 'cold method' inspired from Smolka et al [25]. In brief, P407 and Satiaxane were dissolved in water for injection (WFI, CDM Lavoisier, France) and placed at 4°C under magnetic stirring overnight to get the following compositions: P407 21 %w/v (T-gel) and P407 / Satiaxane 21 / 0.1 %w/v (MT-gel). Samples were stored at 4°C.

The immunomodulatory thermogels (MTI-gel) were prepared at the day of experiment. A quantity of 5 µg of GM-CSF and/or 10µg of HKMT were added on the MT-gel and stored at 4°C for 1 hour to get a complete solubilisation.

	P407	Satiaxane	GM-CSF +HKMT
T-gel	+	-	-
MT-gel	+	+	-
MTI-gel	+	+	+

Table. 1: Hydrogels composition.

2.3 Rheology studies

Gelling temperature (T_g) of thermogel formulations was measured with a rheometer (Anton Paar model MCR 102) fitted with a 50 mm cone-plane mobile geometry. A volume of 750 µL of thermogel was loaded on the support and then the mobile was descended to a distance equal to 0.1 mm from the support. A first test (Amplitude sweep) defined the linearity of the two modules G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) submitted to a shearing force γ . A temperature increase from 20°C to 40°C at a speed of 1°C / min was then performed. The gelation temperature was determined by the tangent of the curve G'. Each formulation was analyzed three times.

2.4 *In vitro* muco-adhesion test

Porcine gastric mucin of type II (MUC2) was used as received. Adhesion test was carried out using a rheometer (Anton Paar model MCR 102) fitted with a 50 mm plane-plane mobile geometry. The system was placed in a mucin bath and incubated at 37°C for 10 minutes. When the film was dried, the mobile was settled and 550 µL of the sample loaded on the support of the apparatus. The mobile was then brought down to a distance of 0.1 mm from the support. The strength required to tear the gel was measured at 37°C (Detachment Force).

2.5 P407 labelling with Cy5

Hydroxyl groups of poloxamer P407 were activated by reacting P407 (0.4 g) with 4-nitrophenyl chloroformate (40 mg), triethylamine (30 μ L) in dichloromethane (1.2 mL) (Figure 2a). The reaction was allowed to stir under argon overnight at room temperature. The activated polymer 2 was precipitated in anhydrous diethyl ether and redissolved in methylene chloride. This purification procedure was repeated three times and the activated P407 was then dried under vacuum. To get aminated P407, activated P407 (0.2 g) dissolved in methanol (4 mL) was reacted with ethylenediamine (0.1 g) overnight at room temperature and then precipitated with anhydrous diethyl ether. Dried aminated P407 (10 mg) was finally reacted with Cy5-NHS (2 mg) in DMSO (1 mL) for 12 hours at room temperature. Byproducts were removed by dialysis (MWCO 3500) against distilled water. Finally, Cy5-P407 polymer (5 mg) was recovered by lyophilization.

2.6 *In vivo* monitoring of the labelled gel

Mice bearing CT26 tumor were anesthetized by i.p injection of a mixture 10 mg/kg Xylazine and 80 mg/kg Ketamine. T-gel-Cy5 (%w/v) was injected on the left tumor whereas MT-gel-Cy5 (%w/v) was injected on the right tumor. Fluorescence signal was acquired with an epifluorescence system (Fluobeam camera, Fluoptics, France) at different time points post-injection. The signal was quantified over a region of interest (ROI) applied to the tumors using Image J software. Results were expressed as the percentage (%) of the signal taken at t_0 as regard to the % of the signal at at time t , according to the formula:

$$\% \text{ of signal (\% of S)} = t/t_0 \times 100$$

2.7 *In vivo* monitoring of labelled protein released from the thermogel

Cy5-NHS was coupled to albumin, used as a model protein in PBS pH7.4 for 30 min at room temperature. Free cyanine 5 was eliminated by ultracentrifugation at 12000 rpm, 4 °C during 10 min (6 times). Fluorescence and mass spectrometry confirmed the obtention of the labelled protein (Cyal) (M=67398 Da).

Mice bearing CT26 tumor were anesthetized by i.p.injection of a mixture 10 mg/kg Xylazine and 100 mg/kg Ketamine. Cyal (0.5 mg/mL) embedded in the thermosensitive polymeric MT-gel (Cyal-MT-gel) was injected in the left tumor, whereas a solution of Cyal was injected in the right tumor. Fluorescence signal was acquired with a CDDi camera (Biospace Lab, France) at different time points post-injection. The quantification was performed over a region of interest (ROI) applied to the tumors using the M3 vision software. The release data were expressed as the percentage (%) of the signal taken at t0 as regard to the % of the signal at time t, according to the formula:

$$\% \text{ of signal (\% of S)} = t/t_0 \times 100$$

2.8 Bioactivity of GM-CSF in TF-1 cell proliferation

Solutions of GM-CSF and GM-CSF-MT-gel were kept for different periods of time at 37 °C under orbital agitation. After 1, 3 and 7 days, the concentration of GM-CSF released from the solution or released from the gel was determined by ELISA test according to the protocol described by the manufacturer (GM-CSF Quantikine ELISA Kit, Rndsystems, US). The samples were stored at -20°C before used.

TF-1 cells were seeded into a 96 well plate at a density of 10000 cells / well and incubated with solutions of GM-CSF or GM-CSF released from MT-gel at 37°C / 5 % CO₂ for 48h. Proliferation and apoptosis of TF-1 cells were evaluated. The cells were harvested and stained with rat anti-mouse FITC Ki-67 and FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit. Cells were then analyzed with flow cytometer (Guava® easyCyte, Millipore, France).

2.9 *In vitro* Bone marrow dendritic cells generation

The bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) generation protocol was adapted from the procedure described by Lutz et al [27]. In brief, bone marrow from femurs and tibias of Balb / c mice were taken under sterile conditions. The red blood cells were lysed with ammonium chloride buffer and the cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 1% PS, 1 % L-Glutamine and 20 ng / mL GM-CSF. Cultures were initiated by incubating 2×10^6 bone marrow cells in 10 mL of medium on 100 mm petri dishes (P5606-400EA, Sigma Aldrich, France). At day 3, an additional 7 mL of fresh complete medium was added. At day 6, the suspended BMDC cells were collected for further analysis.

2.10 *In vitro* activation of BMDCs

Empty gel (MT-gel) or MTI-gel containing either GM-CSF (5 μ g) or HKMT (10 μ g) or the combination of GM-CSF (5 μ g) and HKMT (10 μ g) were prepared. The transwell plates with 0.45 μ m pore filters were used to study BMDC migration and maturation. The thermogels were placed in the lower compartment of the transwell, whereas 2×10^5 BMDC were seeded in the upper compartment. The cells which migrated into the lower compartment were collected 24h after incubation and labelled with rat anti-mouse PE CD11c (clone HL3), rat anti-mouse APC CD86 (clone GL1) and Hamster Anti-Mouse PerCP-Cy™5.5 CD80. The cells were analyzed with flow cytometry (FACS CANTO II, Becton Dickinson, France).

2.11 Intratumoral injection of the MTI-gel

Balb/c 8 weeks old mice were injected in the right flank with 10^5 CT26-Luc cells as previously described [28]. After 8 days of inoculation, the mice were anesthetized under Isoflurane mask. IM-Sol (GM-CSF-HKMT-Solution), MT-gel or MTI-gel were injected into the tumor using a 23G needle. The tumors were measured every three days and their volume estimated with the formula: Tumor volume (mm^3) = $(L*W*W)/2$.

2.12 Immunohistochemical study

2.12.1 Cell staining

Freshly collected tumors were fixed in Zinc and embedded in paraffin, and sections (4 μm) were realized. Paraffin sections were processed for heat-induced antigen retrieval, incubated with rabbit anti-mouse CD3 antibody, monoclonal rat anti-CD4, monoclonal rat anti-B220, and rabbit anti-mouse Fox P3 antibody. Staining was visualized by using the peroxidase/diaminobenzidine Rabbit PowerVision kit (ImmunoVision Technologies). For CD8 immunohistochemistry, paraffin sections were incubated with a rat monoclonal anti-CD8 (Neomarkers, LabVision). The membrane signal was revealed with the Polink 2 plus HRP detection kit (GBI Labs). All slides were immunostained in cover plates the same day, to guarantee a standardized intensity of staining.

2.12 Quantification of T cells density

Each slide was examined using a microscope. The lymphocyte density was quantified on 10 images extracted from the virtual slice at x20 magnification, with the help of image J software [29]. An original macro was created, which was dedicated to segment histologic parameters on the basis of contrast and color. Thus from original picture, a color deconvolution with DAB vectors was applied and the next step of analysis was performed on the red channel obtained. This image was converted in 8-bit and the brightness and contrast was setting from 60 to 100. After binarization of the image successive 3 process was applied "Dilate, Fill Holes and Watershed" then the analysis of particles from 15-200 μm^2 (FOXP3) or 20-200 μm^2 (other cell type) was made.

2.13 Statistical analysis

Graph Pad Software was used to analyze data and determine statistical significance between groups. Data are shown as the means \pm SEM. Mann-whitney test was used to compare the difference between two groups. One way anova test with Bonferroni posttest was used for multiple comparisons P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1.1 Formulation

P407 concentration was adjusted to reach a gelation temperature (T_{gel}) ranging between 18 and 25°C and a constant of elasticity G' above 10,000 Pa. The appropriate P407 concentration was fixed at 21 %w/v according to our previous study [25]. In order to endow the P407-based gel with bioadhesive properties, various amounts of Satiaxan gum (Sx) were added ranging from 0.05 up to 0.3 %w/v. The maximum proportion of Sx that can be added while remaining within the viscosity specification in the sol state was found to be 0.1 %w/v.

In table 1 are presented measured parameters T_{gel} , G , G' , and $\tan\delta$ of P407 (T-gel) and P407-Sx (MT-gel) gels at 37°C. For both formulations, the T_{gel} value was determined for $\tan\delta = 1$ and found to be very close to 21°C, interestingly about 16°C below the physiological temperature. At 37°C, i.e., in the gel state, G' was found higher than 10,000 Pa, reflecting strong elastic properties, moreover $\tan\delta$ is close to 0, highlighting a strong solid behavior. Therefore, both formulations met the appropriate rheological specifications, without noticeable impact caused by the satiaxan gum in terms of gelling temperature or viscoelastic properties.

Composition (%w/v)	T_{gel} (°C)	G' at 37°C (Pa)	G'' at 37°C	$\tan\delta$ at 37°C
T-gel P407 21%	21.0 ± 0.010	21400 ± 500	1100 ± 250	0.05 ± 0.001
MT-gel P407 21% Sx 0.1%	21.2 ± 0.005	21900 ± 150	600 ± 200	0.03 ± 0.001

Table. 2. Values of the temperature of gelification (T_{gel}), the elastic modulus (G'), the viscous modulus (G'') and $\tan\delta$ of the gel formulations. Rheological tests were carried out using an Anton Paar rheometer, model MCR 102, fitted with a 50 mm cone-plane mobile geometry. (n=3).

3.1.2 *In vitro* mucoadhesion

The main objective in adding Sx was to obtain a mucoadhesion *in vivo* and thus ensure longer residence time of the gel once injected in the tissue to be treated. To evaluate this property, a rheological method was adapted from [30]. used to evaluate the adhesiveness and the mucoadhesion of the thermogels, The mobile of the rheometer covered with a mucin film was put in contact with the support containing the gel (Fig. 1A). The obtained curves had a profile type IV characterized by four stages: cavitation, foam formation, elongation, and failure [26] (Fig. 1B). It appears in all conditions that the normal force of cavitation reached

100 N and the normal force of elongation amounted to 55 N. Only the duration of the elongation stage depended on the presence of Sx or mucin. When the mobile was coated with mucin, the time to break the interaction increased by a factor 5 for T-gel (2.7 ± 0.6 s) and a factor 10 for the MT-gel (6.0 ± 1.6 s). As expected, the gel based on P407 alone had a mucoadhesive character [24]. The addition of Satiaxane increased the *in vitro* mucoadherence by a factor 2 (Fig. 1C).

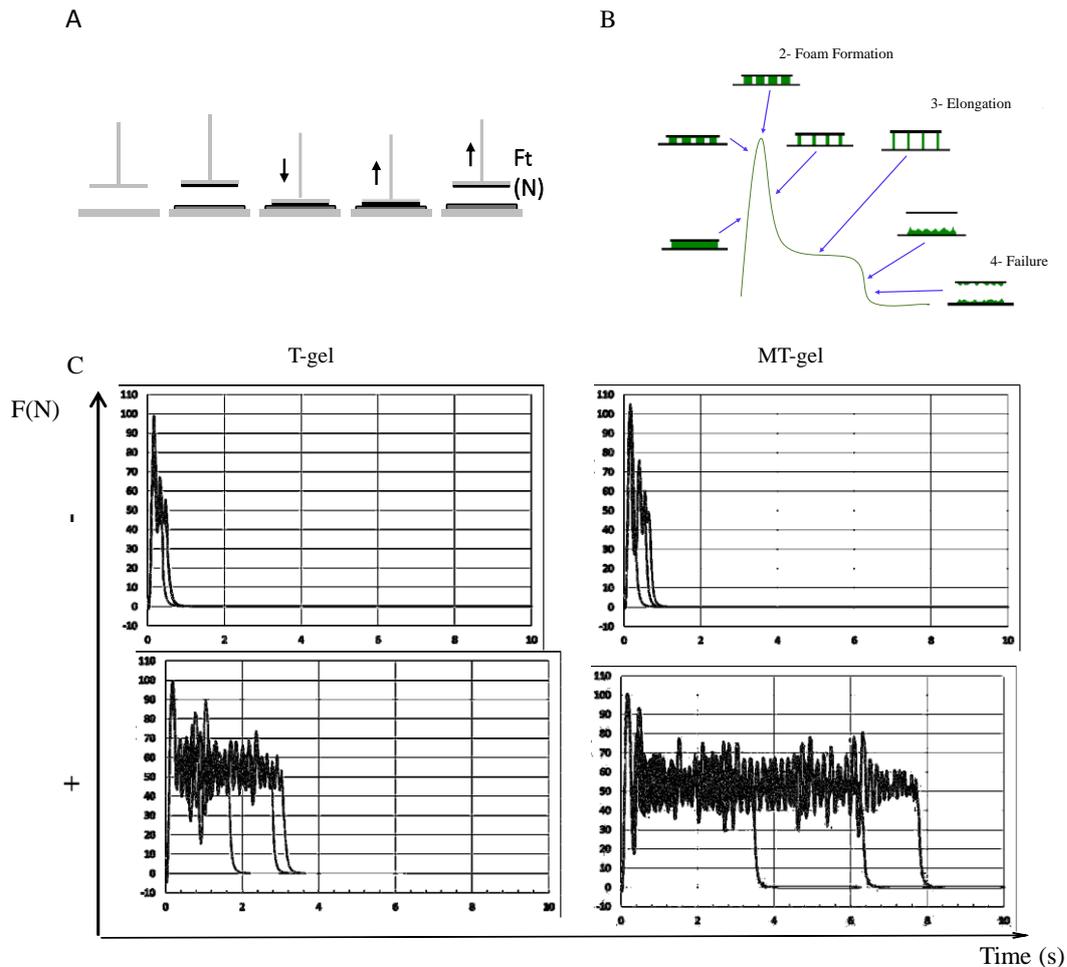


Fig. 1. *In vitro* mucoadhesion test. (A) Mucoadhesion tests were carried out using a Rheometer (Anton Paar rheometer, model MCR 102, fitted with a 50 mm plane-plane mobile geometry) as described in methods (B) Detachment curves profile (C) Detachment curves of P407 (T-gel) and P407-Sx (MT-gel) formulations without (-) or in the presence of mucin (+) as function of time (n=3).

3.1.3 *In vivo* mucoadhesion

To confirm these results, we studied the residence time of both gels *in vivo*. For this purpose, we labelled poloxamer P407 with a fluorescent dye, cyanine 5 (Cy5) in order to follow the gel

by optical imaging. The labeling was realized in three steps from commercially available dihydroxypoloxamer (P407) (Fig. 2A). The labeled polymer has the characteristic fluorescence properties of the Cy5 dye: excitation: 645 nm, emission 670 nm. After intratumoral injection, we observed a decrease of the fluorescence signal on the left tumor (T-gel-Cy5) 24 h post injection, while MT-gel-Cy5 injected on the right tumor persisted at day 5 after injection (Fig 2B). The fluorescence signal quantification is presented as the percentage of the initial fluorescence signal of the gel (Fig 2C). The half life time of T-gel-Cy5 ($T_{50} = 50.5$ hours) was lower than MT-gel-Cy5 ($T_{50} \geq 120$ hours). Based on rheological properties, *in vitro* mucoadherence results and *in vivo* residence in the tumor, the MT-gel formulation was selected for *in vitro* and *in vivo* cells activation studies.

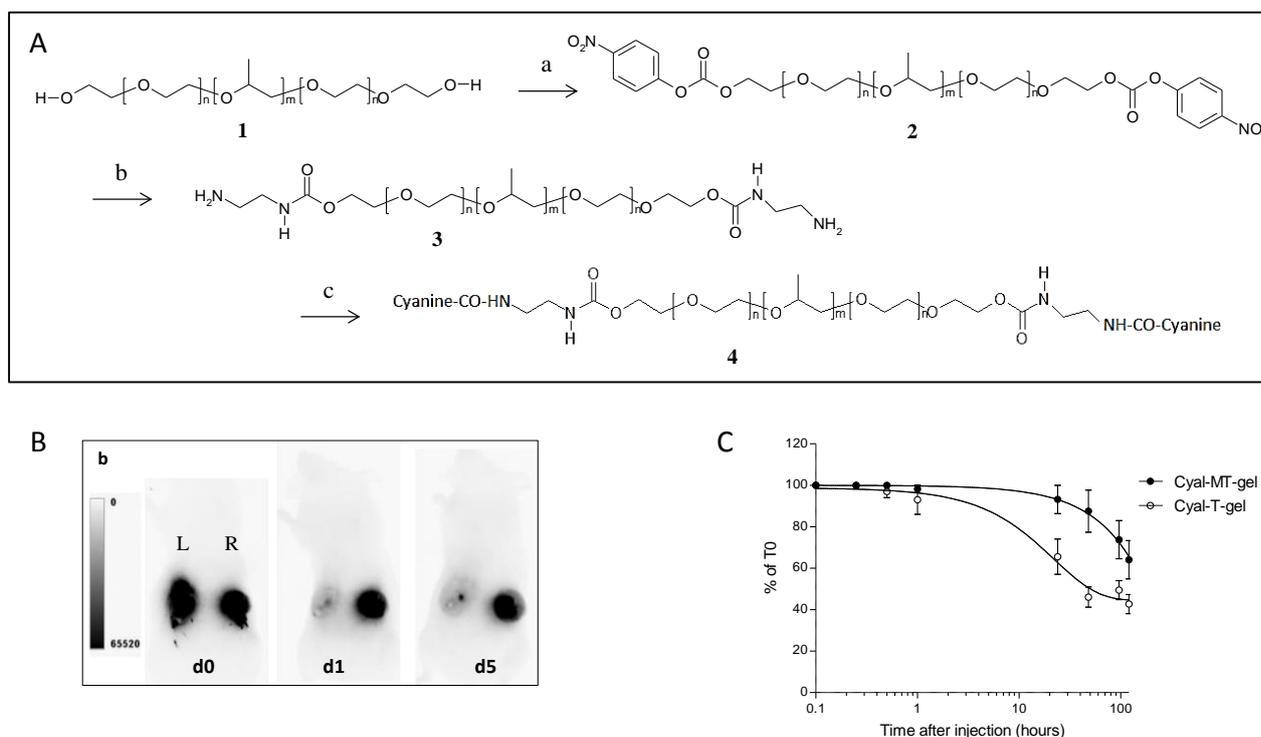


Fig. 2. Synthesis of the labelled polymer and kinetic of elimination. (A) Synthetic procedure to label the poloxamer 4. i) Poloxamer P407 is first activated to dinitrophenyl carbonate polymer 2. ii) The activated polymer is then converted to diaminocarbamate 3. iii) Finally cyanine labeled poloxamer 4 is recovered after reaction with Cy5-NHS. (B) *In vivo* fluorescence imaging of injected mice, (L) the right tumor received Cy5-T-gel, (R) the left tumor received Cy5-MT-gel. (C) Longitudinal monitoring of the labelled gels when mucoadhesive (black circles dots) or not (white circles dots) in CT26 tumor model ($n=6$, mean \pm SEM).

3.2. Bioactivity

3.2.1 *In vivo* release study of Cyal.

Then, we monitored the *in vivo* release of Cyal (Cy5 labelled albumin), used as a protein model, by optical imaging after I.T. injection with Cyal-MT-gel in the left tumor and on Cyal solution in the right tumor. In Fig. 3, a decrease of the fluorescence signal of Cyal solution was observed few hours after injection with a total elimination at 24h. Eighty percent of the signal issued from the Cyal-MT-gel persisted long hours after injection. The T50 of Cyal-MT-gel was 216h as regard to 116h for Cyal solution confirming a sustained released of protein *in vivo* using the thermogel.

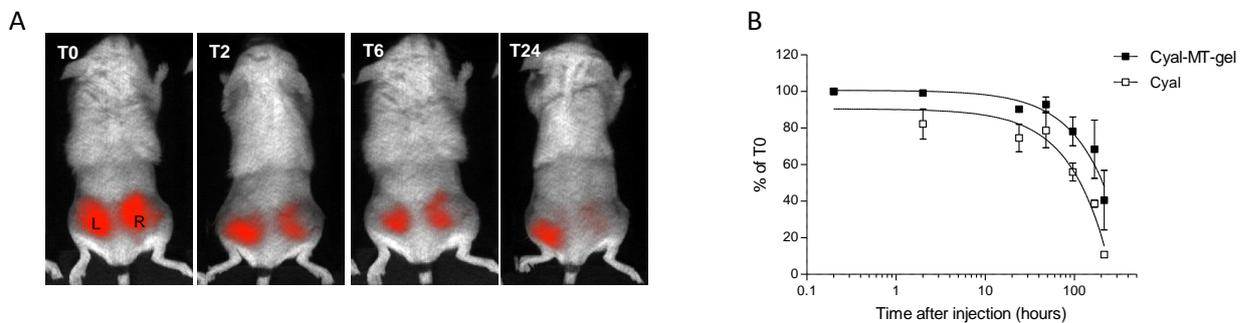


Fig. 3. Release kinetic of cyanine labelled protein from the mucoadhesive thermosensitive gel *in vivo*. (A) *In vivo* fluorescence imaging of injected mice at time 0, 2, 6 and 24h after injection. (R) The right tumor received Cyal-MT-gel and (L) the left tumor received Cyal solution. (B) Longitudinal monitoring of labelled protein release when injected as a mucoadhesive thermosensitive gel (Black squares) or as an aqueous solution (white squares) in CT26 tumor model. The fluorescence signal quantification were expressed as the percentage (%) of the signal taken at t0 as regard to the % of the signal at at time t (n=6, mean \pm SEM).

3.2.2 Bioactivity of GM-CSF encapsulated gel

To activate DC, the immunostimulatory protein GM-CSF and the killed bacteria HKMT were entrapped within the MT-gel in order to form an immune stimulating thermogel (MTI-gel). The inclusion of these molecules within the gel did not alter the transition phase of the gel using differential scanning calorimetry (DSC). No effect was found at the onset of micellization (Supplementary information Fig. S1).

The bioactivity of GM-CSF incorporated in the MT-gel was investigated. For this purpose, a solution of GM-CSF was compared to a solution of GM-CSF released from the MT-gel at

different time points. The bioactivity of the solutions was evaluated by measuring the proliferation (Ki-67) and the apoptosis (annexin V) of TF-1 cells. As shown on fig. 4, the proliferation (fig. 4A) and the apoptosis (Fig. 4B) of TF-1 did not change between the two conditions from day 1 to day 7 indicating that GM-CSF was not altered by its entrapment within the gel. When released from the gel, GM-CSF exhibit a similar bioactivity as the untrapped GM-CSF solution.

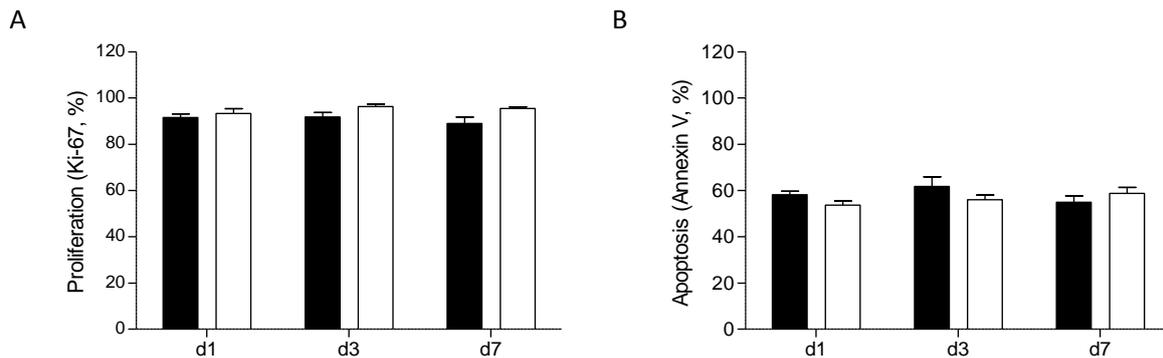


Fig. 4. Proliferation and apoptosis response of TF-1 cell line after incubation with a solution of GM-CSF and a solution of GM-CSF released from the MT-gel at days 1, 3 and 7. Percentages of TF-1 cells positive to Ki-67 (A) and Annexin V (B) after incubation with the solutions of GM-CSF (white bar) and a solution of GM-CSF released (black bar) from the MT-gel at days 1, 3 and 7 (n=3, mean \pm SEM). Mann Whitney test.

3.2.3 *In vitro* DC activation

Prior to incorporating HKMT in the gel, we verified its capacity to activate bone marrow bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) as compared with a positive control LPS (lipopolysaccharide). We found a similar level of CD80⁺ (61.7 vs 50.8 %) and of CD86⁺ (50.8 % vs 50.6 %) expression in HKMT and LPS conditions, respectively (Supplementary information Fig. S2).

Therefore, we combined GM-CSF and HKMT loaded gel to activate BMDC. MT-gel, GM-CSF-MT-gel, HKMT-MT-gel or MTI-gel was deposited on the lower compartment of transwells. The DC generated from bone marrow were seeded on the upper compartment (Fig. 5A). The cells which crossed the membrane of the transwell were collected and analyzed by flow cytometry for CD80⁺ and CD86⁺ activation markers. The fluorescence intensity quantified in fig. 5B, showed a high expression of CD86⁺ with the GM-CSF-MT-gel and MTI-gel conditions. The MT-

gel and the HKMT-MT-gel did not induce any activation and was compared to the culture media condition. Interestingly, the expression of CD80⁺ on DC was higher for the combination of immune stimulating molecules. The double stained populations CD11c⁺ CD80⁺ and CD11c⁺ CD86⁺ are presented in fig. 5C. The co-expression of both CD80⁺ and CD86⁺ on dendritic cells is necessary for T lymphocytes activation. Thus, MTI-gel revealed a superior ability to induce dendritic cells maturation.

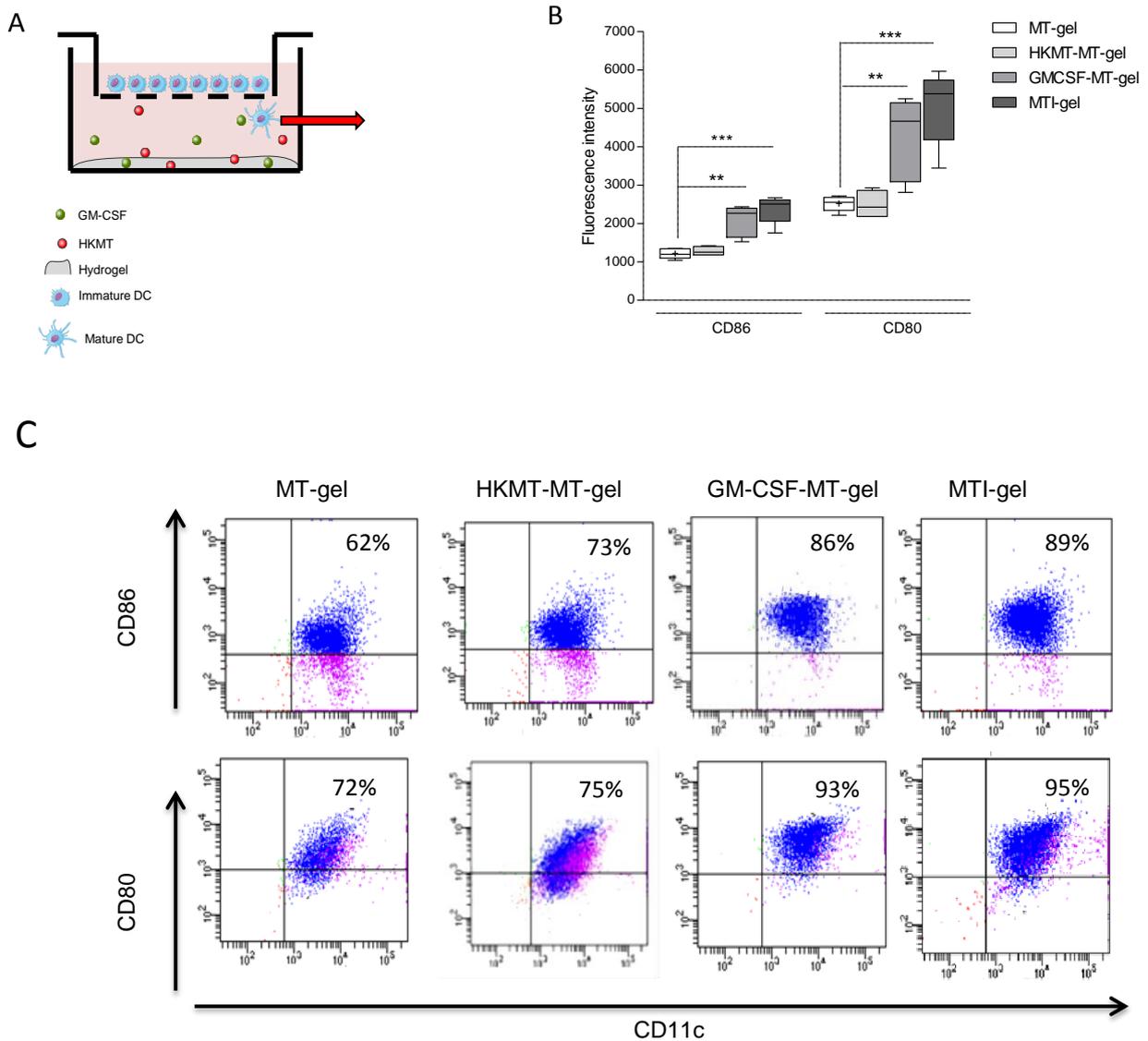


Fig. 5. *In vitro* activation of BMDC within the immunomodulatory gel. (A) Schematic representation of the experiment. (B) Flow cytometry quantification of fluorescence intensity of V450-CD80⁺ and APC-CD86⁺ expression in MT-gel (white bar), GM-CSF-MT-gel (clear grey bar), HKMT-MT-gel (dark grey bar) and MTI-gel (dark bar) conditions. (C) CD86⁺ and CD80⁺ populations gated on CD11c⁺ in the different conditions (n=5). Mann Whitney test was used.

3.2.4 Local effect of intratumoral administration of the MTI-gel

To evaluate the effect of the immunostimulatory gel after intratumoral administration, we injected CT26 tumor bearing mice with MT-gel, a gel containing GM-CSF and HKMT (MTI-gel) or the two immunomodulatory molecules in solution (I-solution). We observed a significant decrease of tumor progression with MTI-gel, as compared with I-solution (Fig. 6A).

In order to analyse the immune environment within intratumoral administration of the MTI-gel, CD3 cells, effector T cells (CD4+), cytotoxic T cells (CD8+), regulatory T cells (FoxP3) and B lymphocytes (CD45R-B220) were analyzed with immunohistochemistry. We observed a significant increase of CD3 and CD8 cell density on the tumor with injection of MTI-gel as compared to MT-gel. There was no difference on CD4, FoxP3 and B220 cell density on the two conditions (Fig. 6B, 6C).

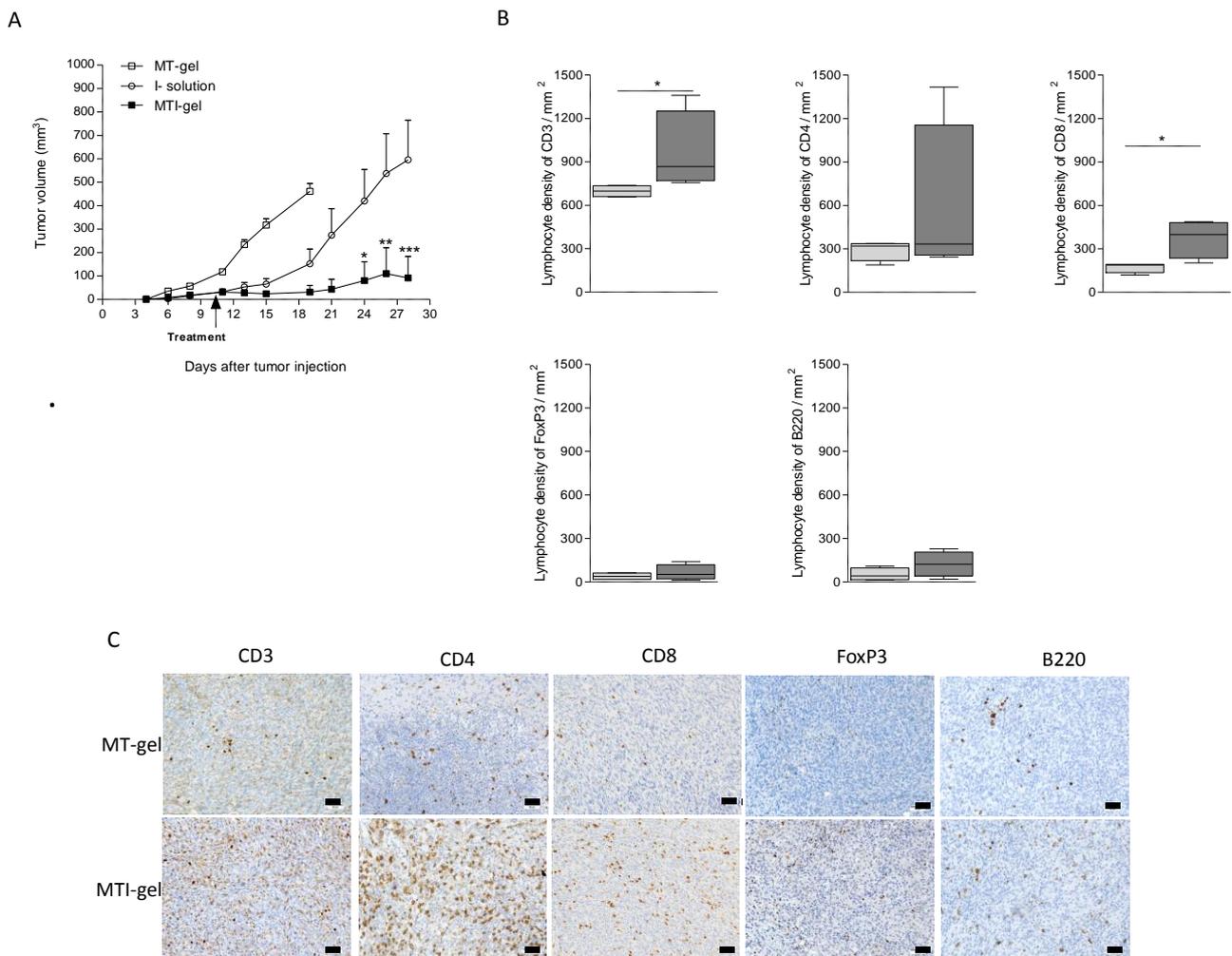


Fig. 6. Effect of intratumoral administration of MTI-gel. (A) Tumor growth after administration of MT-gel (white squares), I-solution (GMCSF-HKMT solution) (white circles) and the MTI-gel (black squares). Anova test with Bonferroni's Comparison Test was performed, $n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.01$. Tumors from MT-gel and MTI-gel groups were removed 15 days after injection and fixed for further analysis. IHC's staining B220, CD3, CD4, CD8, FoxP3 were performed. (B) Quantification of lymphocytes density on the tumor using macro image J as described on materials and methods; clear grey box represents the MT-gel group and dark grey box represents MTI-gel group. Mann-Whitney test, $n=4$, $*P<0.05$. (C) Representative images of the B220, CD3, CD4, CD8 and FOXP3 immunostaining for the tumor 15days post intratumor injection of MT-gel or MTI-gel. The black scale represents 50 μm .

4. Discussion

In this study, we proposed a mucoadhesive thermogel for the intratumoral delivery of GM-CSF and HKMT. These immunomodulatory agents are known to induce the recruitment and maturation of DC, which are necessary to activate T cells and induce an effective immune response [31]. For this purpose, we used poloxamer 407, copolymer and Satiaxane as mucoadhesive agents by referring to our previous study [25]. The special interest of poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide)–poly (ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) triblock copolymers based gels for human use is now clearly established [32]. Among these is the poloxamer P407, a FDA approved, water-soluble and low toxic polymer [33]. When dissolved in water at a specific range of concentration, poloxamer P407 exhibits thermosensitive properties attributed to its chemical structure which explain its widespread use as a drug delivery system for controlled release applications [32], [34]. The sustained delivery of many macromolecular drugs by injection in the biological tissue of interest has been studied [35]. Properties of bioadhesion can be provided to the gel by mucoadhesive agents for the purpose of extending the residence time at the injection site [36], [37]. In order to select the most appropriate one, adapted rheological studies were performed to quantify the bioadhesion by means of the gel failure upon destroying its interaction with mucin. Mucin was chosen as an adequate matrix overexpressed in colorectal tumors [38]. Based on the rheological and mucoadhesion properties, the MT-gel was chosen, owning a fitting cohesiveness, hardness and mucoadhesion.

Release studies and kinetic of gel stability are usually studied in vitro using flow-through method using operated in open-loop mode is capable of maintaining a continuous flow of fresh dissolution medium [39]. However, result found are relative results based on the experimental conditions. In order to evaluate the gel elimination and protein release in relevant conditions, we performed these experiments in vivo using labelled polymer and protein. To avoid any risk of interaction of the labels, only 1 % of P407-Cy5 was incorporated in the formulation. As regard to Cyal, only one Cy5 was grafted to avoid any aggregation of the protein and modify its structure. This was controlled by means of flow field flow fractionation coupled with multi-angle light scattering.

In order to evaluate the residence time of the gel within intratumoral injection, we labelled the poloxamer 407 with the fluorescent dye cyanine 5. We observed a persistence of the mucoadhesive gel 5 days after injection. Moreover, the residence time of Cy5 labelled protein incorporated on the mucoadhesive gel persisted 7 days after intratumoral injection. These gels therefore appear to present required qualities for local immunomodulation. Indeed, the process of DC maturation is greater than 100 hours and the matured DC that migrate to lymph nodes have a life expectancy of only few days [40]. Thus, a prolonged release of immunomodulatory agents on the tumor environment over 100 hours could improve the maturation of DC and increase the proportion of migrated DC to the lymph nodes.

The effectiveness of DC maturation is dependent on the bioactivity of the immunomodulatory agents after gel incorporation. We used TF-1 test, described in the literature for the past three decades, as a standard method to assess the bioactivity of GM-CSF and IL-3 [41]. We observed a maintained bioactivity of GM-CSF after incorporation on the gel, confirming the non-toxicity of the used polymers [33]. Then, we demonstrated the ability of the gel containing GM-CSF and HKMT to increase the maturation of DC. Indeed, the expression of CD86+/CD80+ costimulatory factors on matured DC was higher after incubation with the complete gel formulation as compared to gel containing GM-CSF or HKMT alone. The expression of co-stimulatory factors is necessary to activate naïve T cells [36]. It was demonstrated that CD86+/CD80+ expression by DC is reduced in GM-CSF-deficient mice [36]. DC interaction with mycobacteria family is known to increase the surface density of molecules such as MHC II, CD80+, CD86+, and IL-12 production that are involved in interaction with DC [42].

The intratumoral administration of GM-CSF and HKMT loaded Gel showed an inhibition of tumor growth, while the administration of the solution of these immunomodulatory agents demonstrated minimal effects. Indeed, the injection of the solution in the tumor increased the concentration of GM-CSF on the tumor microenvironment and probably caused the protein to leak into the circulatory system, which induced immunosuppressive effects as described by several studies [43] [16] [44]. These results confirmed the need of a sustained delivery form to control the delivery of GM-CSF and avoid systemic side effects. We have shown a control of tumor volume mediated by cytotoxic T cells infiltration on the tumor with MTI-gel treatment. In human, involvement of tumor infiltration of T cells to obtain an antitumor immune response is considered to be predictive factors, associated with long-term survival of patients [45]. The injection of immunomodulatory gels into the tumor induces a local effect but does not allow an effective systemic response necessary for the control of distant tumors (unpublished data). This could be explained by the low immunogenicity of colorectal tumors and the need to induce tumor neoantigens to induce an effective immune response [46]. Thus, the MTI-gel designed in this study could be a vector for the sustained release of immunomodulatory molecules in the tumor microenvironment to improve the antitumor immune response.

Author contributions

NM VB and RM conceived the thermogel and managed the project. CL and CAL performed rheological studies. CR labelled the poloxamer dye cy5. OB did IHC staining. KL and JSE did *in vivo* experiments and IHC analyses. KL did the cellular *in vitro* tests. CC participated to flow cytometry analysis. KL and NM wrote and the manuscript. JSE, CL and VB participated to manuscript edition.

Funding sources and conflict of interest

This work was supported by the SATT IDF Innov. Authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors would like to thank the LIOPA, the animal optical imaging platform, Faculty of Pharmacy, and Paris Descartes University, France.

5. References and notes

- [1] R.L. Sabado, S. Balan, N. Bhardwaj, Dendritic cell-based immunotherapy, *Cell Research*. 27 (2017) 74–95. doi:10.1038/cr.2016.157.
- [2] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.-J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka, Immunobiology of Dendritic Cells, *Annual Review of Immunology*. 18 (2000) 767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- [3] K.M. Ardeschna, C.P. Corney, S.J. Ings, M.J. Watts, D.C. Linch, S. Devereux, A Clinically Applicable Method for the ex vivo Generation of Antigen-Presenting Cells from CD34+ Progenitors, *Vox Sanguinis*. 79 (2000) 46–52. doi:10.1159/000031205.
- [4] H. Jähnisch, S. Füssel, A. Kiessling, R. Wehner, S. Zastrow, M. Bachmann, E.P. Rieber, M.P. Wirth, M. Schmitz, Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Prostate Cancer, *Clinical and Developmental Immunology*. 2010 (2010) 1–8. doi:10.1155/2010/517493.
- [5] R.J. Barth, D.A. Fisher, P.K. Wallace, J.Y. Channon, R.J. Noelle, J. Gui, M.S. Ernstoff, A Randomized Trial of Ex vivo CD40L Activation of a Dendritic Cell Vaccine in Colorectal Cancer Patients: Tumor-Specific Immune Responses Are Associated with Improved Survival, *Clinical Cancer Research*. 16 (2010) 5548–5556. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2138.
- [6] K. Palucka, H. Ueno, L. Roberts, J. Fay, J. Banchereau, Dendritic Cells: Are They Clinically Relevant?, *The Cancer Journal*. 16 (2010) 318–324. doi:10.1097/PPO.0b013e3181eaca83.
- [7] C.R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, L.V. Yang, In vitro Cell Migration and Invasion Assays, *Journal of Visualized Experiments*. (2014). doi:10.3791/51046.
- [8] P.J. Tacken, I.J.M. de Vries, R. Torensma, C.G. Figdor, Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting, *Nature Reviews Immunology*. 7 (2007) 790–802. doi:10.1038/nri2173.
- [9] G. Häcker, V. Redecke, H. Häcker, Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA, *Immunology*. 105 (2002) 245–251.
- [10] F. Antequera, A. Bird, Number of CpG islands and genes in human and mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 11995–11999.
- [11] A.B. Alexandroff, A.M. Jackson, M.A. O'Donnell, K. James, BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on, *The Lancet*. 353 (1999) 1689–1694. doi:10.1016/S0140-6736(98)07422-4.
- [12] E. Orihuela, H.W. Herr, C.M. Pinsky, W.F. Whitmore, Toxicity of intravesical BCG and its management in patients with superficial bladder tumors, *Cancer*. 60 (1987) 326–333.
- [13] J. Stebbing, A. Dalglish, A. Gifford-Moore, A. Martin, C. Gleeson, G. Wilson, L.R. Brunet, J. Grange, S. Mudan, An intra-patient placebo-controlled phase I trial to evaluate the safety and tolerability of intradermal IMM-101 in melanoma, *Annals of Oncology*. 23 (2012) 1314–1319. doi:10.1093/annonc/mdr363.
- [14] L. van de Laar, P.J. Coffey, A.M. Woltman, Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy, *Blood*. 119 (2012) 3383–3393. doi:10.1182/blood-2011-11-370130.
- [15] J. Cebon, P. Dempsey, R. Fox, G. Kannourakis, E. Bonnem, A.W. Burgess, G. Morstyn, Pharmacokinetics of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using a sensitive immunoassay, *Blood*. 72 (1988) 1340–1347.
- [16] P. Serafini, R. Carbley, K.A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, I. Borrello, High-Dose Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Producing Vaccines Impair the Immune Response through the Recruitment of Myeloid Suppressor Cells, *Cancer Research*. 64 (2004) 6337–6343. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0757.

- [17] O.A. Ali, N. Huebsch, L. Cao, G. Dranoff, D.J. Mooney, Infection-mimicking materials to program dendritic cells in situ, *Nat Mater.* 8 (2009) 151–158. doi:10.1038/nmat2357.
- [18] E. Kizana, I.E. Alexander, Cardiac gene therapy: therapeutic potential and current progress, *Curr Gene Ther.* 3 (2003) 418–451.
- [19] G. Driessens, L. Nuttin, A. Gras, J. Maetens, S. Mievis, M. Schoore, T. Velu, L. Tenenbaum, V. Préat, C. Bruyans, Development of a successful antitumor therapeutic model combining in vivo dendritic cell vaccination with tumor irradiation and intratumoral GM-CSF delivery, *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 60 (2011) 273–281. doi:10.1007/s00262-010-0941-y.
- [20] F. Wu, L. Dai, L. Geng, H. Zhu, T. Jin, Practically feasible production of sustained-release microspheres of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF), *Journal of Controlled Release.* 259 (2017) 195–202. doi:10.1016/j.jconrel.2017.04.004.
- [21] R. Madan-Lala, P. Pradhan, K. Roy, Combinatorial Delivery of Dual and Triple TLR Agonists via Polymeric Pathogen-like Particles Synergistically Enhances Innate and Adaptive Immune Responses, *Scientific Reports.* 7 (2017). doi:10.1038/s41598-017-02804-y.
- [22] L.A. Dailey, N. Jekel, L. Fink, T. Gessler, T. Schmehl, M. Wittmar, T. Kissel, W. Seeger, Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung, *Toxicology and Applied Pharmacology.* 215 (2006) 100–108. doi:10.1016/j.taap.2006.01.016.
- [23] P. Alexandridis, T. Alan Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 96 (1995) 1–46. doi:10.1016/0927-7757(94)03028-X.
- [24] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil, A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics, *Pharmaceutical Research.* 23 (2006) 2709–2728. doi:10.1007/s11095-006-9104-4.
- [25] N. Zeng, G. Dumortier, M. Maury, N. Mignet, V. Boudy, Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties, *International Journal of Pharmaceutics.* 467 (2014) 70–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.055.
- [26] I.R. Schmolka, Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns, *Journal of Biomedical Materials Research.* 6 (1972) 571–582. doi:10.1002/jbm.820060609.
- [27] M.B. Lutz, N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rössner, F. Koch, N. Romani, G. Schuler, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, *J. Immunol. Methods.* 223 (1999) 77–92.
- [28] J. Seguin, B.-T. Doan, H. Latorre Ossa, L. Jugé, J.-L. Gennisson, M. Tanter, D. Scherman, G.G. Chabot, N. Mignet, Evaluation of Nonradiative Clinical Imaging Techniques for the Longitudinal Assessment of Tumour Growth in Murine CT26 Colon Carcinoma, *International Journal of Molecular Imaging.* 2013 (2013) 1–13. doi:10.1155/2013/983534.
- [29] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 671–675.
- [30] G. Ponchel, Bioadhesive analysis of controlled-release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly (acrylic acid)-containing systems, *J. Control. Release.* (1987) 129–141.

- [31] A.K. Palucka, L.M. Coussens, The Basis of Oncoimmunology, *Cell*. 164 (2016) 1233–1247. doi:10.1016/j.cell.2016.01.049.
- [32] B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64 (2012) 154–162. doi:10.1016/j.addr.2012.09.012.
- [33] J.E. Matthew, Y.L. Nazario, S.C. Roberts, S.R. Bhatia, Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic F127, *Biomaterials*. 23 (2002) 4615–4619.
- [34] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer*. 49 (2008) 1993–2007. doi:10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- [35] C.-C. Lin, A.T. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58 (2006) 1379–1408. doi:10.1016/j.addr.2006.09.004.
- [36] F. Madsen, K. Eberth, J.D. Smart, A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration, *J Control Release*. 50 (1998) 167–178.
- [37] V.V. Khutoryanskiy, Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers, *Macromolecular Bioscience*. 11 (2011) 748–764. doi:10.1002/mabi.201000388.
- [38] Y. Niv, T. Rokkas, Mucin Expression in Colorectal Cancer (CRC): Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Clinical Gastroenterology*. (2018) 1. doi:10.1097/MCG.0000000000001050.
- [39] Z. Gao, In Vitro Dissolution Testing with Flow-Through Method: A Technical Note, *AAPS PharmSciTech*. 10 (2009) 1401–1405. doi:10.1208/s12249-009-9339-6.
- [40] F. Sallusto, A. Lanzavecchia, The instructive role of dendritic cells on T-cell responses, *Arthritis Res*. 4 Suppl 3 (2002) S127–132. doi:10.1186/ar567.
- [41] T. Kitamura, T. Tange, T. Terasawa, S. Chiba, T. Kuwaki, K. Miyagawa, Y.-F. Piao, K. Miyazono, A. Urabe, F. Takaku, Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin, *Journal of Cellular Physiology*. 140 (1989) 323–334. doi:10.1002/jcp.1041400219.
- [42] A. Sinha, N. Salam, S. Gupta, K. Natarajan, Mycobacterium tuberculosis and dendritic cells: recognition, activation and functional implications, *Indian J. Biochem. Biophys*. 44 (2007) 279–288.
- [43] G. Parmiani, C. Castelli, L. Pilla, M. Santinami, M. Colombo, L. Rivoltini, Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients, *Annals of Oncology*. 18 (2006) 226–232. doi:10.1093/annonc/mdl158.
- [44] K.S. Clive, J.A. Tyler, G.T. Clifton, J.P. Holmes, E.A. Mittendorf, S. Ponniah, G.E. Peoples, Use of GM-CSF as an adjuvant with cancer vaccines: beneficial or detrimental?, *Expert Review of Vaccines*. 9 (2010) 519–525. doi:10.1586/erv.10.40.
- [45] J.-F. Emile, C. Julié, K. Le Malicot, C. Lepage, J. Tabernero, E. Mini, G. Folprecht, J.-L. Van Laethem, S. Dimet, C. Boulagnon-Rombi, M.-A. Allard, F. Penault-Llorca, J. Bennouna, P. Laurent-Puig, J. Taieb, J. Thaler, R. Greil, J. Gaenger, W. Eisterer, J. Tschmelitsch, F. Keil, H. Samonigg, A. Zubernigg, F. Schmid, G. Steger, R. Steinacher, J. Andel, B. Jagdt, A. Lang, M. Fridrik, R. Függer, F. Hofbauer, E. Woell, D. Geissler, A. Lenauer, M. Prager, G. D'Haens, G. Demolin, J. Kerger, G. Deboever, G. Ghillebert, M. Polus, E. Van Cutsem, H.R. Kalantari, T. Delaunoit, J.C. Goeminne, M. Peeters, P. Vergauwe, G. Houbiers, Y. Humblet, J. Janssens, D. Schrijvers, E. Vanderstraeten, J.-L. Van Laethem, J. Vermorken, D. Van Daele, M. Ferrante, F. Forget, A. Hendlisch, M. Yilmaz, S.E. Nielsen, L. Vestermark, J. Larsen, M.-A. Zawadi, O. Bouche, L. Mineur, J. Bennouna-Louridi, L.M. Dourthe, M. Ychou, E. Boucher, J. Taieb, D. Pezet, F. Desseigne, M. Ducreux, P. Texereau, L. Miglianico, P. Rougier, S. Fratte, C.-B. Levasse, Y.

Merrouche, S. Ellis, C. Locher, J.-F. Ramee, C. Garnier, F. Viret, B. Chauffert, I. Cojean-Zelek, P. Michel, C. Lecaille, C. Borel, J.-F. Seitz, D. Smith, C. Lombard-Bohas, T. Andre, J.-M. Gornet, F. Fein, M.-A. Coulon-Sfairi, M.-C. Kaminsky, J.-P. Lagasse, D. Luet, P.-L. Etienne, M. Gasmi, A. Vanoli, S. Nguyen, T. Aparicio, H. Perrier, N. Stremmsdoerfer, P. Laplaige, D. Arsene, D. Auby, L. Bedenne, R. Coriat, B. Denis, P. Geoffroy, G. Piot, Y. Becouarn, G. Bordes, G. Deplanque, O. Dupuis, F. Fruge, R. Guimbaud, T. Lecomte, G. Lledo, I. Sobhani, A. Asnacios, A. Azzedine, C. Desauw, M.-P. Galais, D. Gargot, Y.-H. Lam, A. Abakar-Mahamat, J.-F. Berdah, S. Catteau, M.-C. Clavero-Fabri, J.-F. Codoul, J.-L. Legoux, D. Goldfain, P. Guichard, D.P. Verge, J. Provencal, B. Vedrenne, C. Brezault-Bonnet, D. Cleau, J.-P. Desir, D. Fallik, B. Garcia, M.-H. Gaspard, D. Genet, J. Hartwig, Y. Krummel, T.M. Budnik, V. Palascak-Juif, H. Randrianarivelo, Y. Rinaldi, A. Aleba, A. Darut-Jouve, A. de Gramont, H. Hamon, F. Wendehenne, A. Matzdorff, M.K. Stahl, W. Schepp, M. Burk, L. Mueller, G. Folprecht, M. Geissler, L. Mantovani-Loeffler, T. Hoehler, W. Asperger, H. Kroening, L.F. von Weikersthal, S. Fuxius, M. Groschek, J. Meiler, T. Trarbach, J. Rauh, N. Ziegenhagen, A. Kretzschmar, U. Graeven, A. Nusch, G. von Wichert, R.-D. Hofheinz, G. Kleber, K.-H. Schmidt, U. Vehling-Kaiser, C. Baum, J. Schuette, G.M. Haag, W. Holtkamp, J. Potenberg, T. Reiber, G. Schliesser, H.-J. Schmoll, W. Schneider-Kappus, W. Abenhardt, C. Denzlinger, J. Henning, B. Marxsen, H.G. Derigs, H. Lambertz, I. Becker-Boost, K. Caca, C. Constantin, T. Decker, H. Eschenburg, S. Gabius, H. Hebart, A. Hoffmeister, H.-A. Horst, S. Kremers, M. Leithaeuser, S. Mueller, S. Wagner, S. Daum, F. Schlegel, M. Stauch, V. Heinemann, E. Maiello, L. Latini, A. Zaniboni, D. Amadori, G. Aprile, S. Barni, R. Mattioli, A. Martoni, R. Passalacqua, M. Nicolini, E. Pasquini, C. Rabbi, E. Aitini, A. Ravaioli, C. Barone, G. Biasco, S. Tamberi, A. Gambi, C. Verusio, M. Marzola, G. Lelli, C. Boni, S. Cascinu, P. Bidoli, M. Vaghi, G. Cruciani, F. Di Costanzo, A. Sobrero, E. Mini, R. Petrioli, M. Aglietta, O. Alabiso, F. Capuzzo, A. Falcone, D.C. Corsi, R. Labianca, S. Salvagni, S. Chiara, L. Ciuffreda, F. Ferraù, F. Giuliani, S. Lonardi, N. Gebbia, G. Mantovani, E. Sanches, J.C. Mellidez, P. Santos, J. Freire, C. Sarmiento, L. Costa, A.M. Pinto, S. Barroso, J.E. Santo, F. Guedes, A. Monteiro, A. Sa, I. Furtado, R. Salazar, E.A. Aguilar, F.R. Herrero, J. Tabernerero, J.S. Valera, M.V. Ayerbes, J.F. Batlle, S. Gil, A.A. Esteve, C. Garcia-Giron, G.L. Vivanco, A.S. Salvia, V.A. Orduña, R.V. Garcia, J. Gallego, B.M. Sureda, J. Remon, M.J. Safont Aguilera, L.C. Nogueras, B.Q. Merino, C.G. Castro, P.M. de Prado, C.P. Pericay, M.C. Figueiras, I.G. Jordan, M.J. Gome Reina, A.L.-L. Garcia, A.A. Garcia-Ramos, A. Cervantes, C.F. Martos, E.M. Gaspar, I.C. Montero, P.E. Emperador, A.L. Carbonero, M.G. Castillo, T.G. Garcia, J.G. Lopez, E.G. Flores, M.G. Morales, M.L. Muñoz, A.L. Martín, J. Maurel, J.C. Camara, R.D. Garcia, M. Salgado, I.H. Busquier, T.C. Ruiz, A.L. Muñoz, M.N. Aliguer, A.V.O. de Taranco, M.M. Ureña, F.L. Gaspa, J.J. Ponce, C.B. Roig, P.V. Jimenez, A.G. Brotons, S.A. Rodriguez, J.A. Martinez, L.C. Ruiz, M.C. Ruiz, J. Bridgewater, R. Glynne-Jones, S. Tahir, T. Hickish, J. Cassidy, L. Samuel, Prospective validation of a lymphocyte infiltration prognostic test in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX, *European Journal of Cancer*. 82 (2017) 16–24. doi:10.1016/j.ejca.2017.04.025.

[46] N.L. de Vries, M. Swets, A.L. Vahrmeijer, M. Hokland, P.J.K. Kuppen, The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment, *Int J Mol Sci*. 17 (2016). doi:10.3390/ijms17071030.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons développé et caractérisé un Sol-Gel avec des propriétés mucoadhésives pour permettre d'augmenter le temps de résidence après injection intratumorale et la biodisponibilité locale des immunomodulateurs GM-CSF et HKMT.

Pour cela, un cahier de charge bien défini a été établi. Il était nécessaire de mettre au point une solution injectable à base de polymères biocompatibles capables de former un gel. La température de transition sol-gel recherchée devait permettre de manipuler les préparations à l'état sol lors de leur formulation et de leur injection et d'obtenir un gel à la température physiologique. De plus, l'hydrogel devait avoir un temps de résidence prolongée la tumeur afin de libérer les immunomodulateurs sur une durée déterminée

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des copolymères approuvés par la FDA. La formulation optimale d'hydrogel était composée de poloxamer 407 et de Satiaxane connue pour augmenter la force de mucoadhésion des hydrogels (Zeng et al. 2014). Cette formulation a ainsi montré des propriétés rhéologiques intéressantes qui lui confèrent une bonne élasticité. De plus, le gel avait une force de mucoadhésion élevée et un temps de résidence prolongé dans la tumeur. Par ailleurs, nous avons montré que les deux immunomodulateurs GM-CSF et le HKMT incorporés dans le gel étaient nécessaires à l'activation des DC.

Enfin, l'injection intratumorale du Gel-GM-CSF-HKMT a montré une activité antitumorale supérieure à celle obtenue par l'injection des immunomodulateurs seuls, ce qui confirme l'intérêt d'utiliser un système de libération contrôlée. En fonction des études publiées, nous avons émis l'hypothèse qu'une dose élevée de GM-CSF induisait des effets immunosuppresseurs et expliquait l'absence d'efficacité de l'injection de la solution de GM-CSF et de HKMT. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse du microenvironnement tumorale après injection des différentes formulations serait nécessaire.

Par ailleurs, nous avons adapté la dose de GM-CSF en fonction des doses décrites chez l'homme et de l'étude préclinique publiée par Yarong Liu and al (Yarong Liu et al. 2014). Cependant, pour une dose précise et ajustée, nous devons réaliser des tests de libération afin de connaître les doses de GM-CSF libérées en fonction du temps. Des premières expériences réalisées sur un modèle expérimental en cours de validation n'ont pas été concluantes.



III. Traitement des tumeurs colorectales murines par l'association RFA et gel immunomodulateur



1. Preuve de concept et mises au point préliminaires

Le but de ce travail est d'évaluer l'efficacité de l'immunomodulation locale dans l'amplification de la réponse immunitaire induite par RFA sur deux modèles de tumeurs colorectales chez la souris. Des travaux préliminaires ont montré la faisabilité de l'étude. En effet, l'association de la RFA et de l'immunomodulation locale a été testée sur un modèle de rats BD-IX porteurs de tumeurs colorectales DHD-K12. Les résultats ont montré une augmentation de la survie des animaux traités par le traitement complet comparé aux animaux traités par RFA seule, associée à une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire par les lymphocytes T CD3+ (Figure 21).

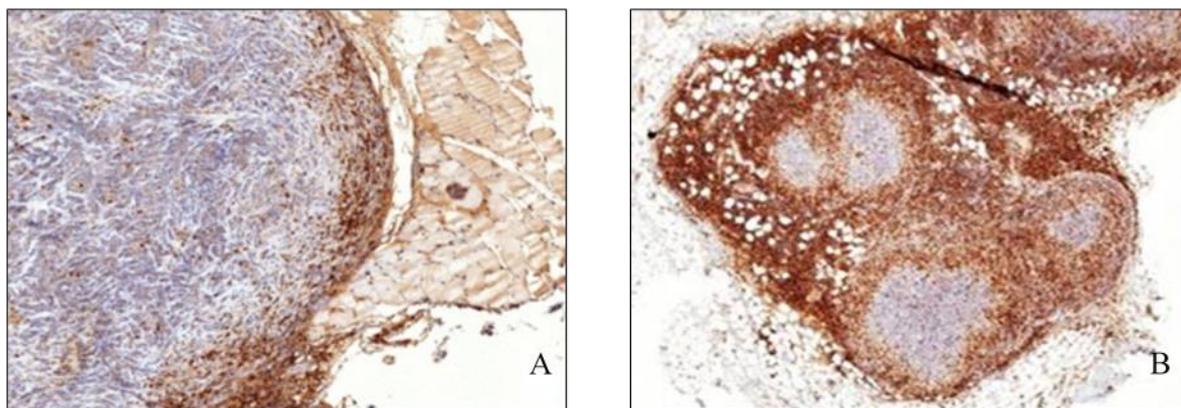


Figure 21 Infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs distantes chez le rat BDI-X. Les tumeurs secondaires du groupe RFA(A) ou RFA + Gel-GM-CSF-BCG (B) sont prélevées et un marquage en immunohistochimie des lymphocytes T CD3 est réalisé.

Cependant, cette étude réalisée sur un petit nombre d'animaux n'a pas pu être reproduite sur les rats BD-IX car cette lignée n'est plus commercialisée par le fournisseur. Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle murin Balb/c porteur de tumeurs colorectales CT26 Syngénique de la souris.

Nous avons testé plusieurs conditions expérimentales pour refléter au mieux la situation clinique de traitement adjuvant (modèle I) et de maladie résiduelle (modèle II). Dans le modèle I, plusieurs concentrations de cellules CT26 ont été injectées par voie sous-cutanée et un suivi de la croissance tumorale a été réalisé. Ceci nous a permis de choisir la concentration de cellules tumorales permettant d'obtenir une micro-métastase. Pour le

modèle II, ou les tumeurs primaires et secondaires sont injectées le même jour, nous avons choisi d'implanter un fragment tumoral afin de mimer une macro-métastase.

Enfin, nous avons établi les paramètres de traitement par RFA chez la souris. La taille minimale de tumeur pouvant être traitée, le temps de traitement ainsi que les paramètres de puissance de l'appareil ont été mis en place. Ceci a permis à la fois d'éviter une mortalité des animaux due à la RFA et permettre le traitement complet de la tumeur primaire par la RFA.

2. Résumé de l'article2

L'ablation par radiofréquence (RFA) des métastases hépatiques d'origine colorectales permet l'activation d'une réponse T spécifique. Cette réponse ne permet pas d'éviter les récives. Récemment, l'immunomodulation locale a suscité des intérêts pour améliorer la réponse immunitaire dans les tumeurs et obtenir un effet abscopal permettant de traiter des métastases à distance. Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'association de la RFA et de l'immunomodulation locale pour traiter les métastases distantes du cancer colorectal (CRC). Tout d'abord, nous avons démontré que la RFA n'augmentait pas les TILs dans les tumeurs distantes des patients et sur un modèle de tumeurs colorectales murines. De manière remarquable, la RFA associée à l'immunomodulation locale a induit une régression complète des tumeurs secondaires microscopiques, liée à une forte réponse immunitaire spécifique. Ensuite, nous avons démontré que L'échappement immunitaire des larges lésions était inversé par l'ajout de l'inhibiteur de l'immune checkpoint anti-PD-1. L'absence de réponse immunitaire efficace chez les patients traités par RFA a confirmé la pertinence de cette nouvelle stratégie. L'augmentation de la réponse *in situ* induite par RFA fournit des adjuvants efficaces permettant d'induire un effet abscopal. Dans le cas des larges lésions, la synergie entre l'inhibiteur du checkpoint anti-PD-1, inefficace seul ou après une RFA seule, avec l'immunomodulation *in situ*, pourrait conduire à reconsidérer l'utilisation de l'inhibition de l'immune checkpoint dans le CCR métastatique.

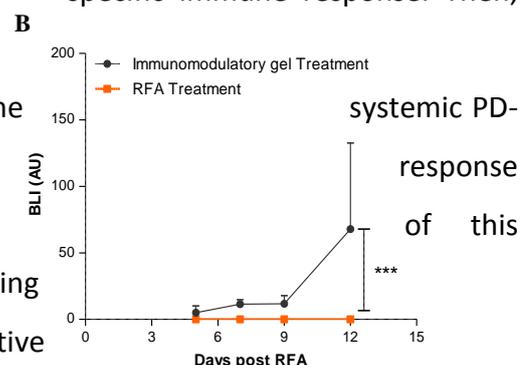
3. Article2: Local immunomodulation combined to radiofrequency ablation results in a complete cure of local and distant colorectal carcinoma. (Oncoimmunology)

Katia Lemdani^{1, 2,3}, Nathalie Mignet³, Vincent Boudy^{3, 6}, Johanne Seguin^{3, 8}, Edward Oujagir³, Olivia Bawa⁷, Frédérique Peschaud^{1, 2}, Jean-François Emile^{1, 5}, Claude Capron^{1, 4†}, Robert Malafosse^{1, 2*†}.

¹ EA4340 BCOH, Versailles University, Paris-Saclay University, Boulogne-92100, France. ² Department of Surgery and Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. ³ CNRS, UTCBS UMR 8258, F-75006 Paris, France ; Paris Descartes University, Sorbonne-Paris-Cité, F-75006 Paris, France ; INSERM, UTCBS U1022, F-75006 Paris, France ; Chimie ParisTech, PSL Research University, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), F-75005 Paris, France. ⁴ Immunology and hematology Department, Ambroise Paré Hospital Boulogne-92100, France. ⁵ Pathology Department, Ambroise Paré Hospital, AP-HP, Boulogne-92100, France. ⁶ Innovation in Pharmaceutical Formulation Department, Agence Générale des Equipements et des Produits de Santé (AGEPS), AP-HP, 7, rue du Fer à moulin, F-75005 Paris, France. ⁷ Unité de pathologie expérimentale de l'IRCIV, Gustave Roussy, Villejuif 94805, France. ⁸ Optical imaging platform LIOPA, Life imaging, PIV, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Paris, France.

Abstract

Radiofrequency ablation (RFA) of colorectal liver metastases activates a specific T-cell response that is ineffective in avoiding recurrence. Recently, local immunomodulation garnered interests as a way to improve the immune response. We were interested in improving the RFA immune response priming to propose a curative treatment of colorectal cancer (CRC) based on antitumor immunity. First, we demonstrated that the RFA did not increase the tumor infiltrating lymphocytes in secondary distant tumors of patients and in mice model and could not avoid relapse. Remarkably, RFA and intratumoral immunomodulation with GM-CSF-BCG hydrogel induced complete cure of microscopic secondary lesions in mice, related to a strong specific immune response. Then, we demonstrated that the immune escape of large secondary lesions was reversed by addition of the 1 blockade. The lack of an effective distant immune response in patients treated with RFA confirmed the relevance of this new combination strategy. Increasing the in situ priming response of radiofrequency ablation provides effective



adjuvants to induce an abscopal effect. In the case of large lesions, synergy between PD-1 blockade inhibitor, ineffective alone or after single RFA, with in situ immunomodulation, could lead to reconsideration of the use of checkpoint inhibition in metastatic CRC.

1. Introduction

Results of radiofrequency ablation (RFA), increasingly used in clinical practice to treat metastatic liver tumors ¹, are compromised by high rates of local and systemic relapse²⁻³. Several studies showed a T-cell specific response after RFA in patients with malignant liver tumors. However, this response was not correlated with a clinical efficacy⁴.

Clinical trials using autologous cancer cells, expressing all tumor antigens, combined with Bacillus Calmette-Guerin (BCG) showed a potential benefit for patients with colorectal tumor ⁵⁻⁶. To improve immunogenicity, autologous cells were genetically modified to secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), required on the tumor site to induce specific immunity ⁷⁻⁸. Efficiency of adjuvants, GM-CSF or BCG, was related to the local recruitment and maturation of DC which represents the critical step in cell-mediated antitumor response ⁹⁻¹⁰. However, high concentrations of systemic GM-CSF can also result in immune suppression ¹¹. Considering these adverse effects, the in situ controlled release of GM-CSF has been proposed. Biomaterials, such as polymer or gel, were used to enhance vaccine efficacy, avoiding the side effects of the systemic delivery, and preventing protein degradation ¹².

Immune checkpoint inhibitors, particularly programmed cell death protein1, provide favorable results in colorectal carcinoma patients with mismatch repair deficiency (MMR), which represents only 5 to 15 % of cases. Shi et al demonstrated that anti-PD1 improved RFA efficacy in mice colorectal tumors ¹³. The lymphocytes CD8⁺ T infiltrating tumors are the only the ones expressing PD-1 phenotype ¹⁴. In addition, vaccination strategies have been shown to stimulate antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with tumors. However, these CD8⁺ T cells remain hypo-responsive at the tumor site and cannot eradicate the tumor¹⁵. Therefore, it appears necessary to strongly prime and amplify this immune response in order to gain significant clinical benefits.

In this work, we propose to prime a strong anti-tumor immune response during RFA of murine colorectal tumors. For this purpose, we combined RFA with local stimulation using GM-CSF

and BCG. The local delivery of the drugs was performed thanks to a thermo-reversible hydrogel in order to optimize the bioavailability of the immunomodulatory combination. This combination strategy was carefully chosen to be directly applied in standard protocols of colorectal cancer treatment.

2. Results

RFA treatment did not increase TILs in colorectal hepatic metastases in patients

It has been demonstrated that RFA induces a systemic immune response in patients with colorectal carcinoma⁴. However, only few studies were interested in the immune environment outside the tumor zone ablation. In order to investigate modification of the immune infiltrate after RFA in patients with liver metastases from colorectal carcinoma, we performed a retrospective study. Thirteen patients who received initial hepatic RFA followed by distant liver tumor resection were included in the 'RFA (+)' group, whereas 40 paired patients who received liver tumor resection only were identified as 'RFA (-)' group. Patients were matched according to age, sex, number and size of metastases and tumor status. (Table S1).

We evaluated lymphoid cells density in distant liver metastases by automatic count, as described by Allard and al.²⁹. Our data showed low lymphocyte densities of CD3, CD4 and CD8 on the patient tumors (Fig. 1A). Furthermore, lymphocyte infiltration analysis showed similar patterns for all markers in both groups; characterized by a small increase of TILs on the tumor front (Fig. 1B).

There was no difference in the density of CD3 + TILs liver metastases between RFA (+) group and RFA (-) group in each of tumor tissue, tumor front, and the surrounding non tumor tissue (Fig. 1C, Table S1). In addition, we observed no difference on CD8+ TILs and CD4+ TILs expression between both groups of patients (Fig. 1D, 1E, Table 1S). Finally, the expression of FoxP3 TILs was similar (Data not shown). These data suggest that RFA of liver metastases did not induce an increase of TILs count in distant lesions. The combination of RFA and local immunotherapy (BCG-GM-CSF) could improve anti-tumor immune response in liver metastases from colorectal cancer.

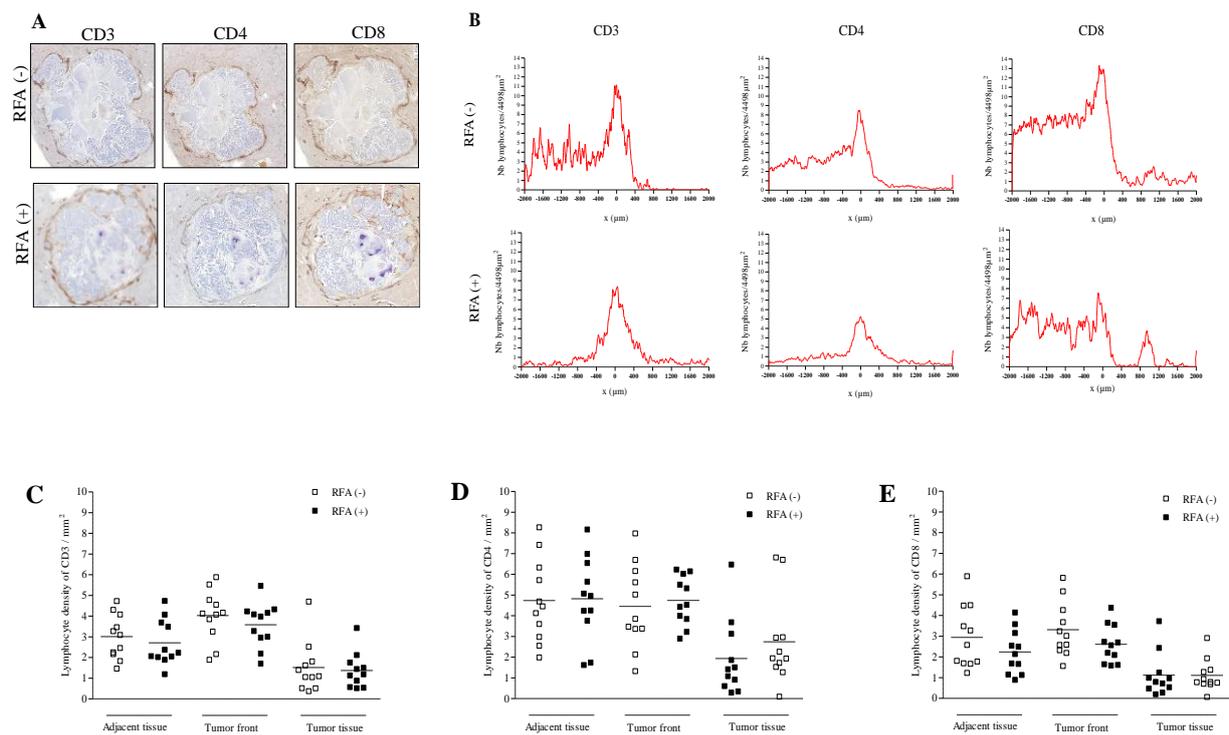


Fig.1. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) quantification in human liver metastases. (A). Representative images showing CD3, CD4 and CD8 staining of patients from RFA (-) group and RFA (+) group. **(B).** Patterns of TILs CD3, CD4 and CD8 densities according to the distance from tumor invasive front. **(C, D, E).** Lymphocytes density of CD3, CD4, and CD8 T cells on tumor biopsies in adjacent tissue (negative distance), tumor front (0) and tumor tissue (positive distance).

Combination of RFA and local immunostimulation resulted in complete cure of local and distant mice tumors

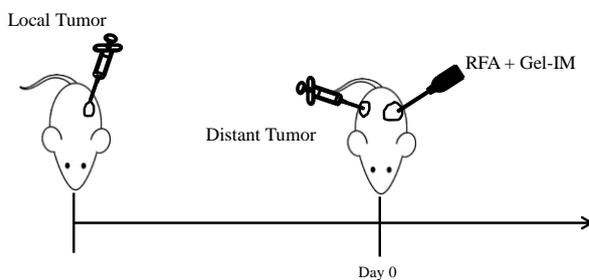
To further investigate the antitumor effect of RFA associated with the local administration of GM-CSF and BCG, mice were grafted with a CT26-Luc fragment on the right flank. When each tumor reached the adequate volume, it was treated with RFA followed by intratumoral hydrogel injection. Simultaneously, a distant tumor was grafted on the left flank by injection of CT26-Luc cells to mimic an adjuvant situation (Fig. 2A). We found that GM-CSF-BCG loaded gel alone had a short effect on the local tumor whereas RFA induced a significant complete regression of the treated tumor (Fig. 2B). The changes on distant tumor growth were visualized by bioluminescence imaging (Fig. 2C). RFA treatment alone showed only a short inhibitory effect on distant tumor progression. RFA combined with GM-CSF and BCG liquid

solution had a modest effect. By contrast, complete treatment (RFA+ Gel-GM-CSF-BCG) resulted in a complete tumor regression at 15 days after treatment. Moreover, CD8⁺ T cells depletion of mice treated with the complete combination completely abolished the control of tumor growth (Fig. 2D), confirmed that the treatment effects was mediated by CD8⁺ T cells. Mice survival was significantly improved with RFA with local complete combination as compared to all other groups (Fig. 2E) with a survival of 50% of mice, 9 months after treatment.

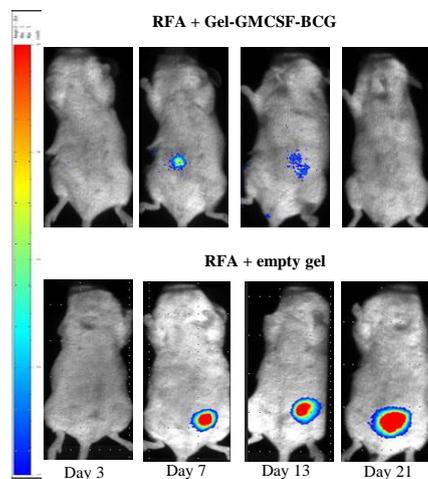
Antitumor immune memory of cured mice

To evaluate the immunological memory of T lymphocytes, mice which showed a complete regression of distant tumors were re-challenged with CT26-Luc cells and a CT26-Luc fragment. As shown in fig. 2F, no tumor growth was observed after tumor cells injection and rapid regression was observed after tumor fragment implantation. Our results show that RFA combined with local immunostimulatory hydrogel induced a strong antitumor immunity able to eliminate residual tumors and control tumor recurrences.

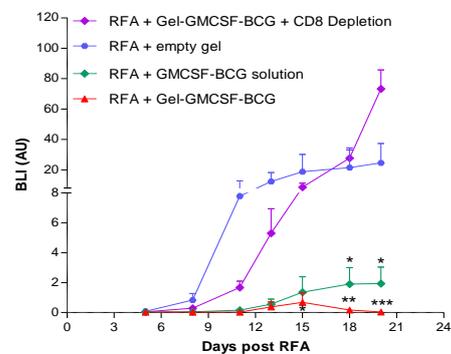
A



C



D



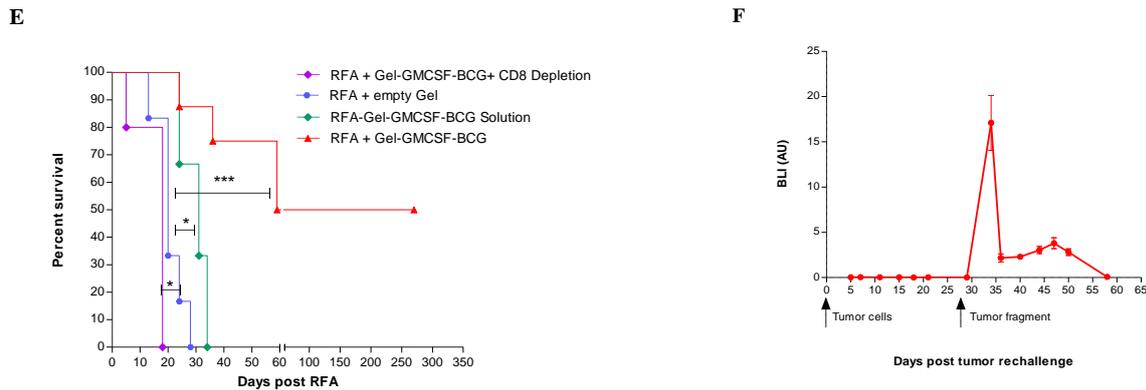


Fig. 2. RFA and Gel-GM-CSF-BCG combination therapy improve antitumor effect of RFA as compared to RFA alone in adjuvant model and maintain immunity against tumor re-challenge. (A). Panel treatment. Balb/c mice were implanted subcutaneously with CT26-Luc tumor fragment on the right flank, when the tumor reached about 300 mm³, RFA was applied with respected parameters (Temperature above 60°C, 2 cycles time) and the hydrogel containing GM-CSF and BCG (Gel-IM) was injected in the treated tumor by the same route. The distant tumor was implanted (25000 CT26-Luc cells) on the opposite flank of the mice. (B). Effect of RFA on the local treated tumor. The tumor volume was measured with bioluminescence imaging every three days after RFA. Mice were injected by i.p. route with 2 mg of Luciferin and signal acquisition was performed with an iCDD camera during 10 minutes, (n = 10 per group). (C). Representation of the distant tumor growth with Bioluminescence imaging on day 3, 7, 13 and 21 after treatment. (D). Monitoring of distant tumor growth with bioluminescence (n=10). Mice were injected by i.p. route with 2 mg of Luciferin and signal acquisition was performed with iCDD camera during 10 minutes (n = 10 per group). A two-way repeated measure ANOVA with Bonferroni posttest was performed. The results were represented with arbitrary unit. (E). Kaplan–Meier survival curves are shown. Long-rank test was performed, *** $P < 0,001$. (F). Memory antitumor response. Mice of RFA + Gel-GM-CSF-BCG group which presented a complete regression of distant tumor were re-challenged successively with tumor cells at day 0 and tumor fragments at day 29. Tumor volume was measured by bioluminescence every 3 days (n=4). Error bars=SD, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$, *** $P < 0. 001$.

Combination treatment provides an increased infiltrating T cells in the distant tumors.

Given the capacity of RFA combined to GM-CSF -BCG loaded gel to inhibit tumor growth, we sought to determine the intratumoral infiltration of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, CD4⁺ T helper lymphocytes, FoxP3 regulator T lymphocytes and CD45R B Lymphocytes The distant tumors were harvested at day 17 after treatment and TILs were evaluated by immunohistochemistry; as described in material and methods. We observed a significant increase of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltration in distant tumors with RFA and local immunostimulation. The level of FoxP3 expression was also enhanced (Fig.3A, 3B). However, B lymphocytes infiltration on distant tumors was similar in all groups (data not shown). These

results indicate that treatment of the local tumor with RFA combined with Gel-GM-CSF-BCG induce a sustained immune response in the distant tumor, mediated by effector T cells.

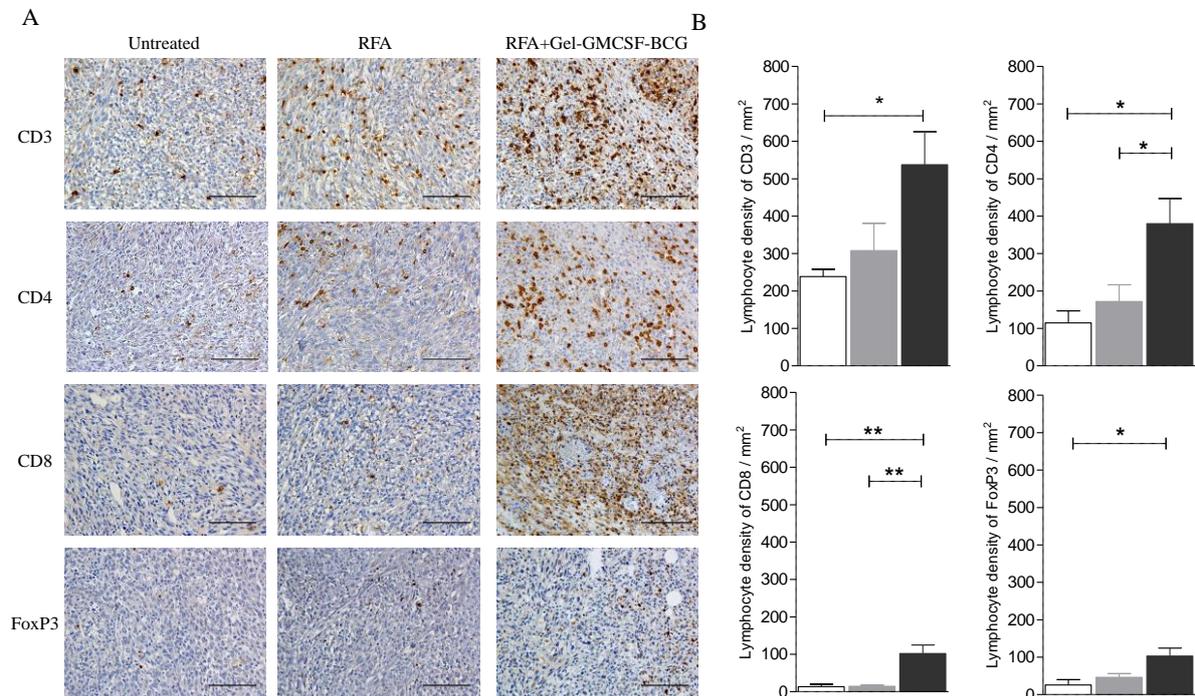


Fig. 3. IHC analysis demonstrated an increase of TILs with complete combination therapy. Tumors from Untreated, RFA and RFA + Gel-GM-CSF-BCG groups were removed 17 days and fixed for further analysis (n =5). IHC's staining CD3, CD4, CD8, FoxP3 were performed. (A). Representative images of Tumor-infiltrating lymphocytes in the different groups. Scale bar 50 μ m. (B). Quantification of lymphocytes density on the tumor using macro image J as described on supplementary materials (S1, S2, S3, and S4). White bar represents the untreated group, grey bar, the RFA treated group and the black column the group which received the complete treatment. Anova test with Bonferroni's Comparison Test was performed, * P <0.05, ** P <0.01.

Intratumoral Gel-GM-CSF-BCG administration increased systemic specific T cell immune responses induced by RFA

To determine the impact of local tumor immunomodulation on the systemic response, we analyzed CD4⁺ and CD8⁺ T cells populations from the spleen by flow cytometry. Spleen cells were harvested, incubated in culture medium alone or with heated CT26-Luc cells, and then stained with anti CD3, CD4 and CD8 antibodies. No differences were found between the percentage of cells in untreated, RFA and complete treatment groups (data not shown).

In order to study the function of peripheral T lymphocytes, we analyzed the ability of T cells from the spleen to produce IFN- γ and TNF- α . PMA/ionomycine stimulation, used as positive control, showed an increase of TNF- α and IFN- γ expression in all groups, confirming the

features of T lymphocytes. We did not observe differences of expression of both cytokines expression by CD4+ and CD8+ T cells between RFA group and the control. By contrast, the expression of IFN- γ and TNF- α by T cells was increased by a factor of 4 with the complete combination therapy (Fig. 4A).

Cytokines expression within CD4 and CD8 T cells were significantly higher in the complete treatment group after stimulation with heated CT26-Luc (Fig.4B), which demonstrates the specificity of the antitumor immune response.

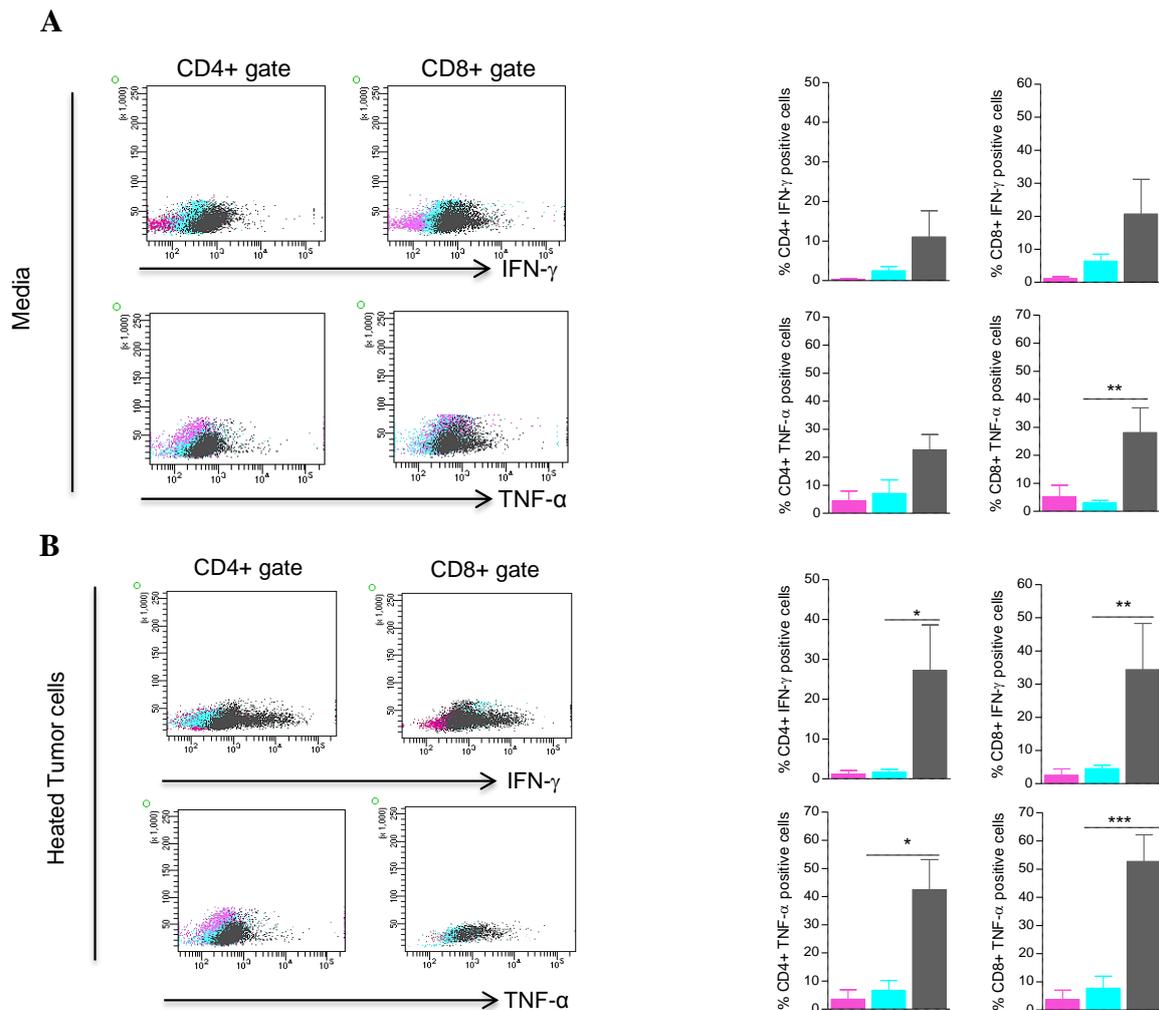


Fig. 4. Induction of specific T cells response after RFA+ Gel-GM-CSF-BCG treatment. At day 17 after treatment, spleen from Untreated (pink color), RFA (blue color) and RFA + Gel-GM-CSF-BCG (grey color) groups were removed (n =5). The organs were dissociated and splenocytes were collected in fresh media. Flow cytometry analysis of IFN- γ and TNF- α secreted by T CD4+ and T CD8+ was performed. (A). IFN- γ and TNF- α positive cells analysis on fresh non stimulated splenocytes. (B). $2 \cdot 10^4$ CT26-Luc cells were incubated at 46°C for 1 hour and co-culture with $2 \cdot 10^5$ fresh splenocytes. IFN- γ and TNF- α expressed by stimulated splenocytes was analyzed by flow cytometry. Anova test was used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Association of RFA and local immunotherapy with anti PD-1 resulted in a synergistic antitumor effect in a model of distant macrometastasis.

The efficacy of PD-1 blockade therapy is related to a pre-existing T cell immune response (31, 32). As we shown in the previous experiments an increased T cells mediated immune response with the combined treatment, we investigated the addition of an anti-PD1 treatment to RFA-local immunomodulation to treat macrometastases. For this purpose, we developed a model of large lesions and evaluated this association. The local and distant tumors were grafted at the same time in the opposite flanks of mice. The local tumor was treated as described above and systemic administration of anti-PD1 was performed 4 times every three days following the RFA combination treatment (Fig. 5A).

We observed a greater effect of RFA and Gel-GM-CSF-BCG combination compared to RFA therapy alone. The systemic administration of anti-PD1 enhanced RFA + Gel-GM-CSF-BCG effect on distant tumor and led to a complete regression of distant tumor on the majority of mice (Fig. 5B). The complete treatment had also a great effect on the survival of mice with 33% of mice survival after 4 months (Fig. 5C).

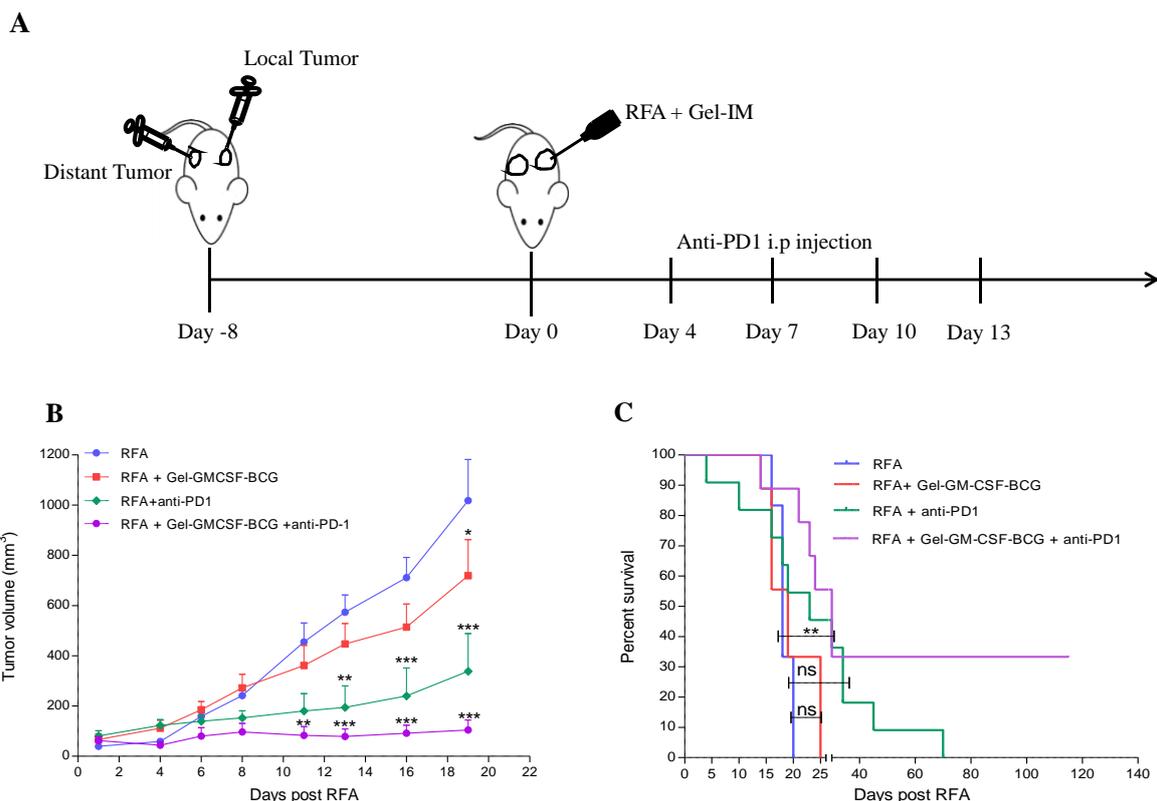


Fig. 5. RFA and Gel-GM-CSF-BCG combination therapy improve PD-1 response in macro metastases model. (A) Panel treatment. Balb/c mice were implanted subcutaneously with CT26-Luc tumor fragment on both flanks. The local tumor was treated with RFA and the hydrogel containing GM-CSF and BCG was injected by the same route. Anti-PD1 was injected 4 times after treatment at days 4, 7, 10 and 12. (B) Tumor volume of distant tumor was measured every 3 days with calliper and the volume was calculated according to the formula (Width*Width*Length /2). n=10 per group. Anova Test. (C)

Kaplan–Meier survival curves are shown in this graph, long-rank test was performed, ns: non-significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Effect of complete combination and anti PD-1 on lymphoid and myeloid cells infiltrating the tumor

To assess the involvement of immune cells in the different group of mice, we analyzed intratumoral TILs (defined as $CD3^+ CD4^+ CD8^+$) and MDSCs (defined as $Gr1^+ CD11b^+$ cells) in the distant tumors of mice, 13 days post treatment. The tumors were dissociated and $CD45^+$ cells were collected. We observed a 2 fold to a 20-fold increase of the $CD45^+$ immune cells in the distant tumor of the complete treated mice as compared to untreated, RFA + anti PD1, RFA and RFA-Gel- GM-CSF-BCG groups (data not shown). MDSCs analysis demonstrated a significant decrease of MDSCs $Ly6G^+ CD11b^+$ cells infiltrating tumors from complete treatment group mice as compared to the other groups (Fig. 6A). There was no difference in macrophages F4/80 cells and dendritic cells $CD11c^+ CD80^+ CD86^+$ (data not shown). Inversely, T cell infiltration was characterized by a significant increase of $CD8^+$ T cells proportion, while the proportion of $CD4^+$ T cells was similar (Fig. 6B).

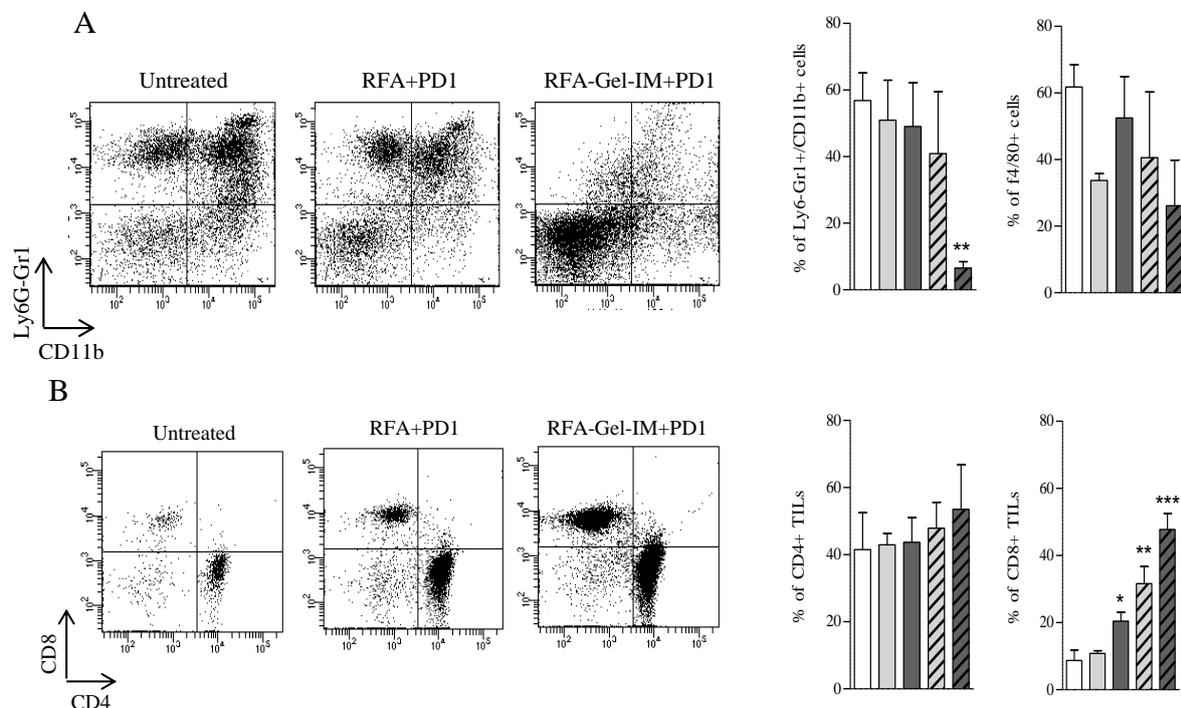


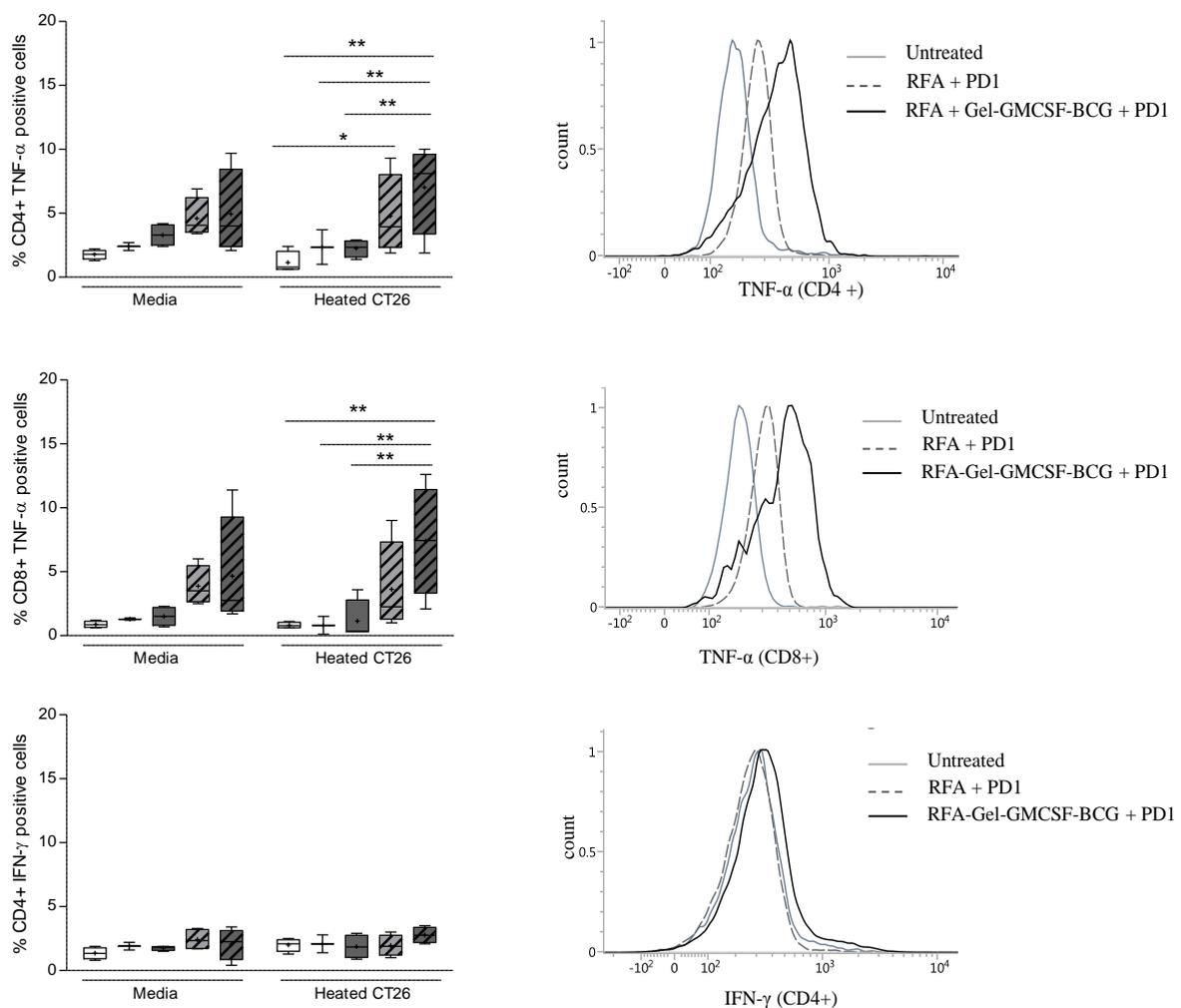
Fig. 6. Complete treatment of primary tumors increased cytotoxic T lymphocytes and decreased MDSC in distant tumors. Mice were treated as described in Fig. 5. At day 13 after treatment, secondary tumors (n=5/group) from untreated (white bars), RFA (light grey bars), RFA - Gel-GM-CSF-BCG (dark grey), RFA + anti PD1 (slashed light grey bars), and RFA-Gel-GM-CSF-BCG + anti PD1 (slashed

dark grey bars) groups were removed and hematopoietic cells were extracted as described in Materials and Method. MDSC and T lymphocytes were analyzed with anti CD11b and Ly6-G, anti CD3, CD4 and CD8 antibodies, antibodies respectively. Gel-GMCSF-BCG was replaced by 'Gel-IM' in these figures. Anova test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Systemic immune response with complete combination therapy and PD-1 Chekpoint inhibitor

We next assessed the composition and the activation status of lymphocytes in the spleen to explore whether systemic tumor antigen specific T cells had been induced. Spleens were recovered from mice 13 days after treatment and splenocytes were extracted and co-cultured with CT26 heated cells. We detected a significant increase of TNF- α producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells and a significant increase of IFN- γ producing CD8⁺ T in the complete treatment group as compared to the untreated group and the RFA + anti PD1 group (Fig.7).

These data suggest that the in situ immunomodulation with the thermosensitive hydrogel containing GM-CSF-BCG boosted RFA- anti PD-1 antitumor response and induced adaptive specific CD8⁺ T cell immune response.



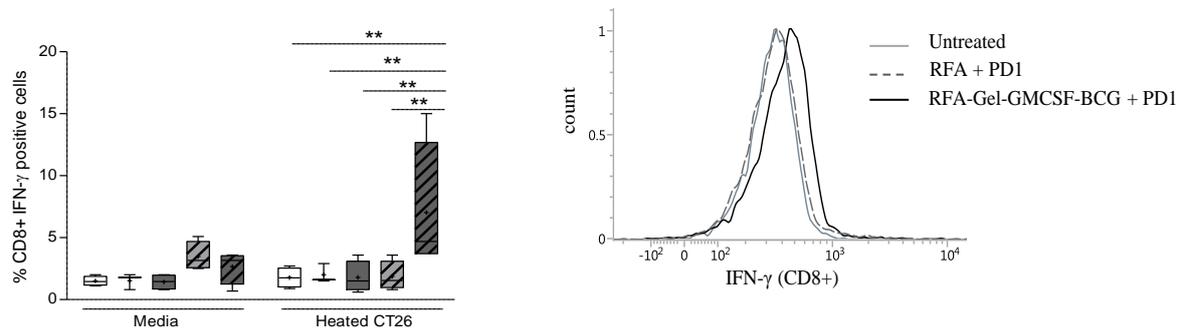


Fig. 7. The combination of RFA gel GM-CSF BCG with anti PD1 enhanced tumor specific T cell response. Mice were treated as described in figure 5. At day 13 after treatment, spleen from all groups (n=5/group) were removed and treated as described in figure 4. Flow cytometry analysis of IFN- γ and TNF- α expressed by CD4⁺ and T CD8⁺ T lymphocytes were performed. (A) Quantification of IFN- γ and TNF- α secreted by unstimulated and stimulated splenocytes with heated CT26 tumor cells from untreated (white box), RFA(light grey box), RFA- Gel-GM-CSF-BCG (dark grey box), RFA + anti PD1 (light grey hatched box), RFA -Gel-GM-CSF-BCG + anti PD1 (dark grey hatched box) groups. Anova test was performed. (B). Overlays representation of IFN- γ and TNF- α cytokines expressed on stimulated splenocytes by heated CT26 from untreated, RFA + anti PD1 and RFA-Gel-GM-CSF-BCG + anti-PD1 groups. Error bars: SD, Cross: Mean, Horizontal bar: median * P< 0.5, ** P< 0.01

3. DISCUSSION

In this study, we demonstrated that RFA alone does not improve the immune response on distant tumor in both mice model and patients with liver metastases from colorectal carcinoma. It has been established that RFA enhanced specific T cells response in patients with malignant liver tumors. Indeed, hyperthermia increases the release of tumor antigens¹⁶ and the induction of pro-inflammatory effect triggering the recruitment and maturation of DC. These pro-inflammatory effects appear related to the release of essential endogenous adjuvants, such as B1 nucleoproteins, hsp70 and gp96 heat shock proteins required for the activation of an effective antitumor immunity¹⁷.

Several analyses have shown that RFA is specifically associated with a systemic immune response and lymphocyte infiltration in the treated tumor¹⁸. However, these studies have not demonstrated any effect on distant tumors. In our retrospective study of patients, we were interested on the analysis of TILs within distant hepatic metastasis. Patients who received RFA followed by resection were matched with patients who received resection alone. We used an automatic lymphocyte counting method to study lymphoid infiltration on

the surrounding non tumor tissue, the tumor front and the tumor tissue of complete patient's biopsies¹⁹. We showed that RFA did not increase T CD4⁺ and T CD8⁺ infiltration in the tumor microenvironment of liver distant lesions, explaining the hepatic or systemic relapse observed. These results confirmed the necessity of enhancing the priming of T-cell immune response for an efficient immunotherapy in metastatic colorectal carcinoma.

To enhance immune response after RFA, we have chosen two adjuvants, BCG and GM-CSF. BCG vaccine is widely used in the treatment of bladder carcinoma²⁰. Live BCG vaccine has also been associated with irradiated tumor cells in immunotherapy trials for colon cancer²¹. It is now clear that TLR2 agonist, like BCG, potentiate the immune cell response via Toll-like receptors (TLRs). This activation, via complex signaling pathways, leads to the expression of inflammatory cytokines, TNF- α , IL-12, and up-regulates MHC class I molecules, playing a crucial role in the maturation of DC²². GM-CSF is an important chemokine for anti-tumor immune response regulation involved in the activation of both innate and adaptive immunity. The cytoplasmic domains of GM-CSF receptor are associated with the phosphorylation of Janus kinase 2 (JAK2) and regulates differentiation and maturation of macrophages²³. Nevertheless, through in situ interactions in the tumor micro-environment, GM-CSF was described as a potent tumor-promoting factor, increasing tumor cell growth in multiple cancer types²⁴⁻²⁵. RFA provided all tumour antigens like thermally inactivated autologous whole cells and reduces the risks of tumor escape with GM-CSF²⁶.

The advantage of a continuous release of GM-CSF has previously been shown, particularly in increasing to increase protein half-life and reducing the immunosuppressive effects observed at high doses. Here, we propose to control the intra-tumoral release of GM-CSF with the use of bio-adhesive thermosensitive hydrogel based on a previous physico-chemical study²⁷. The prepared solution is compatible with biomolecules and gelify at physiological temperature, allowing a larger surface of interaction and a prolonged effect. The formulation has been optimized for a prolonged release of GM-CSF over several days to allow the induction of an effective immune response (unpublished data).

Immunocompetent mice were grafted subcutaneously with local and distant tumors. The local lesion was treated with RFA associated with in situ immunotherapy to induce an immune response according two different protocols, distant microscopic and distant macroscopic tumors. This design simulated two very common clinical situations explaining the evolution

of distant occult or unresected lesions at the time of RFA treatment. In the adjuvant protocol targeting distant micrometastases, RFA combined with Gel-GM-CSF-BCG resulted in a complete response in mice, while the local administration of the immunomodulatory gel alone or RFA alone was ineffective. The abscopal effect resulted in a regression of distant lesions mediated by cytotoxic T cells response and increase animal survival. In human cancer, involvement of tumor infiltration of T cells to obtain an antitumor immune response is considered to be predictive factors, associated with long-term survival of patients²⁸⁻²⁹. In our strategy, RFA and local combination therapy showed a strong increase of TILs in the distant tumors. The complete response after tumor rechallenge confirmed the activation of a strong immune response. In this model, the cells effectors were not altered by the immunosuppressive microenvironment. The tumor infiltration was associated to the activation of peripheral lymphocytes with increase of IFN- γ and TNF- α synthesis inducing a Th1 immune response. This process might be an important mechanism underlying the synergistic effect of these combination therapies.

However, RFA and local immunomodulation increased TILs and controlled the distant tumor in adjuvant situation only. The combination strategy was not sufficient to treat macro metastases, suggesting the exhaustion of TILs and the overexpression of PD-1 phenotype. Monoclonal antibodies targeting the immune checkpoints, programmed cell death protein 1 particularly provided a clinical efficacy in gastrointestinal cancers with mismatch repair-deficiency (MMR). These tumors had more mutations producing neo-antigens, recognized and targeted by anti-tumor immune response. However, in microsatellite stable (MMS) colorectal cancers, checkpoint blockade did not demonstrate any effect suggesting that the efficacy of anti PD1 is associated with pre-existing antitumor immunity³⁰⁻³¹⁻³². Radiotherapy and checkpoint inhibitors combined have been shown to synergistically enhance antitumor immunity in preclinical studies³³. Moreover, Shi et al have shown that the association of RFA and anti PD1 is efficient in the treatment of metastatic colorectal cancer in mice¹³. Therefore, for the treatment of residual macro-disease, we proposed the association of local therapy (RFA + Gel-GM-CSF-BCG) with systemic anti PD-1 injection. We demonstrated a synergy between the local combination treatment and PD-1 checkpoint inhibitor. Indeed, this association inhibited growth of distant tumor, enhanced T cells infiltration and decreased MDSCs infiltration on distant tumors.

MDSCs have been functionally defined by their ability to suppress T cells in tumor-bearing mice, as well as cancer patients and then play an important role in tumor evasion of immunosurveillance³⁴. Recent reports have suggested that the survival, differentiation, and suppressive activity of MDSCs are influenced by TLR signaling³⁵. As MDSCs express TLRs and accumulate in cancer, they, (as well as DC), appear to be primary targets of TLR ligands when administered into tumor-bearing hosts. Activation of TLRs by administration of an appropriate ligand leads to loss of the suppressive activity of MDSCs, resulting in the inhibition of tumor growth by restoring anti-tumor T cell responses³⁶. Granulocyte-macrophage colony promotes the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells into MDSCs by activating nuclear factor kappa B (NF- κ B) and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) signal pathway³⁷. However, this activation is related to GM-CSF administered dose. In our study, we demonstrated that the control of GM-CSF release with the hydrogel avoids MDSCs stimulation and promotes T effectors activation.

In human CCR, several studies have shown that lymphocytic infiltration was a good prognostic factor¹⁹⁻³⁸, even in the colorectal liver metastasis³⁹. We, have shown an increase of T cells infiltration on distant tumor with complete treatment. Moreover, specific T cell response was activated as demonstrated by the increase of IFN- γ and TNF- α synthesis in lymphocytes from spleen after co-culture with heated tumor cells. Interestingly, RFA and PD-1 combination were less effective. In fact, the in-situ induction of a strong T cells mediated immune response led to the sensibility of the macroscopic distant tumor to PD-1 antibody. Both CD8⁺ T cells and IFN- γ expression are critical for anti-tumor immunity⁴⁰. IFN- γ secreted by immune cells in the tumor microenvironment induces growth arrest, MHC class I expression, contributes to the recruitment of effector cells, causes T-reg fragility and coordinates the process of innate and adaptive antitumor response⁴¹. Th1 cells promotes durable tumor specific CTL responses, are particularly important for activated T Cells maturation⁴² and induction of strong immunological memory against tumor rechallenge. In addition, IFN- γ signature is associated with better survival for pembrolizumab treated melanoma patients⁴³. Otherwise, TNF- α cytokine is produced by immune cells and has a capacity to suppress tumor cell proliferation and induce tumor regression. TNF- α is also a potent anti-tumor cytokine which enhances the activity of macrophages, NK cells and cytotoxic T cells⁴⁴. It has been shown that in situ

vaccination using IL-12 and TNF- α in microsphere generates a systemic anti-tumor immune response capable of eradicating distant metastasis ⁴⁵.

Here, we demonstrated that RFA associated with local immunomodulation increased specific T cells immune response and induced a complete tumor regression on adjuvant model.

Our data provided a strong rationale for a clinical assay evaluating the combination of RFA with *in situ* immunotherapy and PDL1/ PD-1 blockade therapy in patients with metastatic colorectal carcinoma, regardless of micro-satellites stability. After the liver treatment, this strategy could allow the control of a distant residual macroscopic disease on liver, lung, lymph nodes metastasis or untreated primitive lesion in reverse strategy.

4. Materials and methods

Study patient

In the digestive surgery department of Ambroise Paré hospital, between 2002 and 2012, 250 patients had a liver metastases resection for colorectal carcinomas. We retrospectively studied cancer tissue specimen from matched 53 patients. Among them 13 patients who received initial hepatic RFA followed by local tumor resection were included in the 'RFA (+)' group whereas other paired 40 patients who received initial local tumor resection were identified as 'RFA (-)' group. One patient from 'RFA (+)' group was coupled with 3 or 4 patients from 'RFA (-)' group according to the criteria described in Table 1. Paraffin-embedded samples were obtained from the Pathology Department and the tissue bank of Ambroise Paré Hospital, which has been registered with the French Ministry of Research (# DC 2009–933). Immunohistochemistry was performed with a Bond autostainer (Leica, Biosystems Newcastle Ltd) as described by Allard MA and al. (29). The primary antibodies were mouse monoclonal anti-CD3 (1/50 dilution, rabbit polyclonal, Dakocytomation.), (anti-CD4⁺ (1/30 dilution, clone 4 B12, Novocastra); anti-CD8⁺ (1/25 dilution, clone C8/144B, Dakocytomation) and anti-FoxP3 (1:100 dilutions; 623801, Biolegend, France) antibodies. Virtual tumor slides were obtained by scanning with Mirax Desk (Zeiss, Germany). Images were analyzed with Visilog 9.0 software (Noesis, Saclay, France); the area of quantification included both tumor tissue and the surrounding non tumor tissue.

Mice

Six to 8 week old female BALB/c mice were obtained from Janvier laboratories (Le Genest de l'île, France). Studies were conducted following the recommendations of the European Convention for the protection of vertebrates Animals use for Experimentation and the local Ethic Committee on Animal care and Experimentation.).

Local and distant tumors graft

The CT26 colon adenocarcinoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2638, LGC Standards, Molsheim, France). The CT26-Luc cell line was generated by transfection of wt-CT26 cell line with luciferase gene as reporter and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Life Technologies), 100 µM of streptomycin, 100 U/mL of penicillin and 0,4mg/ml of Geneticin (G418 sulfate, Gibco Life Technologies at 37°C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. A subcutaneous CT26-Luc tumor was resected, placed into sterile Phosphate buffer (Dulbecco's phosphate buffer, Sigma), cut into fragments of 30 mm³ and inserted subcutaneously using a 12-gauge trocar (38 mm) into the mouse flank, as local tumor. The mice were treated in 2 separate protocols. Protocol I was designed as a model of a clinical adjuvant situation with distant tumors established by 2.5×10^4 CT26-Luc cells injected into the other flank of mice, forming a microscopic tumor, at the time of the RFA. In the protocol II, the local and distant tumors were simultaneously grafted in the opposite flanks, as synchronous macroscopic distant lesions at the time of RFA.

Treatments and RFA procedure

Three weeks earlier, the mice were vaccinated by subcutaneous injection of BCG (BCG SSI, Sanofi Pasteur, France). Treatments were initiated when the tumor volume reached about 500mm³. Indeed, animals were anesthetized by i.p injection of Ketamin (80mg/ml) and Xylazin (10mg/ml). The ablation was performed using a radiofrequency probe (Cool-tip, Covidien, USA) inserted into the center of the tumor. The probe was removed when temperature reached 60°C within the tumor to ensure complete ablation of the target lesion.

Hydrogel injection

A 21% solution of poloxamer 407 (Kolliphor, BASF Germany) containing 0.1% of Satiaxane UCX930 mucoadherent gum (Kolliphor, BASF Germany) was prepared with deionized water. The solution was kept at 4°C until use. Concentrations of the components are expressed as weight/volume percentage (% w/v). The physicochemical properties of the hydrogel have been defined (unpublished data). 60µl of hydrogel containing 5µg of recombinant GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor, Miltenyi Biotec, France) and 5x10⁵ CFU of BCG (Sanofi Pasteur, France) was injected in the treated tumor zone using a 23-gauge needle, five minutes after RFA. In all experiments, tumors were measured with a digital caliper every 3 days. Tumor volumes were calculated in cubic millimeter using the following formula: length x width x width /2. Data shown are mean +/- SE.

Tumor growth monitoring by optical imaging

Luciferin potassium salt (D-luciferin, K⁺ salt Fluoprobes, Interchim) diluted in PBS was injected through i.p route at 2mg per mouse which is in large excess relative to the luciferase amount. Optical imaging was performed with a cooled intensified charge-coupled device (CCD) camera (Biospace, PhotonImager Paris, France). Luminescence acquisition was initiated 20 min after the injection of the substrate with duration of 10 min. The luminescence level was evaluated by an ROI applied to the tumor zone (software M3 Vision+ from Biospace Measure, Paris, France).

Flow cytometry analysis

To study tumor infiltrating lymphocytes (TILs), tumors were cut into small pieces, incubated in tumor dissociation kit mouse (Miltenyi Biotec, France) and then dissociated using the GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec, France). The cell suspension was filtered through a cell mesh of 70µm and resuspended in Phosphate buffer with 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin, ID Bio, France) for further analysis. All antibodies were purchased from BD Bioscience. TILs were analyzed with rat anti-mouse CD45⁺ V500 (clone 30-F11), rat anti-mouse PE-Cy7 CD3 (clone 17A2), rat anti-mouse APC CD4⁺ (clone RM4-5), rat anti-mouse APC-Cy7 CD8⁺ (clone 53-6.7).

Tumor infiltration by dendritic cells, macrophages and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) was analyzed with rat anti-mouse PE CD11c (clone HL3), and rat anti-mouse APC

CD86⁺ (cloneGL1), rat anti-mouse BV421F4/80 (clone T45-2342), rat anti-mouse Alexa fluor488 CD11b (clone M1/70), rat anti-mouse APC-H7 Ly-6G (clone 1A8).

Analysis of spleen lymphocytes was also performed. The spleen was dissociated in a potter and filtered through a cell mesh 70µm. The red blood cells were lysed with PharmLyse (559759, BD Bioscience) and cells were suspended in RPMI media 1640 (11875093, Invitrogen) containing 10% of FBS. Freshly spleen cells were incubated at 2.10⁵ cells per well plates in presence of heated CT26 cells (10µg/mL), medium, or PMA (10ng/mL), Ionomycin (1µg/mL) and Brefeldin A (10µg/mL) at 37°C. The intracellular cytokines were analyzed as described by BD Bioscience protocol. Briefly, cells were stained with rat anti-mouse CD45⁺ V500 (clone 30-F11), rat anti-mouse CD3 PE-Cy7 (clone 17A2), rat anti-mouse CD4⁺ APC (clone RM4-5), rat anti-mouse CD8⁺ APC-Cy7 (clone 53-6.7), fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution Kit (554714, BD Bioscience) and stained with rat anti-mouse Alexa Fluor 488 IFN-γ (clone XMG1.2), rat anti-mouse Alexa Fluor 488 TNF-α (clone MP6-XT22) and rat anti-mouse Alexa Fluor 488 IL-2 (clone JES6-5H4). Flow cytometry analysis was performed using a flow cytometer (FACS CANTO II, Becton Dickinson, France).

Immunohistochemical staining

Freshly collected tumors were fixed in Zinc and embedded in paraffin, and sections (4µm) were stained with hematoxylin eosin and safran. Paraffin sections were processed for heat-induced antigen retrieval, incubated with rabbit anti-mouse CD3 antibody (Dako) and rabbit anti-mouse Fox P3 antibody (Abcam, 1:1000). Staining was visualized by using the peroxidase/diaminobenzidine Rabbit PowerVision kit (ImmunoVision Technologies). For CD8⁺ immunohistochemistry, paraffin sections were incubated with a rat monoclonal anti-CD8⁺ antibody (1:100) (Neomarkers; LabVision). The membrane signal was revealed with the Polink 2 plus HRP detection kit (GBI Labs).

All slides were immunostained in cover plates the same day, guaranteeing a perfectly standardized intensity of staining. Each slide was examined using a microscope. A single representative whole tumor tissue section from each animal was digitized using a slide scanner. The lymphocyte density was quantified with image J as described in SI1.

Statistical analysis

Graph Pad Software was used to analyze data and determine statistical significance between groups. Unpaired student's test was used to compare groups on patient's study and determine statistical significance of differences on tumor growth between mice groups. Anova test was performed for IHCs and cytometry analysis. P values <0.05 were considered significant. The Kaplan-Meier method was used for survival analysis. P values were calculated with Log-rank test

5. Supplementary Materials

Number of Lymphocytes/mm ² (Mean)			
	RFA (+)	RFA(-)	p value
CD3			
Adjacent tissue	2,71 ± 1,10	3,01±1,06	0,51
Tumor front	3,58 ± 1,07	4,02 ± 1,23	0,39
Tumor tissue	1,37 ± 0,85	1,51 ± 1,23	0,792
CD4			
Adjacent tissue	4,82 ± 2,02	4,74 ± 2,00	0,89
Tumor front	4,74 ± 1,18	4,45 ± 2,02	0,74
Tumor tissue	2,74 ± 2,13	1,94 ± 1,85	0,18
CD8			
Adjacent tissue	2,23 ± 1,05	2,94 ±1,58	0,18
Tumor front	2,61 ± 0,90	3,31 ± 1,32	0,23
Tumor tissue	1,11 ± 0,79	1,12 ± 1,06	0,74

Table.S1. Statistical analysis of TILs CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in RFA (+) group and RFA (-) group. Lymphocyte densities on the adjacent tissue, the tumor front and tumor tissue were compared. T test was used.

-Lymphocyte analysis

IHC's analysis of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, FoxP3 were performed with the help of image J software [Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", Nature methods 9(7): 671-675, PMID 22930834]. The ImageJ script used was an original created macro, which is dedicated to segment histologic parameters on the basis

of contrast and color.

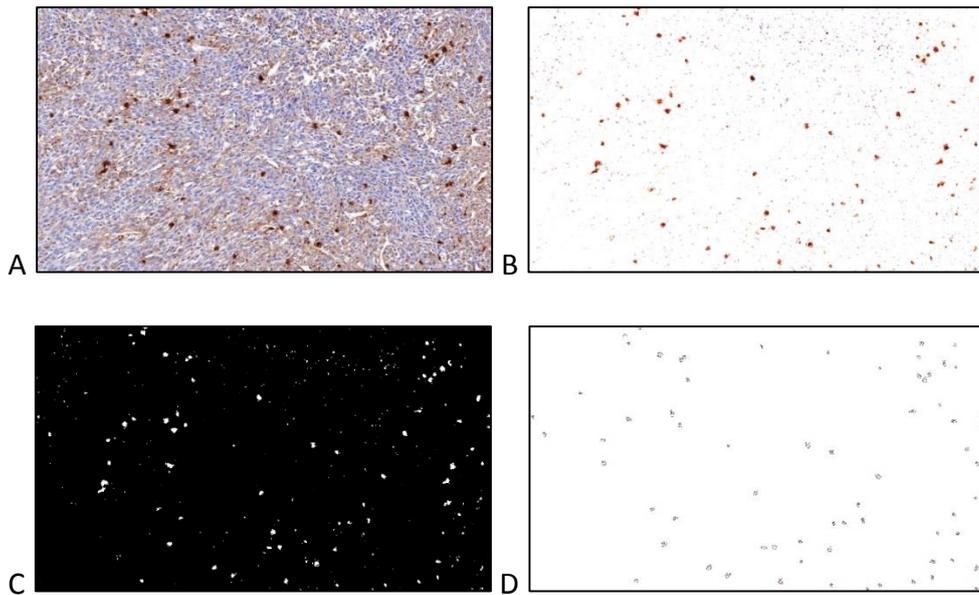


Fig.S1. CD3+ lymphocytes analysis. (A) The original picture. (B) The noise was removed "Despeckle" and the histogram color was adjusted from 0 to 121. (C) The image was then binarized. (D) Lymphocytes were counted "Analyze Particles from 10 to 80 μm^2 "

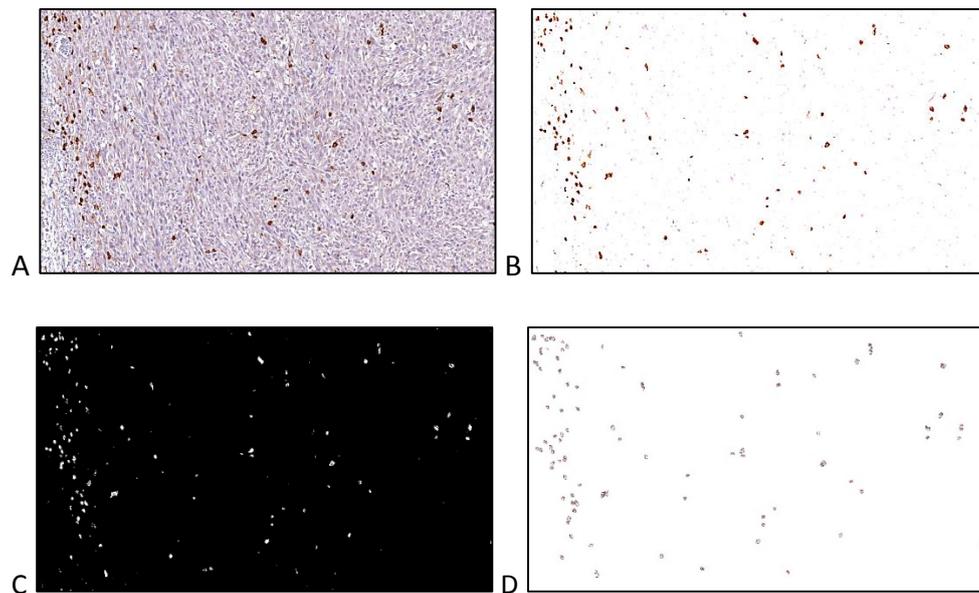


Fig.S2. CD4⁺ lymphocytes analysis. A similar treatment was applied to CD4⁺ marker with few different parameters. (A) The original picture. (B) The noise was removed "Despeckle" and the histogram color was adjusted from 50 to 150. (C) The picture was then binarized and the lymphocytes were separated "Watershed". (D) Lymphocytes were counted "Analyze Particles size from 10 to 80 μm^2 "

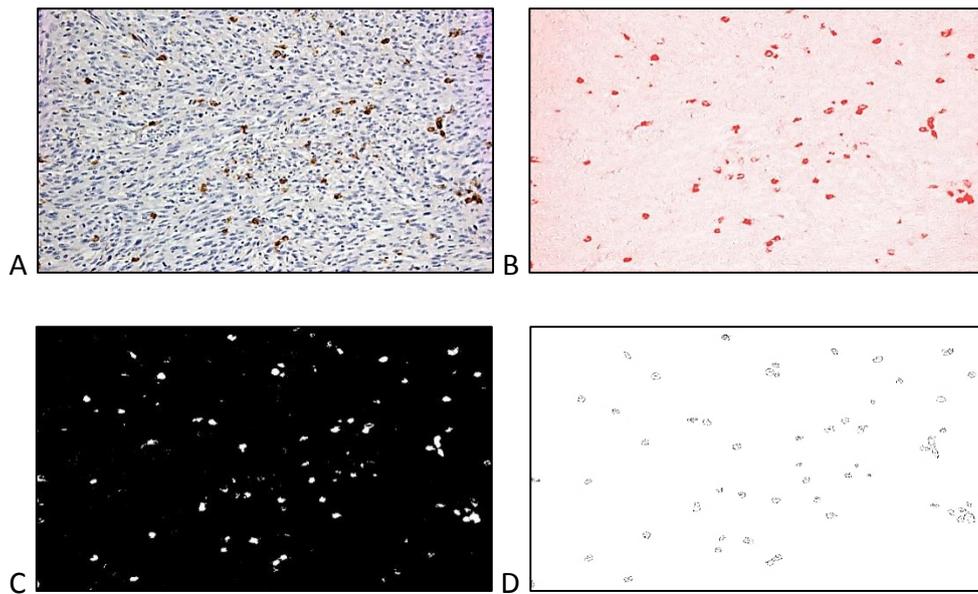


Fig.S3. CD8⁺ lymphocytes analysis. From original picture (A), a Color Deconvolution with RGB vectors was applied to CD8⁺ slices. (B) The next step of analysis was performed on the obtained red channel (C) the image was transformed in 8-bit and brightness and contrast was adjusted from 0 to 180. (D) After binarization of the image, four successive processes was applied "Dilate, Fill Holes, Erode and Watershed", and then analysis of particles from 10 to 80 μm^2 was made.

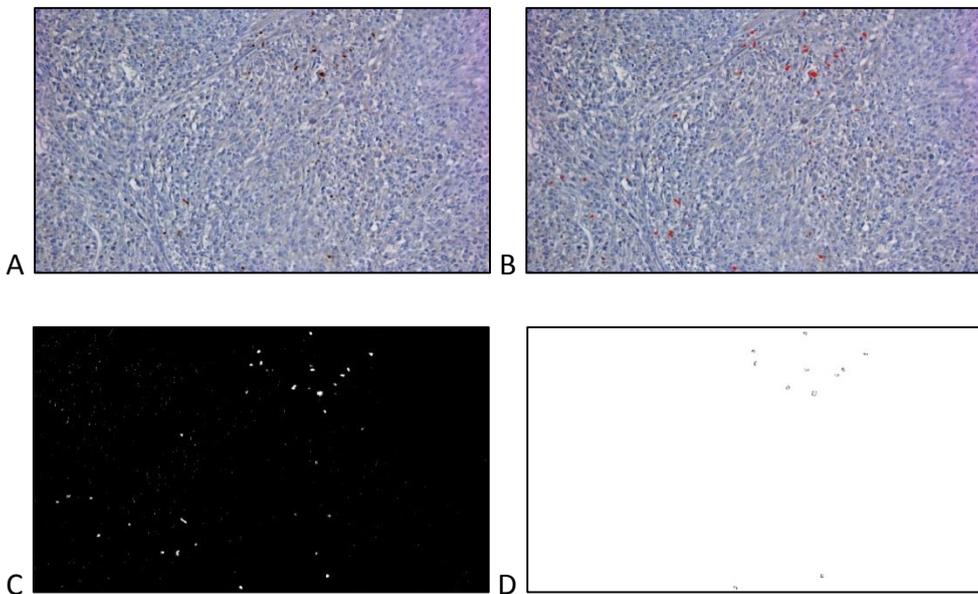


Fig.S4. FoxP3+lymphocytes analysis. (A) Original image. (B) The color threshold parameter has been set up manually as follow: Hue 31-225 pass untick, Saturation 74-255 pass tick, Brightness (automatic) pass tick, Thresholding method: Default, Threshold color B&W, Color space HSB. (C) The picture was converted to mask, binary and the segmentation of cells was realized with "Watershed". (D) Particles from 10 to 80 μm^2 were counted.

Acknowledgments. We would like to thank G. Carvalho from Milteny Biotec for her help on tumor dissociation protocol and Dr Mostafa El Hajjam for providing BCG vaccine. We thank the Animal Platform, Faculty of Pharmacy, and Paris Descartes University, France.

6. References and Notes

1. Ruers T, Punt C, Van Coevorden F, Pierie J, Borel-Rinkes I, Ledermann JA, Poston G, Bechstein W, Lentz MA, Mauer M, et al. Radiofrequency ablation combined with systemic treatment versus systemic treatment alone in patients with non-resectable colorectal liver metastases: a randomized EORTC Intergroup phase II study (EORTC 40004). *Ann Oncol*. 2012; 23(10):2619–2626. doi:10.1093/annonc/mds053
2. Berber E, Siperstein A. Local Recurrence after Laparoscopic Radiofrequency Ablation of Liver Tumors: An Analysis of 1032 Tumors. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15(10):2757–2764. doi:10.1245/s10434-008-0043-7
3. Wong J, Cooper A. Local Ablation for Solid Tumor Liver Metastases: Techniques and Treatment Efficacy. *Cancer Control*. 2016; 23(1):30–35. doi:10.1177/107327481602300106
4. Hänslér J, Till Wissniowski T, Schuppan D, Witte A, Bernatik T, Hahn EG, Strobel D. Activation and dramatically increased cytolytic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006; 12(23):3716–3721. doi:10.3748/wjg.v12.i23.3716
5. Köhne-Wömpner CH, Schöffski P, Schmoll HJ. Adjuvant therapy for colon adenocarcinoma: current status of clinical investigation. *Ann. Oncol*. 1994; 5 Suppl 3:97–104.
6. Mosolits S, Nilsson B, Mellstedt H. Towards therapeutic vaccines for colorectal carcinoma: a review of clinical trials. *Expert Review of Vaccines*. 2005;4(3):329–350. doi:10.1586/14760584.4.3.329
7. Simons JW, Sacks N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: The GVAX[®] vaccine for prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2006;24(5):419–424. doi:10.1016/j.urolonc.2005.08.021
8. Nemunaitis J, Murray N. Immune-Modulating Vaccines in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006; 1(7):756–761. Doi:10.1016/S1556-0864(15)30401-9
9. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Saito K, Takami S, Shimodaira S, Okamoto M, Ohkusa T, Koido S. Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016; 22(17):4275–4286. doi:10.3748/wjg.v22.i17.4275
10. Morisaki T, Matsumoto K, Onishi H, Kuroki H, Baba E, Tasaki A, Kubo M, Nakamura M, Inaba S, Yamaguchi K, et al. Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-pulsed dendritic cell vaccine and activated T cells for cancer patients: rationale, current progress, and perspectives. *Hum Cell*. 2003;16(4):175–182. doi:10.1111/j.1749-0774.2003.tb00151.x
11. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-Dose Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Producing Vaccines Impair the Immune Response through the Recruitment of Myeloid Suppressor Cells. *Cancer Res*. 2004;64(17):6337–6343. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0757
12. Driessens G, Nuttin L, Gras A, Maetens J, Mievis S, Schoore M, Velu T, Tenenbaum L, Pr at V, Bruyns C. Development of a successful antitumor therapeutic model combining in vivo dendritic cell vaccination with tumor irradiation and intratumoral GM-CSF delivery. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(2):273–281. Doi: 10.1007/s00262-010-0941-y
13. Shi L, Chen L, Wu C, Zhu Y, Xu B, Zheng X, Sun M, Wen W, Dai X, Yang M, et al. PD-1 Blockade Boosts Radiofrequency Ablation–Elicited Adaptive Immune Responses against Tumor. *Clin Cancer Res*. 2016;22(5):1173–1184. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1352

14. Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011; 121(6):2350–2360. doi:10.1172/JCI46102
15. Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini J-C, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P. Decreased specific CD8⁺ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *European Journal of Immunology*. 2006;36(7):1805–1814. doi:10.1002/eji.200535805
16. Den Brok MHMGM, Suttmuller RPM, Voort R van der, Bennink EJ, Figdor CG, Ruers TJM, Adema GJ. In Situ Tumor Ablation Creates an Antigen Source for the Generation of Antitumor Immunity. *Cancer Res*. 2004;64(11):4024–4029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3949
17. Shevtsov M, Multhoff G. Heat Shock Protein–Peptide and HSP-Based Immunotherapies for the Treatment of Cancer. *Front. Immunol*. 2016;7. doi:10.3389/fimmu.2016.00171
18. Zhou P, Liang P, Dong B, Yu X, Han X, Wang Y, Han Z. Long-term results of a phase II clinical trial of superantigen therapy with staphylococcal enterotoxin C after microwave ablation in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Hyperthermia*. 2011; 27(2):132–139. doi:10.3109/02656736.2010.506670
19. Emile J-F, Julié C, Malicot KL, Lepage C, Tabernero J, Mini E, Folprecht G, Laethem J-LV, Dimet S, Boulagnon-Rombi C, et al. Prospective validation of a lymphocyte infiltration prognostic test in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *European Journal of Cancer*. 2017; 82:16–24. doi:10.1016/j.ejca.2017.04.025
20. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *The Lancet*. 1999; 353(9165):1689–1694. doi: 10.1016/S0140-6736(98)07422-4
21. van den Eertwegh AJM. Active specific immunotherapy in colon cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2005; 165: 260–267.
22. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 178(2):479–488. doi:10.1084/jem.178.2.479
23. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, et al. The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell*. 2008; 134(3):496–507. doi:10.1016/j.cell.2008.05.053
24. Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, Meides A, Depner S, Mueller MM. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med*. 2013; 2(2):117–129. doi:10.1002/cam4.20
25. Hong I-S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Experimental & Molecular Medicine*. 2016; 48(7):e242. doi:10.1038/emm.2016.64
26. Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Stuart RK, Oken MM, Benson AB, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG. Adjuvant Active Specific Immunotherapy for Stage II and III Colon Cancer With an Autologous Tumor Cell Vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *JCO*. 2000; 18(1):148–148. doi:10.1200/JCO.2000.18.1.148
27. Zeng N, Mignet N, Dumortier G, Olivier E, Seguin J, Maury M, Scherman D, Rat P, Boudy V. Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 495(2):1028–1037. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.09.045

28. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–1964. doi:10.1126/science.1129139
29. Allard M-A, Bachet JB, Beauchet A, Julie C, Malafosse R, Penna C, Nordlinger B, Emile J-F. Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: a reproducible method, developed with colorectal cancer tissues, for assessing a highly variable prognostic factor. *Diagnostic Pathology*. 2012;7:156. doi: 10.1186/1746-1596-7-156
30. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *The Lancet Oncology*. 2014;15(11):e493–e503. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3
31. Galanternik F, Recondo G, Valsecchi ME, Greco M, Recondo G, de la Vega M, E Diaz Cantón null. What is the Current Role of Immunotherapy for Colon Cancer? *Rev Recent Clin Trials*. 2016; 11(2):93–98.
32. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, Taieb J. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(14):3738–3750. doi:10.3748/wjg.v20.i14.3738
33. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, Stratford IJ, Poon E, Morrow M, Stewart R, et al. Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. *Cancer Res*. 2014; 74(19):5458–5468. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1258
34. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman W-H, Pagès F, et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263–1271. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907
35. Laghi L, Bianchi P, Miranda E, Balladore E, Pacetti V, Grizzi F, Allavena P, Torri V, Repici A, Santoro A, et al. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3–T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *The Lancet Oncology*. 2009; 10(9):877–884. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70186-X
36. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen S-H, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H. The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res*. 2007; 67(1):425–425. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037
37. Shime H, Maruyama A, Yoshida S, Takeda Y, Matsumoto M, Seya T. Toll-like receptor 2 ligand and interferon- γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *OncImmunology*. 2017 Sep 21.
38. Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, Rapp M, Anz D, Endres S, Bourquin C. CpG Blocks Immunosuppression by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17(7):1765–1775. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2672
39. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(50):21248–21255. doi: 10.1073/pnas.1015855107
40. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN- γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; 410(6832):1107. doi: 10.1038/35074122

41. Overacre-Delgoffe AE, Chikina M, Dadey RE, Yano H, Brunazzi EA, Shayan G, Horne W, Moskovitz JM, Kolls JK, Sander C, et al. Interferon- γ Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell*. 2017; 169(6):1130-1141.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.05.005
42. D'Souza WN, Lefrançois L. IL-2 Is Not Required for the Initiation of CD8⁺ T cell cycling but Sustains Expansion. *The Journal of Immunology*. 2003; 171(11):5727–5735. doi:10.4049/jimmunol.171.11.5727
43. Ribas A, Flaherty KT. Gauging the Long-Term Benefits of Ipilimumab in Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Sep 22. doi:10.1200/JCO.2014.59.5041
44. Ostensen ME, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor-alpha enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *The Journal of Immunology*. 1987; 138(12):4185–4191.
45. Sabel MS, Skitzki J, Stoolman L, Egilmez NK, Mathiowitz E, Bailey N, Chang W-J, Chang AE. Intratumoral IL-12 and TNF- α -Loaded Microspheres Lead To Regression of Breast Cancer and Systemic Antitumor Immunity. *Annals of Surgical Oncology*. 2004; 11(2):147–156. doi:10.1245/ASO.2004.03.022

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré, dans un modèle murin, l'intérêt de la combinaison RFA et immunomodulation locale dans l'induction d'une réponse immunitaire efficace pour le traitement de tumeurs colorectales. La RFA est la technique la plus utilisée en pratique clinique pour le traitement de métastases hépatiques non résecables. Plusieurs auteurs ont décrit des effets immunomodulateurs associés à la RFA. Hansler et al ont observé une augmentation systémique du taux de lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ spécifiques chez les patients traités par RFA (Hansler et al. 2006b)). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Napolitano et al (Napoletano et al. 2008). Cependant, cette réponse systémique n'est pas suffisante pour empêcher la récurrence locale hépatique et extra hépatique.

Nous avons montré l'absence de différence quantitative et qualitative des lymphocytes infiltrant les métastases distantes après un premier traitement par RFA ou resection hépatique. Bien que les TILs représentent un facteur pronostique essentiel, nous n'avons pas trouvé d'étude publiée dans la littérature confirmant ces résultats. Ces données incitent à utiliser la RFA pour primer une réponse immune antitumorale qui doit être renforcée pour améliorer l'efficacité locale et étendre les effets systémiques du traitement local.

Nous avons choisi d'associer la RFA à une immunomodulation locale associant BCG et GM-CSF libérés dans la tumeur par un hydrogel. En effet, la RFA permet une libération d'antigènes tumoraux qui sont captés par les DC. L'hydrogel injecté dans la zone tumorale permet de libérer de façon prolongée du GM-CSF nécessaire à la survie, la maturation et la prolifération des DC et du BCG qui augmente la maturation des DC. Ainsi, les DC peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques, présenter les antigènes tumoraux et activer des lymphocytes T spécifiques.

Dans un premier temps, nous avons évalué cette approche sur un modèle murin de tumeurs CT26 reproduisant une situation adjuvante, c'est à dire le traitement d'une lésion jugée unique avec la présence de micrométastases distantes occultes. Ces métastases représentent la majorité des récurrences après traitement local des métastases hépatiques colorectales ((Langenberg et al. 2010). Nous avons montré que la RFA associée à l'injection *in situ* de l'hydrogel délivrant du BCG et du GM-CSF permettait une régression complète des tumeurs à distance et une survie prolongée jusqu'à 9 mois après traitement. Par contre, le traitement

par RFA associé à l'hydrogel contenant seulement le GM-CSF ou le BCG ou associé à l'injection d'une solution de GM-CSF et de BCG a été très peu efficace démontrant ainsi l'intérêt de la combinaison complète. Ces résultats confirment la nécessité de la libération prolongée de ces immunomodulateurs afin d'obtenir une efficacité optimale.

Par ailleurs, nous avons montré que l'induction d'une réponse immune anti-tumorale efficace était liée à une forte infiltration des lymphocytes dans les tumeurs distantes du site traité. Il est bien établi que le taux de TIL est un facteur pronostic indépendant de survie globale pour les cancers colorectaux (J. Galon 2006), (Allard et al. 2012) et leurs métastases hépatiques (Katz et al. 2009).

Dans un second temps, nous avons évalué l'efficacité de cette approche combinée dans un modèle de macrométastases distantes. Nous avons montré une efficacité limitée de la combinaison complète sur des macro-métastases distantes, probablement due à l'inhibition des TILs par l'expression de récepteurs de l'immune checkpoint. En effet, Ahmadzadeh et al ont montré une surexpression du récepteur PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur (Ahmadzadeh et al. 2009). Nous avons donc choisi d'associer un anti-PD1 à la combinaison RFA et l'hydrogel immunomodulateur pour traiter des tumeurs échappant à la combinaison RFA et hydrogel immunomodulateur seule. Cette association a permis une régression complète des tumeurs et une survie prolongée des animaux traités. Shi et al ont montré que la RFA associée à un anti-PD1 permettait d'augmenter la réponse immunitaire sur un modèle murin de tumeurs colorectales (Shi et al. 2016). Cependant, les résultats obtenus montrent une reprise de croissance des tumeurs après un mois de traitement. Notre travail confirme la nécessité de déclencher une forte réponse immunitaire après RFA pour améliorer l'efficacité de l'anti-PD1.

Notre travail a permis de mettre en évidence une régression complète de tumeurs colorectales sur un modèle murin après association de la RFA à l'immunomodulation locale. Cependant, notre étude présente quelques limites. En effet, le BCG avait été sélectionné comme adjuvant, en tant qu' agoniste des TLR, éléments clés en accord avec les résultats des essais précoces d'immunothérapie des CCR (Mosolits, Nilsson, et Mellstedt 2005). Ce vaccin est actuellement utilisé dans le traitement du cancer superficiel de la vessie mais des effets secondaires associés à la présence de bactéries vivantes dans le vaccin ont été rapportés (Böhle, Jocham, et Bock 2003). Il serait donc nécessaire de remplacer le BCG par un autre

agoniste possédant des propriétés immunomodultrices similaires mais sans risque infectieux. Actuellement, nous avons sélectionné d'autres éléments bactériens qui pourraient avoir les mêmes propriétés que le BCG mais nous devons valider leur efficacité sur le plan expérimental.

Pour améliorer l'analyse des résultats de notre stratégie, nous avons développé une méthode pertinente pour une meilleure analyse de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs. Nous avons travaillé dans le cadre d'une collaboration sur la validation d'une nouvelle méthode de quantification de l'infiltrat lymphocytaire. Cette approche devrait affiner la corrélation entre l'infiltrat lymphocytaire et la réponse à l'immunothérapie.

Par ailleurs, nous avons mis en place un modèle murin de métastases au sein du tissu hépatique pour mimer au mieux la situation clinique afin de valider notre stratégie dans un microenvironnement plus adapté.

Ces résultats sont décrits dans le chapitre IV.

IV. Résultats complémentaires



1. Sélection et étude des agonistes du BCG

1.1 Agonistes potentiels du BCG

Dans le cadre de l'étude décrite dans l'article 2, nous avons utilisé le BCG comme immunomodulateur. Cependant, à cause de toxicités décrites après injection *in situ* (Böhle, Jocham, et Bock 2003), nous avons choisi de sélectionner un agoniste du BCG pour le remplacer dans notre formulation d'hydrogel.

Nous avons établi, avec des Pharmaciens de l'AGEPS un cahier de charge pour la molécule à utiliser ; la molécule choisie devra avoir une autorisation de mise sur le marché (AMM) afin de faciliter le transfert vers la clinique, posséder des propriétés immunomodulatrices similaires à celles du BCG et des caractéristiques physicochimiques permettant son encapsulation dans le gel sans altérer ses propriétés rhéologiques décrites dans l'article 1. Ainsi, plusieurs molécules ont été sélectionnées mais seulement OK-432 et le PPD (purified protein derivative) correspondent à ce cahier des charges (Tableau 2).

OK-432 est une préparation inactivée et lyophilisée d'une souche de *Streptococcus pyogenes* (groupe A) à faible virulence, approuvée au Japon depuis 1975 pour le traitement du cancer. En effet, cette molécule a été validée pour le traitement du lymphangiome chez les adolescents (Rebuffini et al. 2012). Plus récemment, une étude préclinique a montré l'intérêt du traitement combiné MWA et OK-432 sur un modèle de tumeur du sein (L. Li et al. 2017). Le PPD, un dérivé protéique purifié du BCG, pourrait aussi remplacer le BCG dans la formulation immunomodulatrice. En effet le PPD est utilisé en routine pour vérifier l'efficacité de la vaccination au BCG chez le patient (Böhle, Jocham, et Bock 2003).

D'autres molécules de la famille des mycobactéries tuées comme, IMM 101 issu de *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium vaccae* ou encore *Mycobacterium manresensis* ont été proposées mais à cause de leur désignation orpheline, nous avons décidé de ne pas les étudier. Des analogues de synthèse ont été sélectionnés comme candidats potentiels pour remplacer le BCG, cependant leur caractère lipophile ne permet pas une incorporation dans

l'hydrogel sélectionné dans l'article 1 sans changer ses propriétés physicochimiques. Le Tableau 2 Agonistes potentiels du BCG résume les caractéristiques principales des agonistes potentiels du BCG

Agonistes	AMM	Mécanisme action/ propriétés	Essai clinique dans le Cancer
IMM 101 (Mycobacterium obuense)	Désignation orpheline	Activation TLR2/4	Phase II CCR
Mycobacterium vaccae	Désignation orpheline	Activation TLR2/4	
Mycobacterium manresensis	Pas d'AMM	Activation TLR2/4	
OK-432	ATU en France AMM au Japon	Activation TLR4	Cancer Pancréas
MPLA (monophosphoryl lipid A)	Approuvé FDA	Activation TLR4	
G100 (glucoprinosyl lipid A)	Pas d'AMM	Activation de LTR4	Phase I/II Lymphome folliculaire
Imiquimod	AMM	Activation TLR7/8 Caractère lipophile	Phase I/II CCR
Mifamurtide (mycobacterium mycotuberculosis)	AMM	Activation des NLR	
PPD	AMM	Protéines dérivées du BCG	

Tableau 2 Agonistes potentiels du BCG

1.2 Stimulation de la réponse immune par le PPD

1.2.1 Analyse de la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T après stimulation au PPD

Des souris Balb/c (6-8 semaines) sont vaccinées par injection sous cutanée de 5×10^6 CFU de BCG (Sanofi Pasteur). Après 3 semaines de vaccination, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les rates sont prélevées et dissociées. Après lyse des globules rouges, les cellules viables sont comptées au bleu trypan 0.04% etensemencées dans des plaques 6 puits à la concentration de 10^6 cellules/puits avec un ajout de PPD (1 et 5 $\mu\text{g/ml}$, Sanofi Pasteur) et de Brefeldin A (10 $\mu\text{g/ml}$). Les plaques sont ensuite incubées 24h à 37°C/ 5 % CO₂.

Après 24h, les cellules sont récupérées et l'analyse de la synthèse de l'IFN- γ par les lymphocytes est réalisée selon la méthode décrite dans l'article 2. Les résultats (Figure 22) n'ont montré aucune différence de synthèse de l'IFN- γ entre les lymphocytes T non stimulés et les cellules T stimulées par le PPD (1 et 5 μ g).

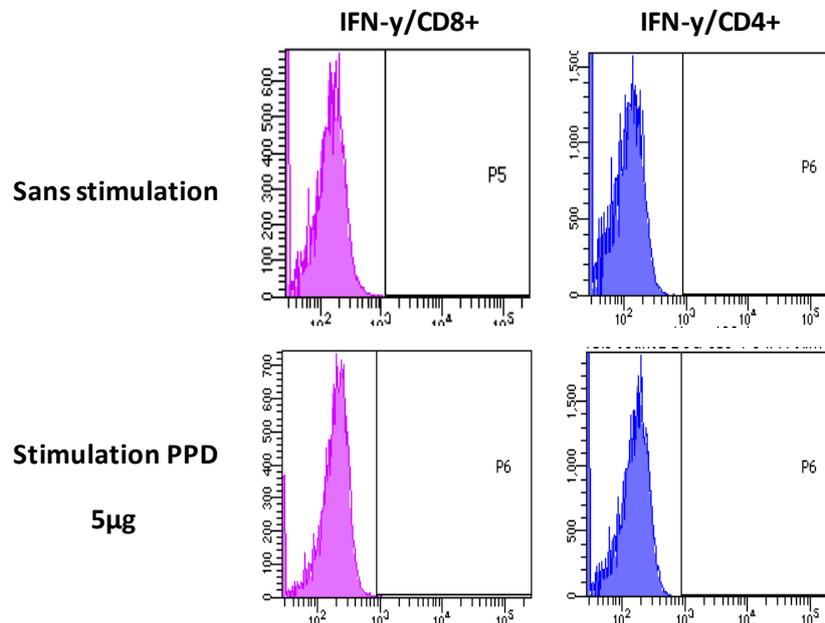


Figure 22 Synthèse de l'IFN- γ par les lymphocytes T de souris vaccinées au BCG après stimulation *in vitro* au PPD. (n=2).

Une deuxième expérience a été réalisée suivant le protocole décrit précédemment. Le taux de sécrétion de l'IFN- γ dans le milieu a été dosé par un Kit ELISA selon le protocole décrit par le fournisseur (Mouse IFN-gamma Quantikine ELISA Kit, *rndsystems, US*). Les résultats obtenus n'ont pas montré de différence de taux d'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T qu'ils soient stimulés ou non par le PPD (Figure 23).

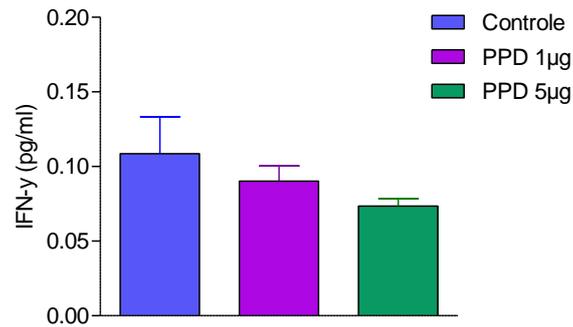


Figure 23 Dosage de l' IFN- γ secrété par les lymphocytes T par méthode ELISA après stimulation au PPD (n=2). Mean \pm SD.

1.2.2 Evaluation de l'efficacité *in vivo* de l'association RFA et Gel-GM-CSF-PPD

Afin d'évaluer l'effet de l'association *in vivo* de la RFA et de l'hydrogel contenant le GM-CSF et le PPD, nous avons traité des souris Balb/c porteuses de tumeurs CT26 par la RFA suivi d'une injection intratumorale de Gel-GM-CSF-PPD. Des tumeurs secondaires ont ensuite été implantées à distance de la tumeur primaire. La croissance tumorale a été évaluée par imagerie de bioluminescence selon le protocole décrit dans l'article 2. Les résultats obtenus ont montré une régression des tumeurs chez 50% des souris traitées par la combinaison RFA + Gel-GM-CSF-PPD, contrairement à la combinaison RFA+ Gel-GM-CSF-BCG qui induit une régression complète des tumeurs chez tous les animaux traités (Figure 24).

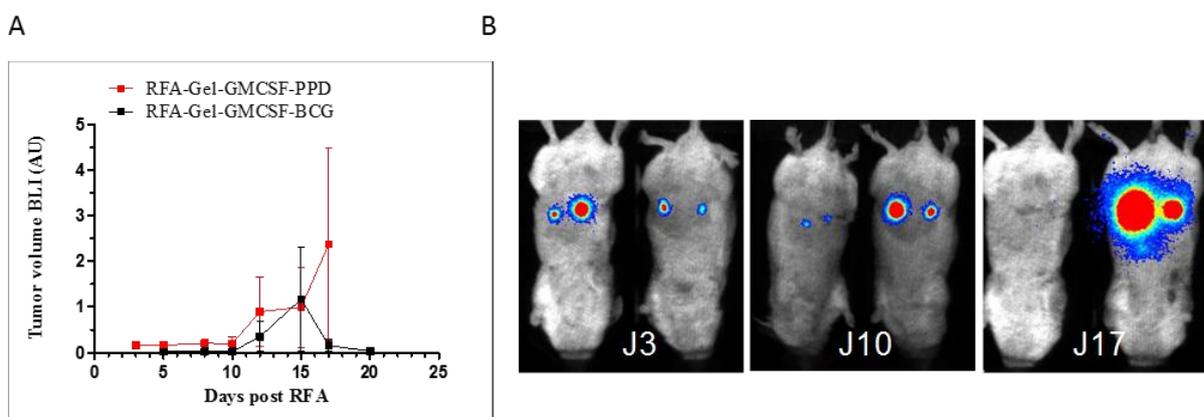


Figure 24 Suivi de croissance des tumeurs secondaires par imagerie de Bioluminescence. (A) croissance des tumeurs secondaires après traitement par RFA + Gel-GM-CSF-BCG (courbe noire) et RFA + Gel-GM-CSF-PPD (courbe rouge) (n=4, Mean \pm SD). (B) Exemple de souris répondeuse au traitement RFA + Gel-GM-CSF-PPD (à gauche) et d'une souris non répondeuse (à droite).

2. Méthode d'analyse de l'infiltrat lymphocytaire

Nous avons travaillé dans le cadre d'une collaboration sur la validation d'une nouvelle méthode de quantification de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs colorectales qui permettrait une meilleure évaluation de celui-ci en fonction de la réponse à l'immunothérapie.

2.1 Etat de l'art

L'infiltrat lymphocytaire (TILs) est une valeur pronostic dans le CCR. Dans les premières études, il était évalué uniquement par un pathologiste qui comptait les lymphocytes dans une zone limitée de la tumeur au microscope. Cette méthode était sujette aux erreurs et la reproductibilité des résultats était très faible. Plus récemment, une équipe a développé une méthode de quantification des TILs grâce à des tissus microarrays (TMA) (J. Galon 2006). Cette méthode permet d'évaluer de manière plus fiable que la classification TNM le pronostic des malades (Jérôme Galon et al. 2014). Les approches utilisant les TMA sont peu coûteuses et pertinentes mais la zone analysée est limitée à la taille de cette dernière. De plus, la distribution des lymphocytes dans la zone tumorale est hétérogène et le comptage des TILs uniquement dans des zones limitées de la tumeur biaise forcément les résultats.

Afin de s'affranchir de ces limites, notre équipe a développé une méthode semi-standardisée pour la quantification linéaire de l'infiltrat lymphocytaire (LQLI) basée sur l'analyse de grandes zones tissulaires incluant le tissu tumoral, le front tumoral et la région adjacente (Allard et al. 2012). Les profils de TILs obtenus ont été corrélés à la survie des patients atteints de CCR. Cette méthode a été validée dans le cadre d'une étude prospective sur 1220 patients atteints de CCR de stade III traités par chimiothérapie adjuvante (Emile et al. 2017).

2.2 La méthode la LQLI et ses limites

L'analyse des TILs avec la méthode LQLI est implémentée par un logiciel nommé Visilog® dont les paramètres sont non modulables. En effet, la détection des lymphocytes est réalisée sur des critères de taille et de couleurs qui varient en fonction du marqueur utilisé. La quantification des lymphocytes d'une région d'intérêt (ROI) de 4 millimètres (1 mmx 4 mm)

est possible par la pose d'un patch non modifiable et qui requiert une délimitation manuelle du front tumoral. Les lymphocytes sont ensuite comptés en fonction de leurs distances du front tumoral supposé droit dans cette méthode. La Figure 25 représente la disposition des patches sur le front tumoral et la courbe de quantification des lymphocytes générée par le logiciel Visilog®. Bien que robuste et reproductible, cet outil est malheureusement peu adapté aux tumeurs millimétriques et dans le cadre d'étude préclinique.

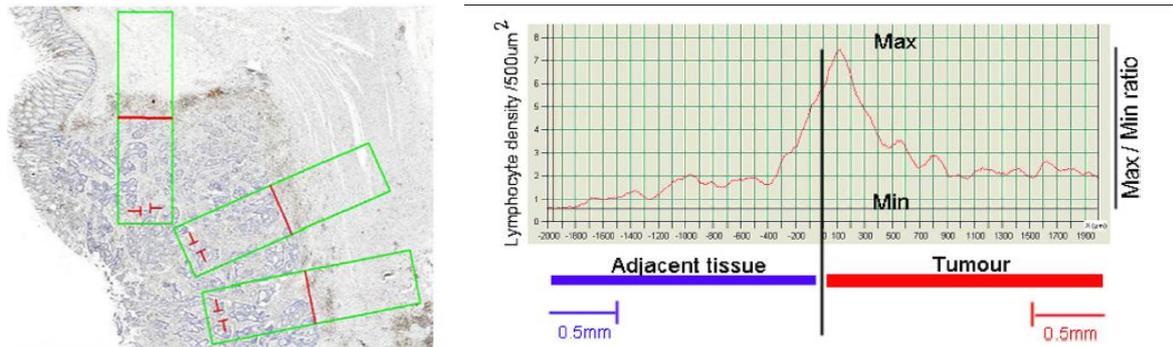


Figure 25 Méthode de la LQLI appliquée sur coupe de tumeurs colorectale chez l'homme (Allard et al. 2012).

2.3 Nouvelle méthodologie pour la quantification des lymphocytes.

Pour faire face aux limites de Visilog®, nous avons proposé, en collaboration avec l'équipe Systèmes Intelligents de Perception (SIP) du Laboratoire d'Informatique de Paris Descartes, de mettre en place une nouvelle méthodologie pour quantifier l'infiltration lymphocytaire dans une zone tumorale à partir d'images histologiques. Cette méthodologie repose sur cinq différentes étapes (Djiro, Kurtz, et Loménie 2018) (Figure 26). Son objectif est de fournir en sortie une courbe de quantification de l'infiltration lymphocytaire à partir d'une image fournie en entrée.

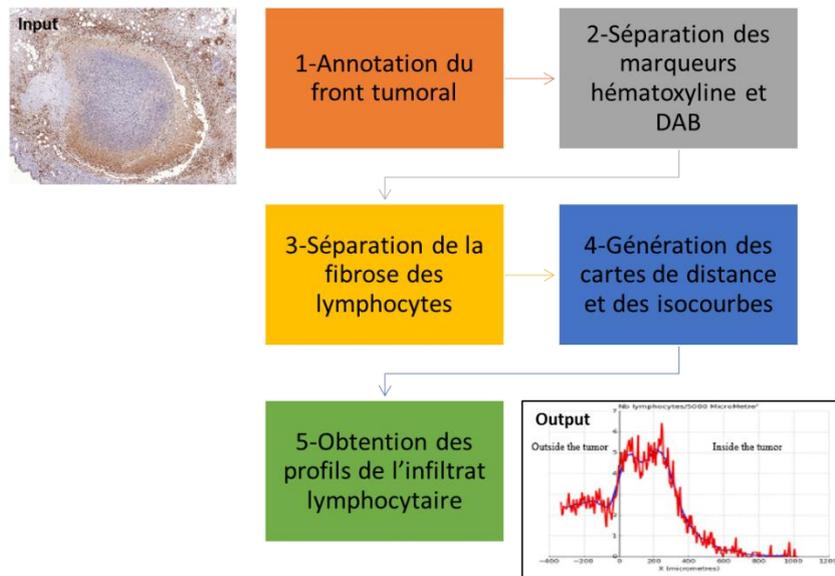


Figure 26 Illustration des différentes étapes de la nouvelle méthodologie proposée pour la quantification de l'infiltrat lymphocytaire.

Les lames d'immunohistochimie scannées sont chargées sur une plateforme web qui permet leur stockage et la réalisation d'annotation du front tumoral et des ROIs par les anatomopathologistes de notre laboratoire (étape 1). Les ROIs sont ensuite récupérés par l'équipe de bio-informaticiens qui réalise le traitement de l'image. Il s'en suit une séparation des marqueurs (hématoxyline et Diaminobenzidine) sur la base de la teinte, de la saturation et de la luminosité (étape 2). Un exemple de séparation des marqueurs effectuée par le logiciel est illustrée Figure 27.

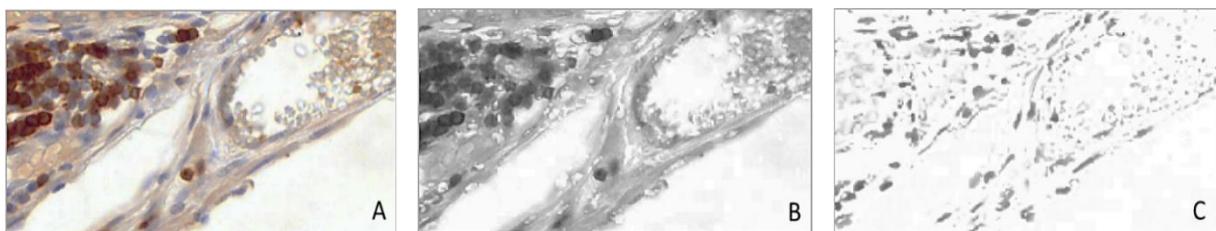


Figure 27 Illustration de la séparation du marqueur Diaminobenzidine (DAB) et Hématoxyline.(A) image originale ; (B) DAB extraite ; (C) Hématoxyline extraite.

Après cette étape de segmentation, les images obtenues en niveau de gris représentent un mélange de lymphocytes et de fibrose. Ainsi une étape supplémentaire de séparation par seuillage dynamique est appliquée afin d'éliminer les zones de fibrose dans la ROI (étape 3, Figure 28).

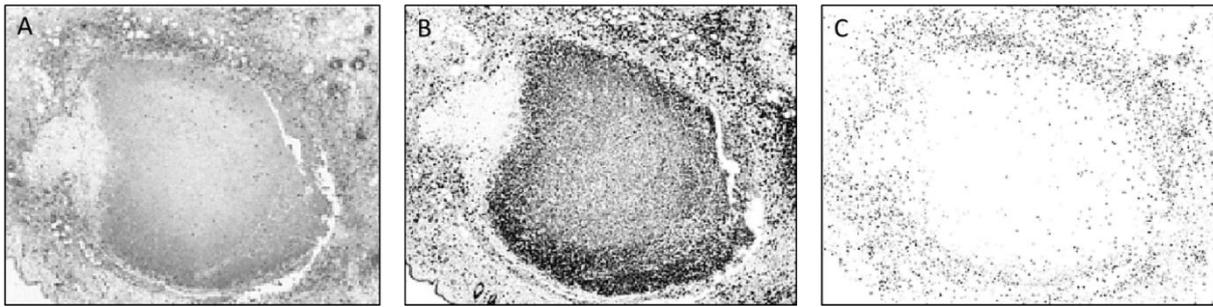


Figure 28 : Elimination du bruit de fond du à la fibrose dans la zone d'intérêt. (A) Transformation de l'image en niveau de gris après segmentation des marqueurs hématoxyline et DAB, (B) image obtenue après binarisation d'Otsu, (C) image obtenue pour la détection des lymphocytes (Djirot.2018).

Enfin, la quantification de l'infiltration lymphocytaire est réalisée dans la zone d'intérêt selon une carte qui permet de déterminer la distance de chaque pixel par rapport à la frontière tumorale préalablement annotée (étape 4). L'idée est de pouvoir quantifier de manière fine l'invasion lymphocytaire en prenant en compte l'éloignement de ceux-ci par rapport au front tumoral et cela, grâce à la réalisation d'iso-courbes à la frontière tumorale d'inter-distance paramétrable. Ainsi, des courbes de quantification de l'infiltrat lymphocytaire seront générées (Figure 29).

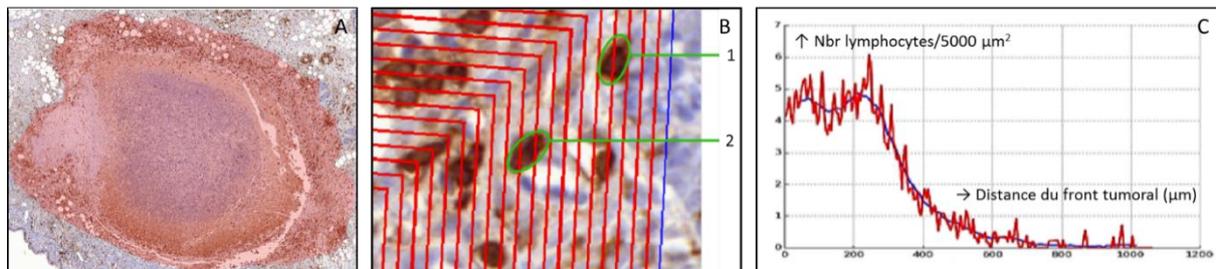


Figure 29 : Obtention de l'infiltration lymphocytaire à partir des Iso-courbes générées. (A) Iso-courbes obtenues (Zone rouge) ; (B) iso-courbes distantes de 5 μm du front tumoral (bleu) vers l'intérieur de la tumeur, (1) première zone 40% et deuxième 60% du lymphocytes (de l'extérieur vers le centre de la tumeur), (2) première zone 20 %, deuxième 60% du lymphocytes et troisième 20%. Le lymphocyte sera compté dans la zone ou le pourcentage est le plus grand. (C). Courbe résultante de la quantification des lymphocytes.

2.4 Validation de la méthode mise en place

La méthode mise en place a été validée sur des échantillons de patients. En effet, les profils d'infiltration lymphocytaire obtenus avec le logiciel Visilog® ont été comparés à la nouvelle

méthode mise en place. Pour cela, il était nécessaire de comparer les 2 techniques en utilisant les mêmes zones de calculs. C'est pourquoi, l'analyse a été réalisée sur des ROI placées aux mêmes endroits avec les deux méthodes et les résultats issus de celles-ci ont été contrôlés (Figure 30). Après comparaison des profils obtenus, plus de lymphocytes sont détectés au niveau du front tumoral avec la nouvelle méthode. Cependant, les analyses issues du logiciel Visilog® sont classées en 4 profils, notre méthode permet le classement correct de ceux-ci. Ainsi, nous pouvons valider cette nouvelle méthode pour l'analyse des échantillons de tumeurs colorectales humaines et murines.

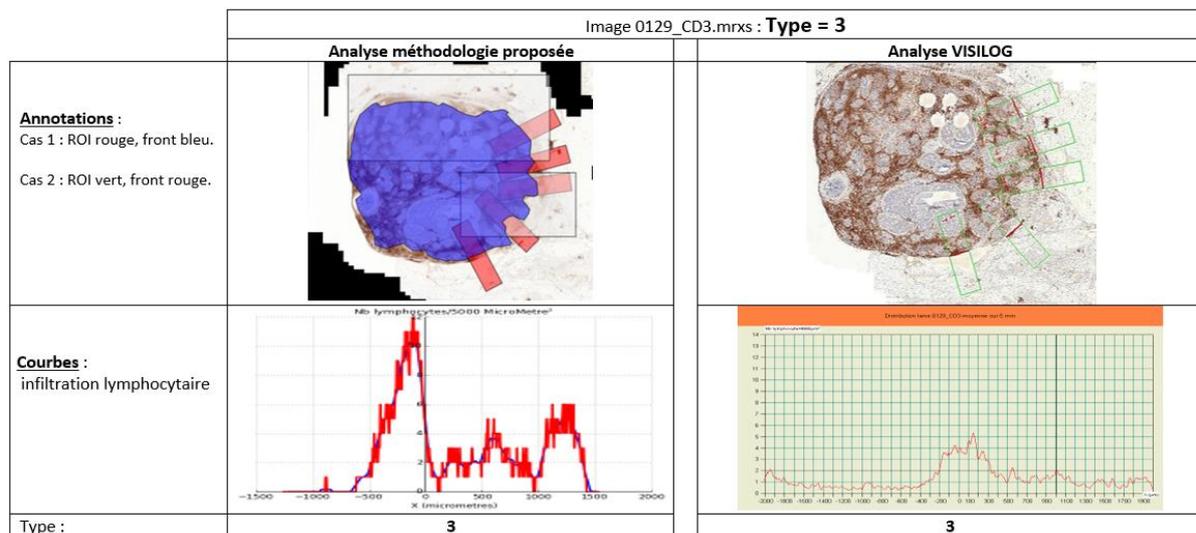


Figure 30 : Comparaison des profils d'infiltration lymphocytaire obtenus avec Visilog (à droite) et la nouvelle méthodologie mise en place (à gauche).

3. Application à un modèle tumoral plus pertinent

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la croissance des tumeurs et la réponse au traitement (Spano et Zollo 2012). En effet, le microenvironnement contient, en plus des cellules tumorales, plusieurs types de cellules formant le stroma, en particulier les cellules immunitaires. Ainsi, les Treg, les MDSCs et les macrophages du stroma peuvent sécréter des facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF- β et l'IL-10 qui favorisent la croissance tumorale et inhibent la réponse immunitaire antitumorale (Shevach 2011).

Une des principales approches pour étudier l'immunologie tumorale et l'immunothérapie utilise les greffes de cellules tumorales murines *in vivo*. En effet, les lignées tumorales sont dérivées de tumeurs de souris immunocompétentes et sont caractérisées par une croissance rapide après injection et une relative reproductibilité. Une étude a montré qu'en fonction du site d'implantation de la tumeur le microenvironnement tumoral et la réponse au traitement pouvaient être modifiés (Wilmanns et al. 1992) ; (Pocard et al. 1996) (Heijstek, Kranenburg, et Borel Rinkes 2005). Il a été décrit que la réponse inflammatoire innée déclenchée par l'injection de cellules tumorales dans la souris et la présence de cellules tumorales mortes pourraient avoir un effet de vaccination, affectant la réponse à l'immunothérapie (Day, Merlino, et Van Dyke 2015). Malgré ces limites, les modèles de tumeurs implantés restent des outils précieux pour l'évaluation de l'immunothérapie. Selon le site d'implantation de la tumeur, on distingue plusieurs modèles.

3.1 Les modèles ectopiques

C'est le modèle le plus fréquemment utilisé dans lequel le site d'implantation est différent du site originel de la tumeur. Le plus souvent, l'injection de cellules ou l'implantation de fragments tumoraux est réalisée par voie sous-cutanée. Cette localisation permet d'évaluer la croissance tumorale facilement par mesure externe (McConville et al. 2007).

3.2 Le modèle Orthotopique

Ce modèle est obtenu par injection de cellules ou implantation de fragments tumoraux au site originel de la tumeur. Ces modèles sont invasifs car nécessitent de réaliser une chirurgie sur les animaux mais aussi moins reproductibles. L'évaluation de la croissance des tumeurs nécessite l'accès à des méthodes d'imagerie (Johanne Seguin. 2013). Cependant, les tumeurs prolifèrent dans leur microenvironnement tumoral naturel, ce qui en fait un modèle plus prédictif de la réponse aux traitements (McConville et al. 2007).

3.3 Les modèles de métastases

Ces modèles sont obtenus soit à partir de modèles orthotopiques qui forment des tumeurs primaires et donnent ensuite lieu à des métastases dans les sites d'invasion, soit par injection de cellules tumorales directement dans le site de métastases. Le temps d'obtention est plus rapide et leur manipulation est plus éthique que lors de l'utilisation de modèles orthotopiques (Jung 2014).

Dans l'article 2, nous avons utilisé un modèle de tumeurs implantées par voie sous cutanée pour mimer des métastases primaires et secondaires. Afin de mieux évaluer la réponse à la thérapie par RFA associée à l'immunomodulation locale, nous avons tenté de mettre en place un modèle plus pertinent et représentant au mieux la situation clinique. Ainsi, nous avons caractérisé le microenvironnement immunitaire dans un modèle de métastases hépatiques.

3.4 Mise en place du modèle intrahépatique

3.4.1 Procédure d'injection des cellules dans le foie

Après anesthésie gazeuse par isoflurane, la peau des souris Balb/c est désinfectée et une ouverture de 5 mm sous le xiphoïde est réalisée. Le lobe inférieur gauche du foie est alors placé sur une compresse stérile, et une injection sous capsulaire (5×10^4 CT26-Luc / 30 μ l de PBS) de la suspension cellulaire est effectuée dans la portion paramédiane du lobe gauche. Une fermeture du plan musculaire et de la peau est ensuite réalisée (Figure 31).



Figure 31 : Injection des cellules CT26-Luc dans la capsule hépatique du lobe gauche.

3.4.2 Suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence

Cette méthode permet un suivi longitudinal de la croissance tumorale sans sacrifice des animaux. Les CT26 ont été modifiées génétiquement pour exprimer la luciférase (unpublished data). Cette enzyme oxyde son substrat, la luciférine et passe ainsi d'un état électroniquement stable à un état excité. L'émission d'un photon lui permet de retourner à son état stable. Cette réaction repose sur une réaction enzymatique nécessitant de l'ATP et de l'oxygène et ne permet des mesures quantitatives qu'en présence de cellules vivantes.

Luciférine (substrat) + Luciférase (enzyme) + ATP + O₂ → Oxyluciférine + Photons.

L'acquisition du signal de bioluminescence est réalisée tous les trois jours (cf article 1). L'analyse des résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation exponentielle du signal de bioluminescence dans la zone du foie des souris en fonction du temps (Figure 32A). Les images montrent un signal de bioluminescence diffus dans tout le foie des souris (Figure 32B).

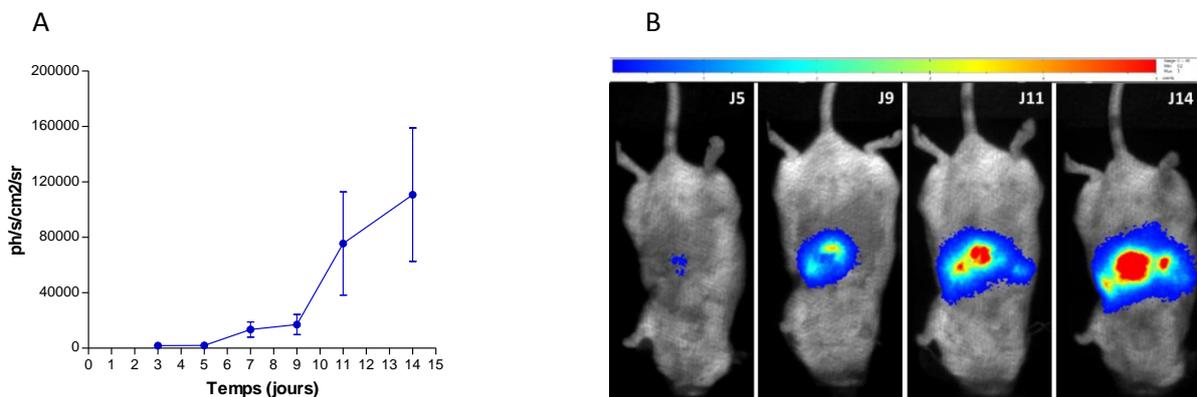


Figure 32 : Suivi de la croissance des tumeurs CT26-Luc dans le foie. (A) Quantification du signal de bioluminescence (n=5) en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en ph/s/sr/cm². (B) Représentation de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence à J5, J9, J11 et J14 après injection des cellules tumorales dans le foie.

3.4.3 Etude histologique des tumeurs dans le modèle intrahépatique

Les foies des souris ont été prélevés 14 jours après injection des cellules tumorales et fixés au PBS-PFA 4 % pendant 24h. Les organes sont ensuite congelés par immersion dans l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Des coupes de 6 µm ont été réalisées au cryostat suivies d'une coloration à l'hématoxyline-éosine. Les foies prélevés présentent une tumeur localisée et

délimitée à un lobe hépatique (Figure 33A). Les coupes au cryostat ont confirmé cette observation (Figure 33B). Ainsi, les tumeurs sont délimitées et localisées sans envahissement de la structure du tissu hépatique (Figure 33C). La tumeur est constituée de cellules fusiformes et de cellules épithéliales de type glandulaire (Figure 33D).

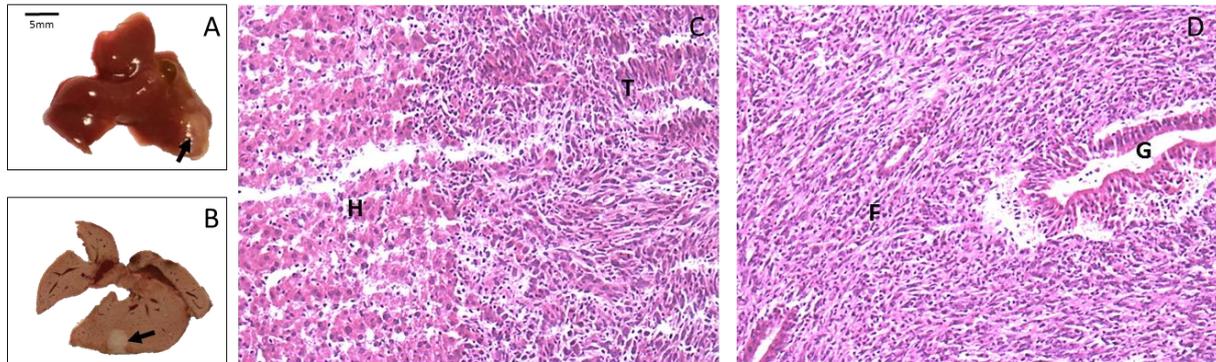


Figure 33 : Marquages histologiques des foies implantés avec des cellules CT26-Luc. (A-B) Aspect macroscopique de la tumeur après prélèvement et congélation des organes. (C) Coupe histologiques montrant les cellules hépatiques (H) et les cellules tumorales (T). (D) Aspect de la tumeur formée de cellules fusiformes (F) et de cellules glandulaires (G).

3.5 Etude de microenvironnement immunitaire dans le modèle intrahépatique.

Nous avons évalué le microenvironnement immunitaire dans le modèle intrahépatique (IH) en comparaison avec les modèles de tumeurs sous-cutanées (SC) et orthotopiques (Seguin et al. 2013). Les tumeurs sont prélevées, dissociées et des marquages des cellules immunitaires ; des lymphocytes T effecteurs (CD4⁺) et T cytotoxiques (CD8⁺), des cellules dendritiques (CD11C⁺, CD80⁺, CD86⁺), des macrophages (F4/80) et des cellules myéloïdes suppressives (Ly6-G/Gr1 CD11b) sont réalisés (cf article .2).

Figure 34, nous pouvons observer une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ dans le modèle SC ($53,67 \pm 1,67$) comparé au modèle IH ($23,06 \pm 1,86$) et au modèle Orthotopique ($23,35 \pm 5,01$). Le pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ est comparable pour les trois modèles (approximativement 15%). Le pourcentage de MDSC est augmenté d'un facteur 2 dans le modèle orthotopique ($63,75 \pm 4,55$) comparé au modèle SC ($33,4 \pm 5,1$) et au modèle IH ($31,9 \pm 4,22$). La proportion de DC et de macrophages ne semble pas être modifiée en fonction du site d'implantation.

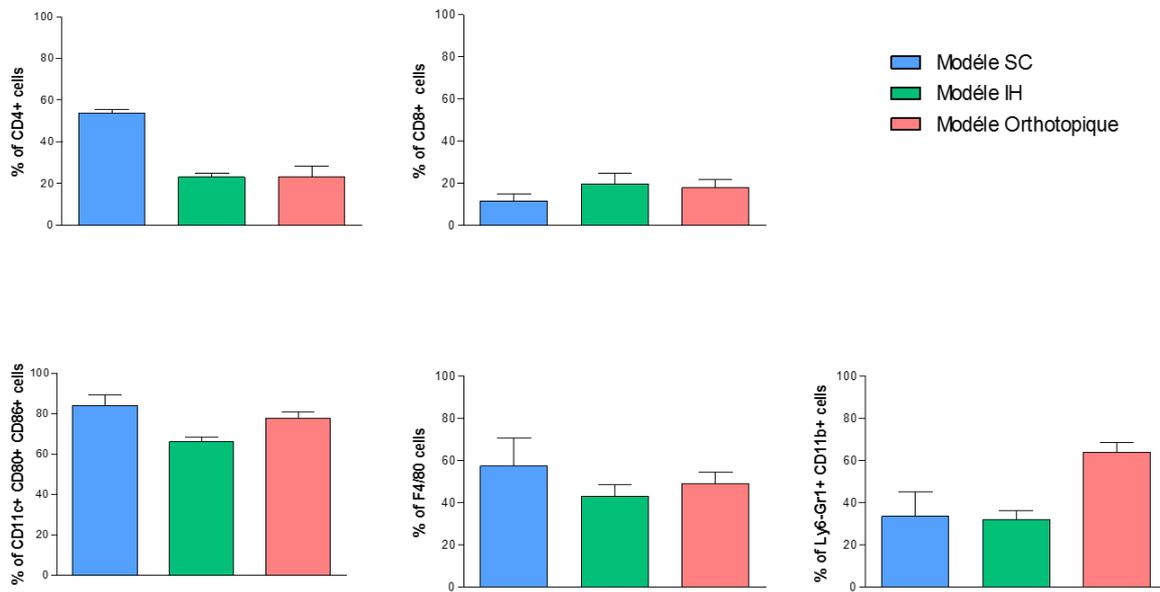


Figure 34 Analyse des populations immunitaires dans des modèles de tumeurs colorectales CT26-Luc. Modèle SC (bleu), modèle intrahépatique (vert) ; modèle orthotopique (rouge). n=5 mean \pm SD

4. Discussion et perspectives

4.1 Agoniste du BCG

Nous avons remplacé le BCG par le PPD dans la formulation de gel immunomodulateur. Les résultats obtenus ont montré une efficacité inférieure à celle du BCG. Une étude a montré que les souris répondaient moins à la stimulation par le PPD que par d'autres antigènes de mycobactéries (Garcia-Pelayo et al. 2015). Il serait ainsi nécessaire de tester d'autres types d'antigènes qui pourraient avoir un effet équivalent à celui du BCG proposé dans notre stratégie. Par ailleurs, la formulation de gel pourrait être modifiée afin d'encapsuler un dérivé lipophile du BCG.

4.2 Méthode d'analyse de l'infiltrat lymphocytaire

Comme décrit dans l'article 2, nous avons observé une augmentation des lymphocytes dans les tumeurs de souris traitées par la combinaison complète RFA + immunomodulation locale, associée à une augmentation de la survie des animaux. Cette quantification a été réalisée sur différentes zones de la tumeur obtenant une densité moyenne du nombre de lymphocytes dans celles-ci. Les tumeurs prélevées ne contenant pas de tissu adjacent, nous avons adapté la méthode d'analyse pour générer des courbes de quantification de l'infiltrat lymphocytaire dans la tumeur par rapport à la distance du front tumoral. Ceci montre l'avantage de cette méthode ouverte qui permet de modifier les paramètres d'analyse et s'adapter à différents types de spécimen.

Actuellement, les deux équipes tentent de résoudre les difficultés rencontrées lors de cette étude. En effet, l'annotation du front tumoral se fait par les anatomopathologistes du laboratoire et malgré des expertises avancées, des variabilités ont été observées dans les annotations réalisées par différentes personnes. Dans le but d'éviter ce biais, nous tentons de rendre automatique l'annotation du front tumoral par le logiciel. De plus, des modifications apportées à cette nouvelle méthode permettraient la reconnaissance automatique des régions d'intérêt et la séparation des lymphocytes segmentés et leur quantification.

4.3 Mise en place du modèle intrahépatique

Le but de ce travail était de mettre en place un modèle intrahépatique afin d'évaluer la combinaison RFA et immunomodulation sur un modèle qui reflète mieux la situation clinique. En effet, le modèle intrahépatique a été mis en place après injection de cellules CT26-Luc en sous-scapulaire dans un lobe localisé du foie pour mimer un modèle de métastases intrahépatiques. L'imagerie de bioluminescence a montré une croissance tumorale exponentielle avec un signal de luminescence diffus dans le foie. De plus, l'étude histologique a montré une tumeur unique délimitée et traitable par RFA. Le besoin de ce modèle est justifié par des taux élevés de récurrence locale après traitement RFA chez des patients ayant plusieurs métastases hépatiques (Tanis et al. 2014).

D'autres part, le microenvironnement immunitaire joue un rôle majeur dans le contrôle de la progression tumorale et la réponse au traitement. Ainsi, il a été montré que les tumeurs du rein implantées dans les sites originels ont moins bien répondu à l'immunothérapie que le même type de tumeurs implantées en SC. La réponse immunitaire dans le modèle orthotopique rénal était de type Th2 liée à une immunosuppression induite par les macrophages. De plus, les tumeurs étaient plus fortement vascularisées que les tumeurs SC (Devaud et al. 2014). C'est pourquoi nous avons souhaité évaluer le microenvironnement immunitaire pour trois modèles de tumeurs SC, IH et orthotopique.

Ainsi, nous avons montré une différence de microenvironnement immunitaire dans les trois modèles tumoraux étudiés, particulièrement dans la proportion de lymphocytes T CD4⁺ et de MDSC infiltrant la tumeur. En effet, les taux de lymphocytes T CD4⁺ et de MDSC dans la tumeur étaient plus élevés dans le modèle SC et modèle orthotopique, respectivement. Les MDSC sont des cellules immunosuppressives capables de supprimer l'activité des lymphocytes T. Chez l'homme, il a été montré une augmentation des MDSC dans les tumeurs de patients atteints de CCR en fonction du stade (B. Zhang et al. 2013). Ainsi, l'augmentation des MDSC infiltrant les tumeurs implantées dans le colon de la souris pourrait être corrélée au microenvironnement de base de la muqueuse colique représentant le microenvironnement originel des tumeurs colorectales. Les lymphocytes T CD4⁺ sont des effecteurs importants dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, il a été montré que la préexistence d'une réponse antitumorale T CD4⁺ pouvait améliorer la réponse à la chimiothérapie et augmenter la survie des patients (Godet et al.

2012). L'augmentation des lymphocytes T CD4⁺ dans le modèle SC pourrait ainsi induire une surestimation des effets de notre approche thérapeutique. Il sera donc nécessaire d'évaluer cette thérapie dans le modèle intrahépatique mimant au mieux la situation clinique.



V. Discussion générales/Perspectives



Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus répandus dans le monde (Ferlay et al. 2015). Ce cancer se place en troisième position derrière ceux de la prostate et du sein et il occupe surtout la seconde place en terme de mortalité, derrière le cancer du poumon. L'incidence de ce cancer est en constante augmentation et l'efficacité des traitements actuels est très limitée. Depuis plusieurs années, des essais cliniques se sont intéressés au développement de traitements pour améliorer la survie des patients atteints de CCR mais leur efficacité reste limitée.

Plus récemment, des essais de phase III d'immunothérapie ont été validés sur des cancers de prostate, de poumon ou sur des mélanomes métastatiques (Callahan et Wolchok 2013). Dans le CCR, l'efficacité de l'immunothérapie est limitée aux cancers de type MSI caractérisés par des taux importants de mutations et une production de néo antigènes activant la réponse immunitaire antitumorale (Thanki et al. 2017). Actuellement, il n'existe pas de stratégie d'immunothérapie validée pour le traitement des CCR MSS.

La RFA est une technique utilisée comme alternative à la chirurgie dans le traitement des métastases hépatiques non résecables. Elle permet la destruction des tumeurs par la chaleur aboutissant à la libération d'antigènes tumoraux et à l'induction de signaux inflammatoires nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire (Hansler et al. 2006a). Ainsi, l'amplification de la réponse spécifique cellulaire T, après thermoablation d'une métastase colorectale a déjà été démontrée, mais cet effet n'est pas corrélé avec une efficacité clinique permettant d'éviter la récurrence. Ainsi, la RFA pourrait être utilisée comme inducteur de la réponse immunitaire (Fagnoni et al. 2008) et combinée avec un traitement immunomodulateur *in situ*.

Immunomodulation locale

Dans ce travail, nous avons démontré que la destruction des tumeurs par RFA associée à l'immunomodulation *in situ* permettait d'activer le système immunitaire et d'induire une réponse dans les tumeurs à distances de la zone traitée. Ces résultats confirment de nombreuses hypothèses suggérant d'utiliser la tumeur comme son propre vaccin (Aurélien Marabelle et al. 2014). Contrairement, à des stratégies de vaccination, la RFA permet de fournir *in situ* tous les antigènes tumoraux identifiés ou non et d'éviter l'induction d'une réponse immunitaire limitée à un seul antigène tumoral. Comme démontré dans le

chapitre 2, l'utilisation d'un hydrogel mucoadhésif permet de prolonger le temps de libération des immunomodulateurs dans la zone traitée, de favoriser le recrutement des DC pour déclencher d'une réponse immunitaire efficace. Les résultats obtenus dans ce travail montrent l'intérêt de combiner un traitement locorégional à la délivrance *in situ* d'immunomodulateurs pour augmenter la réponse immunitaire antitumorale et induire un effet sur les tumeurs à distance de la zone traitée. (Figure 35).

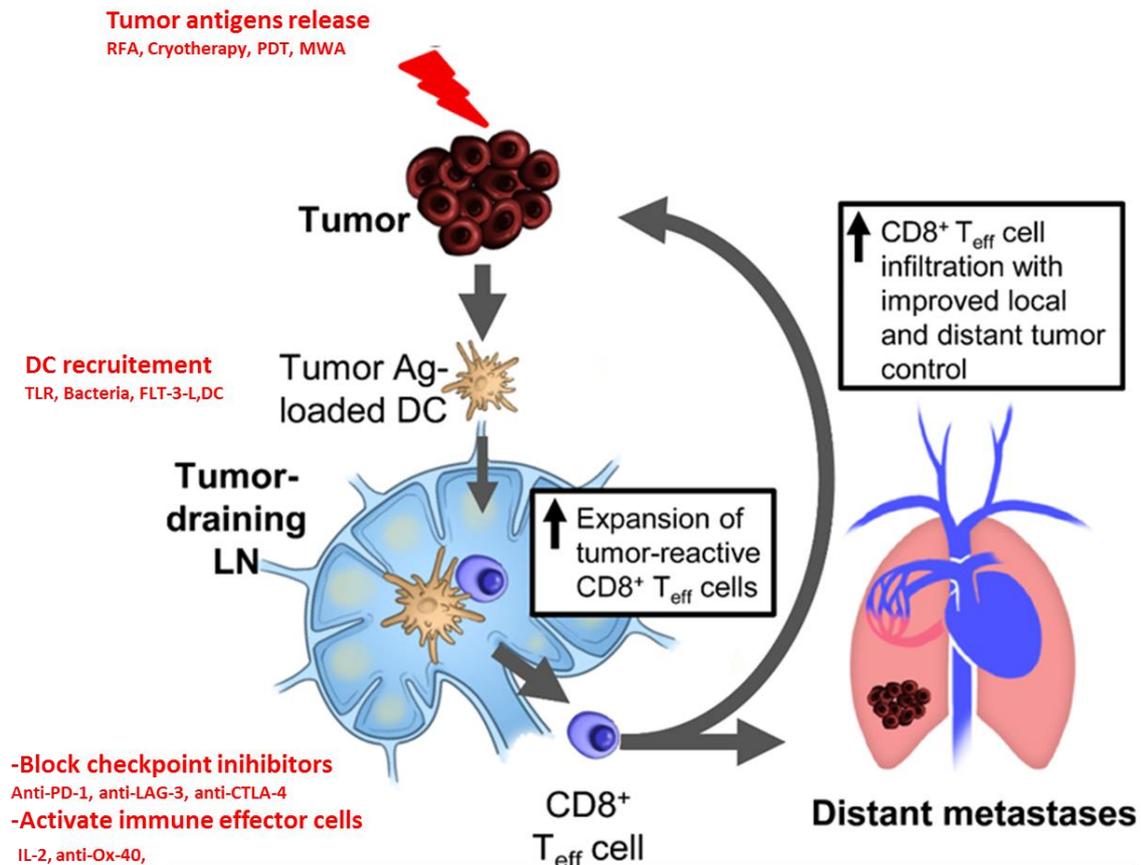


Figure 35 Stratégie d'immunomodulation locale pour augmenter le contrôle des tumeurs locales et à distance. Adapté de (Ito et al. 2015).

De nombreux agents peuvent être utilisés pour l'immunomodulation locale. Un immunomodulateur peut avoir plusieurs effets dans une tumeur. Ainsi, les combinaisons d'immunothérapies intratumorales doivent être définies selon les points critiques nécessaires à l'amorçage d'une réponse cellulaire efficace. La mort des cellules tumorales devrait être générée afin d'obtenir la libération des antigènes. Ceci pourrait être obtenu par des

traitements locorégionaux comme la radiothérapie, la cryoablation, la radiofréquence, la thérapie photodynamique ou par des anticorps monoclonaux ciblant la tumeur. Les tumeurs sans infiltrat immunitaire de base, ou avec un infiltrat très pauvre, comme les tumeurs colorectales, nécessitent le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes responsables de la présentation antigénique. Selon les résultats décrits dans la littérature, des agonistes de TLR, des structures bactériennes, le FLT3-ligand, ou l'injection de DC dans la tumeur peuvent être utilisés. D'après les études publiées ces dernières années, les inhibiteurs de l'immunité checkpoint comme anti-PD-1, anti-LAG-3 ou anti-CTLA-4 semblent essentiels à la restauration de la fonction effectrice des cellules T. En outre, la stimulation des cellules effectrices par des checkpoints activateurs comme anti-Ox-40 ou par des cytokines comme l'IL-2 peut être utile pour obtenir une activité optimale des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Enfin, la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T repose sur leur expression de CMH, sous-exprimé dans 20-60 % des cancers. En conséquence, la perte d'expression du CMH a été liée à la résistance au traitement anti-PD-1.

Traitement locoregional

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, l'ablation par MWA est de plus en plus utilisée en pratique clinique pour traiter des métastases hépatiques. Les avantages théoriques par rapport à la RFA incluent des volumes d'ablation plus importants, une durée de procédure plus courte, une absence de carbonisation et de diffusion électrique, et peu d'effet de dissipation de la chaleur (Lubner et al. 2010). De nombreuses études ont comparé l'efficacité des 2 techniques avec des résultats contrastés en termes de contrôle local, de survie globale et d'effets indésirables. L'ablation par microondes améliorerait de manière significative la survie à 6 ans par rapport à la RFA (Huo et Eslick 2015). Une tendance de meilleurs taux de réponses complètes a été observée chez les patients traités par MWA par rapport à RFA. Dans le cas de lésions plus volumineuses, la différence est statistiquement significative (Facciorusso, Di Maso, et Muscatiello 2016). Cependant, les effets immunitaires induits par MWA sont actuellement en cours d'étude (Ahmad et al. 2010). Il serait ainsi intéressant d'étudier et de caractériser la réponse immunitaire induite par MWA afin de proposer une stratégie d'immunothérapie permettant d'améliorer son efficacité dans le traitement des métastases hépatiques chez l'homme.

Transfert vers la clinique

A l'issu de ce travail, un essai clinique pour évaluer l'efficacité de la stratégie RFA et immunomodulation *in situ* est proposée. En effet, cette stratégie permettrait d'améliorer la survie des patients atteint de cancer colorectal avec métastases hépatiques. Malgré le choix d'immunomodulateurs validés par l'AMM et de polymères approuvés par la FDA, des études complémentaires sont demandées pour garantir la tolérance et l'absence de toxicité de la formulation immunomodulatrice proposée. Ainsi, nous sommes actuellement en train d'étudier la faisabilité de cette stratégie en pratique clinique. Notamment, les méthodes de préparation, de conditionnement et de délivrance de notre hydrogel contenant les immunomodulateurs sont en cours de validation.

VI. References



- Adam, René, Robbert J. de Haas, Dennis A. Wicherts, Eric Vibert, Chadi Salloum, Daniel Azoulay, et Denis Castaing. 2011. « Concomitant Extrahepatic Disease in Patients With Colorectal Liver Metastases: When Is There a Place for Surgery? » *Annals of Surgery* 253 (2): 349-59. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318207bf2c>.
- Ahmad, Fateh, Gianpiero Gravante, Neil Bhardwaj, Andrew Strickland, Rizwan Basit, Kevin West, Roberto Sorge, Ashley R. Dennison, et David M. Lloyd. 2010. « Changes in Interleukin-1 β and 6 after Hepatic Microwave Tissue Ablation Compared with Radiofrequency, Cryotherapy and Surgical Resections ». *The American Journal of Surgery* 200 (4): 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.12.025>.
- Ahmadzadeh, Mojgan, Laura A. Johnson, Bianca Heemskerk, John R. Wunderlich, Mark E. Dudley, Donald E. White, et Steven A. Rosenberg. 2009. « Tumor Antigen-Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired ». *Blood* 114 (8): 1537-44. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>.
- Allard, Marc-Antoine, Jean Baptiste Bachet, Alain Beauchet, Catherine Julie, Robert Malafosse, Christophe Penna, Bernard Nordlinger, et Jean-François Emile. 2012. « Linear Quantification of Lymphoid Infiltration of the Tumor Margin: A Reproducible Method, Developed with Colorectal Cancer Tissues, for Assessing a Highly Variable Prognostic Factor ». *Diagnostic Pathology* 7 (1): 156. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-156>.
- Amiji, Mansoor M., Phung-Kim Lai, Dinesh B. Shenoy, et Mahadev Rao. 2002. « Intratumoral Administration of Paclitaxel in an In Situ Gelling Poloxamer 407 Formulation ». *Pharmaceutical Development and Technology* 7 (2): 195-202. <https://doi.org/10.1081/PDT-120003487>.
- Anderson, Ana C. 2014. « Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape ». *Cancer Immunology Research* 2 (5): 393-98. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0039>.
- Ankathatti Munegowda, Manjunatha, Yulin Deng, Sean J. Mulligan, et Jim Xiang. 2011. « Th17 and Th17-Stimulated CD8+ T Cells Play a Distinct Role in Th17-Induced Preventive and Therapeutic Antitumor Immunity ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (10): 1473-84. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1054-y>.
- Arnold, Melina, Mónica S Sierra, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, et Freddie Bray. 2017. « Global Patterns and Trends in Colorectal Cancer Incidence and Mortality ». *Gut* 66 (4): 683-91. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- Aspeslagh, Sandrine, Sophie Postel-Vinay, Sylvie Rusakiewicz, Jean-Charles Soria, Laurence Zitvogel, et Aurélien Marabelle. 2016. « Rationale for Anti-OX40 Cancer Immunotherapy ». *European Journal of Cancer* 52 (janvier): 50-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.08.021>.
- Atkins, Michael B., Michael T. Lotze, Janice P. Dutcher, Richard I. Fisher, Geoffrey Weiss, Kim Margolin, Jeff Abrams, et al. 1999. « High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993 ». *Journal of Clinical Oncology* 17 (7): 2105-2105. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.7.2105>.
- Bala, Malgorzata M, Robert P Riemsma, Robert Wolff, et Jos Kleijnen. 2013. « Cryotherapy for Liver Metastases ». Édité par Cochrane Hepato-Biliary Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, juin. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009058.pub2>.

- Balchen, Vanessa, et Karen Simon. 2016. « Colorectal Cancer Development and Advances in Screening ». *Clinical Interventions in Aging* Volume 11 (juillet): 967-76. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>.
- Banerjee, Ashish, et Steve Gerondakis. 2007. « Coordinating TLR-Activated Signaling Pathways in Cells of the Immune System ». *Immunology and Cell Biology* 85 (6): 420-24. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100098>.
- Barault, L., C. Charon-Barra, V. Jooste, M. F. de la Vega, L. Martin, P. Roignot, P. Rat, et al. 2008. « Hypermethylator Phenotype in Sporadic Colon Cancer: Study on a Population-Based Series of 582 Cases ». *Cancer Research* 68 (20): 8541-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1171>.
- Bartnik, Aleksandra, Ajit Johnson Nirmal, et Shi-Yu Yang. 2012. « Peptide Vaccine Therapy in Colorectal Cancer ». *Vaccines* 1 (1): 1-16. <https://doi.org/10.3390/vaccines1010001>.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, et P. K. Srivastava. 2000. « Necrotic but Not Apoptotic Cell Death Releases Heat Shock Proteins, Which Deliver a Partial Maturation Signal to Dendritic Cells and Activate the NF-Kappa B Pathway ». *International Immunology* 12 (11): 1539-46.
- Benoist, Stéphane, Antoine Brouquet, Christophe Penna, Catherine Julié, Mostafa El Hajjam, Sophie Chagnon, Emmanuel Mitry, Philippe Rougier, et Bernard Nordlinger. 2006. « Complete Response of Colorectal Liver Metastases After Chemotherapy: Does It Mean Cure? » *Journal of Clinical Oncology* 24 (24): 3939-45. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.8727>.
- Berber, Eren, Robert Pelley, et Allan E. Siperstein. 2005. « Predictors of Survival after Radiofrequency Thermal Ablation of Colorectal Cancer Metastases to the Liver: A Prospective Study ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (7): 1358-64. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.12.039>.
- Bilusic, Marijo, Christopher R. Heery, Philip M. Arlen, Myrna Rauckhorst, David Apelian, Kwong Y. Tsang, Jo A. Tucker, et al. 2014. « Phase I Trial of a Recombinant Yeast-CEA Vaccine (GI-6207) in Adults with Metastatic CEA-Expressing Carcinoma ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63 (3): 225-34. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1505-8>.
- Bismuth, H., R. Adam, F. Lévi, C. Farabos, F. Waechter, D. Castaing, P. Majno, et L. Engerran. 1996. « Resection of Nonresectable Liver Metastases from Colorectal Cancer after Neoadjuvant Chemotherapy ». *Annals of Surgery* 224 (4): 509-20; discussion 520-522.
- Blons, H., J. F. Emile, K. Le Malicot, C. Julié, A. Zaanani, J. Taberner, E. Mini, et al. 2014. « Prognostic Value of KRAS Mutations in Stage III Colon Cancer: Post Hoc Analysis of the PETACC8 Phase III Trial Dataset ». *Annals of Oncology* 25 (12): 2378-85. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu464>.
- Bogdan, Christian. 2001. « Nitric Oxide and the Immune Response ». *Nature Immunology* 2 (10): 907-16. <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>.
- Böhle, A., D. Jocham, et P. R. Bock. 2003. « Intravesical Bacillus Calmette-Guerin versus Mitomycin C for Superficial Bladder Cancer: A Formal Meta-Analysis of Comparative Studies on Recurrence and Toxicity ». *The Journal of Urology* 169 (1): 90-95. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000039680.90768.b3>.
- Boissière-Michot, Florence, Gwendal Lazennec, Hélène Frugier, Marta Jarlier, Lise Roca, Jacqueline Duffour, Emilie Du Paty, et al. 2014. « Characterization of an Adaptive

- Immune Response in Microsatellite-Instable Colorectal Cancer ». *OncolImmunology* 3 (6): e29256. <https://doi.org/10.4161/onci.29256>.
- Boland, C. Richard, et Ajay Goel. 2010. « Microsatellite Instability in Colorectal Cancer ». *Gastroenterology* 138 (6): 2073-2087.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>.
- Boshoff, Chris, et Robin Weiss. 2002. « Aids-Related Malignancies ». *Nature Reviews Cancer* 2 (5): 373-82. <https://doi.org/10.1038/nrc797>.
- Brok, Martijn H. M. G. M. den, Roger P. M. Sutmuller, Robbert van der Voort, Erik J. Bennink, Carl G. Figdor, Theo J. M. Ruers, et Gosse J. Adema. 2004. « *In Situ* Tumor Ablation Creates an Antigen Source for the Generation of Antitumor Immunity ». *Cancer Research* 64 (11): 4024-29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3949>.
- Bulliard, Yannick, Rose Jolicoeur, Jimin Zhang, Glenn Dranoff, Nicholas S Wilson, et Jennifer L Brogdon. 2014. « OX40 Engagement Depletes Intratumoral Tregs via Activating FcγRs, Leading to Antitumor Efficacy ». *Immunology and Cell Biology* 92 (6): 475-80. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.26>.
- Cacheux, W., C. Le Tourneau, B. Baranger, L. Mignot, et P. Mariani. 2011. « Targeted Biotherapy in Metastatic Colorectal Carcinoma: Current Practice ». *Journal of Visceral Surgery* 148 (1): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2010.12.004>.
- Callahan, Margaret K., et Jedd D. Wolchok. 2013. « At the Bedside: CTLA-4- and PD-1-Blocking Antibodies in Cancer Immunotherapy ». *Journal of Leukocyte Biology* 94 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212631>.
- Campoli, M, et S Ferrone. 2008. « HLA Antigen Changes in Malignant Cells: Epigenetic Mechanisms and Biologic Significance ». *Oncogene* 27 (45): 5869-85. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.273>.
- Cascinu, S., M. P. Staccioli, G. Gasparini, P. Giordani, V. Catalano, R. Ghiselli, C. Rossi, et al. 2000. « Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Can Predict Event-Free Survival in Stage II Colon Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (7): 2803-7.
- Chen, Xin-lin, Zhuo-qun Chen, Shui-lian Zhu, Tian-wen Liu, Yi Wen, Yi-sheng Su, Xu-jie Xi, Yue Hu, Lei Lian, et Feng-bin Liu. 2017. « Prognostic Value of Transforming Growth Factor-Beta in Patients with Colorectal Cancer Who Undergo Surgery: A Meta-Analysis ». *BMC Cancer* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3215-7>.
- Chu, Katrina F., et Damian E. Dupuy. 2014. « Thermal Ablation of Tumours: Biological Mechanisms and Advances in Therapy ». *Nature Reviews. Cancer* 14 (3): 199-208. <https://doi.org/10.1038/nrc3672>.
- Chua, Hui Lin, Youri Serov, et Zacharie Brahmi. 2004. « Regulation of FasL Expression in Natural Killer Cells ». *Human Immunology* 65 (4): 317-27. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.01.004>.
- Chua, Terence C., Akshat Saxena, Winston Liauw, Francis Chu, et David L. Morris. 2012. « Hepatectomy and Resection of Concomitant Extrahepatic Disease for Colorectal Liver Metastases – A Systematic Review ». *European Journal of Cancer* 48 (12): 1757-65. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.10.034>.
- Chung, Ki Y., Ira Gore, Lawrence Fong, Alan Venook, Stephen B. Beck, Prudence Dorazio, Peggy J. Criscitiello, et al. 2010. « Phase II Study of the Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody, Tremelimumab, in Patients With

- Refractory Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (21): 3485-90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.3994>.
- Day, Chi-Ping, Glenn Merlino, et Terry Van Dyke. 2015. « Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges ». *Cell* 163 (1): 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>.
- De Sousa E Melo, Felipe, Xin Wang, Marnix Jansen, Evelyn Fessler, Anne Trinh, Laura P M H de Rooij, Joan H de Jong, et al. 2013. « Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions ». *Nature Medicine* 19 (5): 614-18. <https://doi.org/10.1038/nm.3174>.
- Deaton, A. M., et A. Bird. 2011. « CpG Islands and the Regulation of Transcription ». *Genes & Development* 25 (10): 1010-22. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Devaud, Christel, Jennifer A Westwood, Liza B John, Jacqueline K Flynn, Sophie Paquet-Fifield, Connie PM Duong, Carmen SM Yong, et al. 2014. « Tissues in Different Anatomical Sites Can Sculpt and Vary the Tumor Microenvironment to Affect Responses to Therapy ». *Molecular Therapy* 22 (1): 18-27. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.219>.
- DeYoung, M P, et L W Ellisen. 2007. « P63 and P73 in Human Cancer: Defining the Network ». *Oncogene* 26 (36): 5169-83. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210337>.
- Dhabekar, GauriS, RishikeshC Dandekar, et AmaarV Kingaonkar. 2011. « Role of Macrophages in Malignancy ». *Annals of Maxillofacial Surgery* 1 (2): 150. <https://doi.org/10.4103/2231-0746.92782>.
- Di Giacomo, Anna Maria, Maurizio Biagioli, et Michele Maio. 2010. « The Emerging Toxicity Profiles of Anti-CTLA-4 Antibodies Across Clinical Indications ». *Seminars in Oncology* 37 (5): 499-507. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.007>.
- Djiro, T, Camille Kurtz, et Nicolas Loménie. 2018. « Assessment of anti-tumor immune response in colorectal carcinomas from Whole Slide Images ». In . Vol. 10882:1-10. Pova de Varzim (Portugal): Springer.
- Douillard, J. Y., et J. Bennouna. 2005. « Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer: A Confusing Area! ». *Annals of Oncology* 16 (12): 1853-54. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi413>.
- Driessens, Gregory, Lise Nuttin, Alain Gras, Julie Maetens, Stephane Mievis, Marylène Schoore, Thierry Velu, Liliane Tenenbaum, Véronique Prétat, et Catherine Bruyns. 2011. « Development of a Successful Antitumor Therapeutic Model Combining in Vivo Dendritic Cell Vaccination with Tumor Irradiation and Intratumoral GM-CSF Delivery ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (2): 273-81. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0941-y>.
- Dumortier, Gilles, Jean Louis Grossiord, Florence Agnely, et Jean Claude Chaumeil. 2006. « A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics ». *Pharmaceutical Research* 23 (12): 2709-28. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4>.
- Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2002. « Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape ». *Nature Immunology* 3 (11): 991-98. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- Ehrlich, Paul. 1909. « Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung Nederlands ». *Tijdschrift voor Geneeskunde* 5: 273-90.
- Eiró, Noemí, Lucía González, Luis O. González, Alejandro Andicoechea, María Fernández-Díaz, Antonio Altadill, et Francisco J. Vizoso. 2012. « Study of the Expression of Toll-Like

- Receptors in Different Histological Types of Colorectal Polyps and Their Relationship with Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Immunology* 32 (4): 848 54. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9666-3>.
- Eliasova, Petra, Michael Pinkas, Katarina Kolostova, Robert Gurlich, et Vladimir Bobek. 2017. « Circulating tumor cells in different stages of colorectal cancer ». *Folia Histochemica et Cytobiologica* 55 (1): 1 5. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0005>.
- Elstad, Nancy L., et Kirk D. Fowers. 2009. « OncoGel (ReGel/Paclitaxel) — Clinical Applications for a Novel Paclitaxel Delivery System ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (10): 785 94. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.010>.
- Emambux, Sheik, Gaelle Tachon, Audelaure Junca, et David Tougeron. 2018. « Results and Challenges of Immune Checkpoint Inhibitors in Colorectal Cancer ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 18 (5): 561 73. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1445222>.
- Emile, Jean-François, Catherine Julié, Karine Le Malicot, Come Lepage, Josep Tabernero, Enrico Mini, Gunnar Folprecht, et al. 2017. « Prospective Validation of a Lymphocyte Infiltration Prognostic Test in Stage III Colon Cancer Patients Treated with Adjuvant FOLFOX ». *European Journal of Cancer* 82 (septembre): 16 24. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.04.025>.
- Facciorusso, Antonio, Marianna Di Maso, et Nicola Muscatiello. 2016. « Microwave Ablation versus Radiofrequency Ablation for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *International Journal of Hyperthermia* 32 (3): 339 44. <https://doi.org/10.3109/02656736.2015.1127434>.
- Fagnoni, Francesco F., Alessandro Zerbini, Guido Pelosi, et Gabriele Missale. 2008. « Combination of Radiofrequency Ablation and Immunotherapy ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (janvier): 369 81.
- Farkona, Sofia, Eleftherios P. Diamandis, et Ivan M. Blasutig. 2016. « Cancer Immunotherapy: The Beginning of the End of Cancer? ». *BMC Medicine* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>.
- Favoriti, Pasqualino, Gabriele Carbone, Marco Greco, Felice Pirozzi, Raffaele Emmanuele Maria Pirozzi, et Francesco Corcione. 2016. « Worldwide Burden of Colorectal Cancer: A Review ». *Updates in Surgery* 68 (1): 7 11. <https://doi.org/10.1007/s13304-016-0359-y>.
- Ferdinande, L, C Decaestecker, L Verset, A Mathieu, X Moles Lopez, A-M Negulescu, T Van Maerken, I Salmon, C A Cuvelier, et P Demetter. 2012. « Clinicopathological Significance of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Expression in Colorectal Cancer ». *British Journal of Cancer* 106 (1): 141 47. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.513>.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, et Freddie Bray. 2015. « Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012 ». *International Journal of Cancer* 136 (5): E359 86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Fietta, Anna Maria, Monica Morosini, Ileana Passadore, Alessandro Cascina, Paola Draghi, Roberto Dore, Sandro Rossi, Ernesto Pozzi, et Federica Meloni. 2009. « Systemic Inflammatory Response and Downmodulation of Peripheral CD25+Foxp3+ T-Regulatory Cells in Patients Undergoing Radiofrequency Thermal Ablation for Lung Cancer ». *Human Immunology* 70 (7): 477 86. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.03.012>.

- Francisco, Loise M., Victor H. Salinas, Keturah E. Brown, Vijay K. Vanguri, Gordon J. Freeman, Vijay K. Kuchroo, et Arlene H. Sharpe. 2009. « PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3015–29. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>.
- Frank, Steven A. 2007. *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1568/>.
- Fyfe, G, R I Fisher, S A Rosenberg, M Sznol, D R Parkinson, et A C Louie. 1995. « Results of Treatment of 255 Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Who Received High-Dose Recombinant Interleukin-2 Therapy. » *Journal of Clinical Oncology* 13 (3): 688–96. <https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.3.688>.
- Galon, J. 2006. « Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome ». *Science* 313 (5795): 1960–64. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
- Galon, Jérôme, Bernhard Mlecnik, Gabriela Bindea, Helen K Angell, Anne Berger, Christine Lagorce, Alessandro Lugli, et al. 2014. « Towards the Introduction of the 'Immunoscore' in the Classification of Malignant Tumours: Immunoscore Classification of Malignant Tumours ». *The Journal of Pathology* 232 (2): 199–209. <https://doi.org/10.1002/path.4287>.
- Galon, Jérôme, Franck Pagès, Francesco M Marincola, Helen K Angell, Magdalena Thurin, Alessandro Lugli, Inti Zlobec, et al. 2012. « Cancer Classification Using the Immunoscore: A Worldwide Task Force ». *Journal of Translational Medicine* 10 (1): 205. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-205>.
- Gameiro, Sofia R., Jack P. Higgins, Matthew R. Dreher, David L. Woods, Goutham Reddy, Bradford J. Wood, Chandan Guha, et James W. Hodge. 2013. « Combination Therapy with Local Radiofrequency Ablation and Systemic Vaccine Enhances Antitumor Immunity and Mediates Local and Distal Tumor Regression ». Édité par Mauricio Martins Rodrigues. *PLoS ONE* 8 (7): e70417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070417>.
- Garcia-Pelayo, M. Carmen, Véronique S. Bachy, Daryan A. Kaveh, et Philip J. Hogarth. 2015. « BALB/c Mice Display More Enhanced BCG Vaccine Induced Th1 and Th17 Response than C57BL/6 Mice but Have Equivalent Protection ». *Tuberculosis* 95 (1): 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.012>.
- Gasser, Martin, Christiane Gerstlauer, Martin Grimm, Marco Bueter, Tatiana Lebedeva, Jens Lutz, Uwe Maeder, et al. 2007. « Comparative Analysis of Predictive Biomarkers for Therapeutical Strategies in Colorectal Cancer ». *Annals of Surgical Oncology* 14 (4): 1272–84. <https://doi.org/10.1245/s10434-006-9155-0>.
- Ghodadra, Anish, Sumantha Bhatt, Juan C. Camacho, et Hyun S. Kim. 2016. « Abscopal Effects and Yttrium-90 Radioembolization ». *CardioVascular and Interventional Radiology* 39 (7): 1076–80. <https://doi.org/10.1007/s00270-015-1259-0>.
- Gleimer, Michael, et Peter Parham. 2003. « Stress Management: MHC Class I and Class I-like Molecules as Reporters of Cellular Stress ». *Immunity* 19 (4): 469–77.
- Godet, Y., E. Fabre, M. Dosset, M. Lamuraglia, E. Levionnois, P. Ravel, N. Benhamouda, et al. 2012. « Analysis of Spontaneous Tumor-Specific CD4 T-Cell Immunity in Lung Cancer Using Promiscuous HLA-DR Telomerase-Derived Epitopes: Potential Synergistic Effect with Chemotherapy Response ». *Clinical Cancer Research* 18 (10): 2943–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3185>.

- Gonzalez-Pons, Maria, et Marcia Cruz-Correa. 2015. « Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? » *BioMed Research International* 2015: 1 14. <https://doi.org/10.1155/2015/149014>.
- Gou, Hong-Feng, Juan Huang, Hua-Shan Shi, Xin-chuan Chen, et Yong-Sheng Wang. 2014. « Chemo-Immunotherapy with Oxaliplatin and Interleukin-7 Inhibits Colon Cancer Metastasis in Mice ». Édité par Fabrizio Mattei. *PLoS ONE* 9 (1): e85789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085789>.
- Gramont, A. de, A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, et al. 2000. « Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 18 (16): 2938 47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.16.2938>.
- Gray, B. N., C. Walker, L. Andrewartha, S. Freeman, et R. C. Bennett. 1989. « Controlled Clinical Trial of Adjuvant Immunotherapy with BCG and Neuraminidase-Treated Autologous Tumour Cells in Large Bowel Cancer ». *Journal of Surgical Oncology* 40 (1): 34 37.
- Grivennikov, Sergei I., et Michael Karin. 2010. « Dangerous Liaisons: STAT3 and NF-KB Collaboration and Crosstalk in Cancer ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21 (1): 11 19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.005>.
- Grosso, Joseph F., Cristin C. Kelleher, Timothy J. Harris, Charles H. Maris, Edward L. Hipkiss, Angelo De Marzo, Robert Anders, et al. 2007. « LAG-3 Regulates CD8+ T Cell Accumulation and Effector Function in Murine Self- and Tumor-Tolerance Systems ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3383 92. <https://doi.org/10.1172/JCI31184>.
- Grupp, Stephan A., Michael Kalos, David Barrett, Richard Aplenc, David L. Porter, Susan R. Rheingold, David T. Teachey, et al. 2013. « Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia ». *New England Journal of Medicine* 368 (16): 1509 18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>.
- Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Soneson, Laetitia Marisa, et al. 2015. « The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer ». *Nature Medicine* 21 (11): 1350 56. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- Gwak, Ji Hun, Bo-Young Oh, Ryung Ah Lee, Soon Sup Chung, et Kwang Ho Kim. 2011. « Clinical Applications of Radio-Frequency Ablation in Liver Metastasis of Colorectal Cancer ». *Journal of the Korean Society of Coloproctology* 27 (4): 202. <https://doi.org/10.3393/jksc.2011.27.4.202>.
- Haigis, Kevin M, Krystle R Kendall, Yufang Wang, Ann Cheung, Marcia C Haigis, Jonathan N Glickman, Michiko Niwa-Kawakita, et al. 2008. « Differential Effects of Oncogenic K-Ras and N-Ras on Proliferation, Differentiation and Tumor Progression in the Colon ». *Nature Genetics* 40 (5): 600 608. <https://doi.org/10.1038/ng.115>.
- Hamada, Ayumi, Koichiro Yamakado, Atsuhiko Nakatsuka, Junji Uraki, Masataka Kashima, Haruyuki Takaki, Takashi Yamanaka, Yasuhiro Inoue, Masato Kusunoki, et Kan Takeda. 2012. « Radiofrequency Ablation for Colorectal Liver Metastases: Prognostic Factors in Non-Surgical Candidates ». *Japanese Journal of Radiology* 30 (7): 567 74. <https://doi.org/10.1007/s11604-012-0089-0>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646 74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

- Hanna, Jr, Michael G. 2012. « Immunotherapy with Autologous Tumor Cell Vaccines for Treatment of Occult Disease in Early Stage Colon Cancer ». *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8 (8): 1156 60. <https://doi.org/10.4161/hv.20740>.
- Hansler, Johannes, Thaddaus-Till Wisniowski, Detlef Schuppan, Astrid Witte, Thomas Bernatik, Eckhart-Georg Hahn, et Deike Strobel. 2006a. « Activation and Dramatically Increased Cytolytic Activity of Tumor Specific T Lymphocytes after Radio-Frequency Ablation in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Liver Metastases ». *World Journal of Gastroenterology* 12 (23): 3716 21.
- . 2006b. « Activation and Dramatically Increased Cytolytic Activity of Tumor Specific T Lymphocytes after Radio-Frequency Ablation in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Liver Metastases ». *World Journal of Gastroenterology* 12 (23): 3716 21.
- Harris, Jules E., Louise Ryan, Herbert C. Hoover, Robert K. Stuart, Martin M. Oken, Al B. Benson, Edward Mansour, Daniel G. Haller, Judith Manola, et Michael G. Hanna. 2000. « Adjuvant Active Specific Immunotherapy for Stage II and III Colon Cancer With an Autologous Tumor Cell Vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283 ». *Journal of Clinical Oncology* 18 (1): 148 148. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.148>.
- Hazama, Shoichi, Yusuke Nakamura, Hiroko Takenouchi, Nobuaki Suzuki, Ryouichi Tsunedomi, Yuka Inoue, Yoshihiro Tokuhisa, et al. 2014. « A Phase I Study of Combination Vaccine Treatment of Five Therapeutic Epitope-Peptides for Metastatic Colorectal Cancer; Safety, Immunological Response, and Clinical Outcome ». *Journal of Translational Medicine* 12 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-63>.
- Heijstek, M.W., O. Kranenburg, et I.H.M. Borel Rinkes. 2005. « Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases ». *Digestive Surgery* 22 (1 2): 16 25. <https://doi.org/10.1159/000085342>.
- Hendlisz, Alain, Marc Van den Eynde, Marc Peeters, Geert Maleux, Bieke Lambert, Jaarke Vannoote, Katrien De Keukeleire, et al. 2010. « Phase III Trial Comparing Protracted Intravenous Fluorouracil Infusion Alone or With Yttrium-90 Resin Microspheres Radioembolization for Liver-Limited Metastatic Colorectal Cancer Refractory to Standard Chemotherapy ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (23): 3687 94. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.5643>.
- Hiratsuka, Sachie, Akira Watanabe, Hiroyuki Aburatani, et Yoshiro Maru. 2006. « Tumour-Mediated Upregulation of Chemoattractants and Recruitment of Myeloid Cells Predetermines Lung Metastasis ». *Nature Cell Biology* 8 (12): 1369 75. <https://doi.org/10.1038/ncb1507>.
- Hope, Mairi E., Georgina L. Hold, Renate Kain, et Emad M. El-Omar. 2005. « Sporadic Colorectal Cancer – Role of the Commensal Microbiota ». *FEMS Microbiology Letters* 244 (1): 1 7. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.029>.
- Huard, B., P. Gaulard, F. Faure, T. Hercend, et F. Triebel. 1994. « Cellular Expression and Tissue Distribution of the Human LAG-3-Encoded Protein, an MHC Class II Ligand ». *Immunogenetics* 39 (3): 213 17.
- Huo, Ya Ruth, et Guy D. Eslick. 2015. « Microwave Ablation Compared to Radiofrequency Ablation for Hepatic Lesions: A Meta-Analysis. » *Journal of Vascular and Interventional* 26 (8): 1139-1146.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2015.04.004>.

- Hurwitz, Herbert, Louis Fehrenbacher, William Novotny, Thomas Cartwright, John Hainsworth, William Heim, Jordan Berlin, et al. 2004. « Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 350 (23): 2335–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>.
- Ito, Fumito, Amy W. Ku, Mark J. Bucsek, Jason B. Muhitch, Trupti Vardam-Kaur, Minhyung Kim, Daniel T. Fisher, et al. 2015. « Immune Adjuvant Activity of Pre-Resectional Radiofrequency Ablation Protects against Local and Systemic Recurrence in Aggressive Murine Colorectal Cancer ». Édité par Fabrizio Mattei. *PLOS ONE* 10 (11): e0143370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143370>.
- Jeong, Byeongmoon, Sung Wan Kim, et You Han Bae. 2012. « Thermosensitive Sol–Gel Reversible Hydrogels ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (décembre): 154–62. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>.
- Jung, Joohee. 2014. « Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development ». *Toxicological Research* 30 (1): 1–5. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.1.001>.
- Kaneda, Atsushi, et Koichi Yagi. 2011. « Two Groups of DNA Methylation Markers to Classify Colorectal Cancer into Three Epigenotypes ». *Cancer Science* 102 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01712.x>.
- Kang, Chiao-Wen, Avijit Dutta, Li-Yuan Chang, Jayashri Mahalingam, Yung-Chang Lin, Jy-Ming Chiang, Chen-Yu Hsu, et al. 2015. « Apoptosis of Tumor Infiltrating Effector TIM-3+CD8+ T Cells in Colon Cancer ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 15659. <https://doi.org/10.1038/srep15659>.
- Katz, Steven C., Venu Pillarisetty, Zubin M. Bamboat, Jinru Shia, Cyrus Hedvat, Mithat Gonen, William Jarnagin, et al. 2009. « T Cell Infiltrate Predicts Long-Term Survival Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases ». *Annals of Surgical Oncology* 16 (9): 2524–30. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0585-3>.
- Kawakami, Hisato, Aziz Zaanani, et Frank A. Sinicrope. 2015. « Microsatellite Instability Testing and Its Role in the Management of Colorectal Cancer ». *Current Treatment Options in Oncology* 16 (7). <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0348-2>.
- Khatri, Vijay P., Nicholas J. Petrelli, et Jacques Belghiti. 2005. « Extending the Frontiers of Surgical Therapy for Hepatic Colorectal Metastases: Is There a Limit? » *Journal of Clinical Oncology* 23 (33): 8490–99. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.6155>.
- Klebanoff, Christopher A., Luca Gattinoni, Douglas C. Palmer, Pawel Muranski, Yun Ji, Christian S. Hinrichs, Zachary A. Borman, et al. 2011. « Determinants of Successful CD8⁺ T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice ». *Clinical Cancer Research* 17 (16): 5343–52. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0503>.
- Kocarnik, Jonathan M., Stacey Shiovitz, et Amanda I. Phipps. 2015. « Molecular Phenotypes of Colorectal Cancer and Potential Clinical Applications ». *Gastroenterology Report*, septembre, gov046. <https://doi.org/10.1093/gastro/gov046>.
- Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, et Robert D. Schreiber. 2007. « Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State ». *Nature* 450 (7171): 903–7. <https://doi.org/10.1038/nature06309>.
- Koido, Shigeo, Eiichi Hara, Akira Torii, Sadamu Homma, Yoichi Toyama, Hidejiro Kawahara, Masaichi Ogawa, et al. 2005. « Induction of Antigen-Specific CD4- and CD8-Mediated T-Cell Responses by Fusions of Autologous Dendritic Cells and Metastatic Colorectal

- Cancer Cells ». *International Journal of Cancer* 117 (4): 587-95. <https://doi.org/10.1002/ijc.21184>.
- Koido, Shigeo, Sadamu Homma, Masato Okamoto, Yoshihisa Namiki, Kazuki Takakura, Kan Uchiyama, Mikio Kajihara, et al. 2013. « Strategies to Improve the Immunogenicity of Anticancer Vaccines Based on Dendritic Cell/Malignant Cell Fusions ». *Oncoimmunology* 2 (9): e25994. <https://doi.org/10.4161/onci.25994>.
- Krishnan, S., et G. D. Eslick. 2014. « *Streptococcus Bovis* Infection and Colorectal Neoplasia: A Meta-Analysis ». *Colorectal Disease* 16 (9): 672-80. <https://doi.org/10.1111/codi.12662>.
- Kudryavtseva, Anna V., Anastasia V. Lipatova, Andrew R. Zaretsky, Alexey A. Moskalev, Maria S. Fedorova, Anastasiya S. Rasskazova, Galina A. Shibukhova, et al. 2016. « Important Molecular Genetic Markers of Colorectal Cancer ». *Oncotarget* 7 (33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9796>.
- Laghi, Luigi, Paolo Bianchi, Elena Miranda, Emanuela Balladore, Veronica Pacetti, Fabio Grizzi, Paola Allavena, et al. 2009. « CD3+ Cells at the Invasive Margin of Deeply Invading (PT3–T4) Colorectal Cancer and Risk of Post-Surgical Metastasis: A Longitudinal Study ». *The Lancet Oncology* 10 (9): 877-84. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70186-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70186-X).
- Langenberg, Marlies H. G., Maarten W. Nijkamp, Jeanine M. L. Roodhart, Nikol Snoeren, Terence Tang, Yuval Shaked, Richard van Hillegersberg, et al. 2010. « Liver Surgery Induces an Immediate Mobilization of Progenitor Cells in Liver Cancer Patients: A Potential Role for G-CSF ». *Cancer Biology & Therapy* 9 (9): 743-48.
- Lao, Victoria Valinluck, et William M. Grady. 2011. « Epigenetics and Colorectal Cancer ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 8 (12): 686-700. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.
- Le, Dung T., Jennifer N. Uram, Hao Wang, Bjarne R. Bartlett, Holly Kemberling, Aleksandra D. Eyring, Andrew D. Skora, et al. 2015. « PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency ». *New England Journal of Medicine* 372 (26): 2509-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>.
- Lecomte, Thierry, Anne Berger, Franck Zinzindohoué, Stéphanie Micard, Bruno Landi, Hélène Blons, Philippe Beaune, Paul-Henri Cugnenc, et Pierre Laurent-Puig. 2002. « Detection of Free-Circulating Tumor-Associated DNA in Plasma of Colorectal Cancer Patients and Its Association with Prognosis: Plasma DNA in Colorectal Cancer Patients ». *International Journal of Cancer* 100 (5): 542-48. <https://doi.org/10.1002/ijc.10526>.
- Li, Jun, Cheng-Hao Yi, Ye-Ting Hu, Jin-Song Li, Ying Yuan, Su-Zhan Zhang, Shu Zheng, et Ke-Feng Ding. 2016. « TNM Staging of Colorectal Cancer Should Be Reconsidered According to Weighting of the T Stage: Verification Based on a 25-Year Follow-Up ». *Medicine* 95 (6): e2711. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002711>.
- Li, Li, Wei Wang, Hong Pan, Ge Ma, Xinyi Shi, Hui Xie, Xiaoan Liu, Qiang Ding, Wenbin Zhou, et Shui Wang. 2017. « Microwave Ablation Combined with OK-432 Induces Th1-Type Response and Specific Antitumor Immunity in a Murine Model of Breast Cancer ». *Journal of Translational Medicine* 15 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1124-9>.
- Lintoiu-Ursut, B., A. Tulin, et S. Constantinoiu. 2015. « Recurrence after Hepatic Resection in Colorectal Cancer Liver Metastasis -Review Article- ». *Journal of Medicine and Life* 8 Spec Issue: 12-14.

- Liu, Yan, Bao-zhong Shen, Ren-fei Li, Guang Yang, Bao-wei Dong, et Ping Liang. 2003. « [Effect of hepatic artery embolization on the microwave coagulated area] ». *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]* 25 (6): 546 49.
- Liu, Yarong, Liang Xiao, Kye-Il Joo, Biliang Hu, Jinxu Fang, et Pin Wang. 2014. « In Situ Modulation of Dendritic Cells by Injectable Thermosensitive Hydrogels for Cancer Vaccines in Mice ». *Biomacromolecules* 15 (10): 3836 45. <https://doi.org/10.1021/bm501166j>.
- Llosa, Nicolas J., Michael Cruise, Ada Tam, Elizabeth C. Wicks, Elizabeth M. Hechenbleikner, Janis M. Taube, Richard L. Blosser, et al. 2015. « The Vigorous Immune Microenvironment of Microsatellite Instable Colon Cancer Is Balanced by Multiple Counter-Inhibitory Checkpoints ». *Cancer Discovery* 5 (1): 43 51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0863>.
- Lubner, Meghan G., Christopher L. Brace, J. Louis Hinshaw, et Fred T. Lee. 2010. « Microwave Tumor Ablation: Mechanism of Action, Clinical Results, and Devices ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 21 (8): S192 203. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2010.04.007>.
- Lundin, M., S. Nordling, J. Lundin, H. Alfthan, U. H. Stenman, et C. Haglund. 2001. « Tissue Expression of Human Chorionic Gonadotropin Beta Predicts Outcome in Colorectal Cancer: A Comparison with Serum Expression ». *International Journal of Cancer* 95 (1): 18 22.
- Lynch, David, et Adrian Murphy. 2016. « The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer ». *Annals of Translational Medicine* 4 (16): 305 305. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.29>.
- Ma, Weijie, Barbara M. Gilligan, Jianda Yuan, et Tianhong Li. 2016. « Current Status and Perspectives in Translational Biomarker Research for PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade Therapy ». *Journal of Hematology & Oncology* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0277-y>.
- Ma, Yang, Galina V. Shurin, Zhu Peiyuan, et Michael R. Shurin. 2013. « Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment ». *Journal of Cancer* 4 (1): 36 44. <https://doi.org/10.7150/jca.5046>.
- Mackie, Rona M., Robin Reid, et Brian Junor. 2003. « Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery ». *New England Journal of Medicine* 348 (6): 567 68. <https://doi.org/10.1056/NEJM200302063480620>.
- Maghazachi, Azzam A. 2010. « Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells ». In *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology*, édité par Oystein Bruserud, 341:37 58. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2010_20.
- Malafosse, R., C. Penna, A. Sa Cunha, et B. Nordlinger. 2001. « Surgical Management of Hepatic Metastases from Colorectal Malignancies ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 12 (7): 887 94.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, et Frances Balkwill. 2008. « Cancer-Related Inflammation ». *Nature* 454 (7203): 436 44. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- Marabelle, A, L Tselikas, T de Baere, et R Houot. 2017. « Intratumoral Immunotherapy: Using the Tumor as the Remedy ». *Annals of Oncology* 28 (suppl_12): xii33 43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx683>.

- Marabelle, Aurélien, Holbrook Kohrt, Christophe Caux, et Ronald Levy. 2014. « Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7): 1747–56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2116>.
- Markman, Janet L., et Stephen L. Shiao. 2015. « Impact of the Immune System and Immunotherapy in Colorectal Cancer ». *Journal of Gastrointestinal Oncology* 6 (2): 208–23. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2014.077>.
- Marshall, John. 2006. « Clinical Implications of the Mechanism of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors ». *Cancer* 107 (6): 1207–18. <https://doi.org/10.1002/cncr.22133>.
- Marshall, John L., James L. Gulley, Philip M. Arlen, Patricia K. Beetham, Kwong-Yok Tsang, Rebecca Slack, James W. Hodge, et al. 2005. « Phase I Study of Sequential Vaccinations With Fowlpox-CEA(6D)-TRICOM Alone and Sequentially With Vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, With and Without Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, in Patients With Carcinoembryonic Antigen-Expressing Carcinomas ». *Journal of Clinical Oncology* 23 (4): 720–31. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.206>.
- Martin, Robert, David Geller, Joseph Espat, David Kooby, Marty Sellars, Robert Goldstein, David Imagawa, et Charles Scoggins. 2012. « Safety and Efficacy of Trans Arterial Chemoembolization with Drug-Eluting Beads in Hepatocellular Cancer: A Systematic Review ». *Hepato-Gastroenterology* 59 (113): 255–60. <https://doi.org/10.5754/hge10240>.
- Massagué, Joan. 2008. « TGF β in Cancer ». *Cell* 134 (2): 215–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- McCarthy, Edward F. 2006. « The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas ». *The Iowa Orthopaedic Journal* 26: 154–58.
- McConville, Patrick, William L. Elliott, Alicia Kreger, Richard Lister, Jonathan B. Moody, Erin Trachet, Frank Urban, et W. R. Leopold. 2007. « Preclinical Models of Tumor Growth and Response ». In *In Vivo Imaging of Cancer Therapy*, édité par Anthony F. Shields et Pat Price, 13–32. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-341-7_2.
- Medzhitov, Ruslan, Paula Preston-Hurlburt, et Charles A. Janeway. 1997. « A Human Homologue of the Drosophila Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity ». *Nature* 388 (6640): 394–97. <https://doi.org/10.1038/41131>.
- Mehren, M. von, P. Arlen, K. Y. Tsang, A. Rogatko, N. Meropol, H. S. Cooper, M. Davey, S. McLaughlin, J. Schlom, et L. M. Weiner. 2000. « Pilot Study of a Dual Gene Recombinant Avipox Vaccine Containing Both Carcinoembryonic Antigen (CEA) and B7.1 Transgenes in Patients with Recurrent CEA-Expressing Adenocarcinomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6 (6): 2219–28.
- Mojarad, Shirin, Barbara Venturini, Patrizia Fulgenzi, Renata Papaleo, Massimo Brisigotti, Franco Monti, Debora Canuti, et al. 2013. « Prediction of Nodal Metastasis and Prognosis of Breast Cancer by ANN-Based Assessment of Tumour Size and P53, Ki-67 and Steroid Receptor Expression ». *Anticancer Research* 33 (9): 3925–33.
- Moon, Byung-In, Tae Hun Kim, et Ju-Young Seoh. 2015. « Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2 ». Édité par Luis Graca. *PLOS ONE* 10 (11): e0141864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141864>.

- Morse, Michael A., Donna Niedzwiecki, John L. Marshall, Christopher Garrett, David Z. Chang, Mebea Aklilu, Todd S. Crocenzi, et al. 2013. « A Randomized Phase II Study of Immunization With Dendritic Cells Modified With Poxvectors Encoding CEA and MUC1 Compared With the Same Poxvectors Plus GM-CSF for Resected Metastatic Colorectal Cancer »: *Annals of Surgery* 258 (6): 879 86. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318292919e>.
- Mosolits, Szilvia, Bo Nilsson, et Håkan Mellstedt. 2005. « Towards Therapeutic Vaccines for Colorectal Carcinoma: A Review of Clinical Trials ». *Expert Review of Vaccines* 4 (3): 329 50. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.3.329>.
- Mougiakakos, D., R. Jitschin, C. C. Johansson, R. Okita, R. Kiessling, et K. Le Blanc. 2011. « The Impact of Inflammatory Licensing on Heme Oxygenase-1-Mediated Induction of Regulatory T Cells by Human Mesenchymal Stem Cells ». *Blood* 117 (18): 4826 35. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324038>.
- Moulton, Hong M., Paul H. Yoshihara, David H. Mason, Patrick L. Iversen, et Pierre L. Triozzi. 2002. « Active Specific Immunotherapy with a Beta-Human Chorionic Gonadotropin Peptide Vaccine in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Antibody Response Is Associated with Improved Survival ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (7): 2044 51.
- Müller, Mike F., Ashraf E. K. Ibrahim, et Mark J. Arends. 2016. « Molecular Pathological Classification of Colorectal Cancer ». *Virchows Archiv* 469 (2): 125 34. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>.
- Nagtegaal, Iris D., Prue C. Allgood, Stephen W. Duffy, Olive Kearins, E. O. Sullivan, Nancy Tappenden, Matthew Wallis, et Gill Lawrence. 2011. « Prognosis and Pathology of Screen-Detected Carcinomas: How Different Are They? » *Cancer* 117 (7): 1360 68. <https://doi.org/10.1002/cncr.25613>.
- Nair, S. K., S. Hull, D. Coleman, E. Gilboa, H. K. Lyerly, et M. A. Morse. 1999. « Induction of Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Responses in Vitro Using Autologous Dendritic Cells Loaded with CEA Peptide or CEA RNA in Patients with Metastatic Malignancies Expressing CEA ». *International Journal of Cancer* 82 (1): 121 24.
- Nakagawa, Hidetoshi, Eishiro Mizukoshi, Noriho Iida, Takeshi Terashima, Masaaki Kitahara, Yohei Marukawa, Kazuya Kitamura, et al. 2014. « In Vivo Immunological Antitumor Effect of OK-432-Stimulated Dendritic Cell Transfer after Radiofrequency Ablation ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 63 (4): 347 56. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1514-7>.
- Napoletano, Chiara, Federica Taurino, Mauro Biffoni, Adriano De Majo, Giorgio Coscarella, Filippo Bellati, Hassan Rahimi, et al. 2008. « RFA Strongly Modulates the Immune System and Anti-Tumor Immune Responses in Metastatic Liver Patients ». *International Journal of Oncology* 32 (2): 481 90.
- Nordlinger, B., M. Guiguet, J. C. Vaillant, P. Ballardur, K. Boudjema, P. Bachellier, et D. Jaeck. 1996. « Surgical Resection of Colorectal Carcinoma Metastases to the Liver. A Prognostic Scoring System to Improve Case Selection, Based on 1568 Patients. Association Française de Chirurgie ». *Cancer* 77 (7): 1254 62.
- Nordlinger, Bernard, Halfdan Sorbye, Bengt Glimelius, Graeme J Poston, Peter M Schlag, Philippe Rougier, Wolf O Bechstein, et al. 2013. « Perioperative FOLFOX4 Chemotherapy and Surgery versus Surgery Alone for Resectable Liver Metastases

- from Colorectal Cancer (EORTC 40983): Long-Term Results of a Randomised, Controlled, Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 14 (12): 1208 15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70447-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70447-9).
- O'Connell, J. B., M. A. Maggard, et C. Y. Ko. 2004. « Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 96 (19): 1420 25. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh275>.
- Ocvirk, J, et S Cencelj. 2010. « Management of Cutaneous Side-Effects of Cetuximab Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24 (4): 453 59. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03446.x>.
- Pagès, Franck, Anne Berger, Matthieu Camus, Fatima Sanchez-Cabo, Anne Costes, Robert Molitor, Bernhard Mlecnik, et al. 2005. « Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 353 (25): 2654 66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051424>.
- Pan, Xing-Qing. 2012. « The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their use in the clinic ». *Chinese Journal of Cancer*, novembre. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10046>.
- Park, John, Yi-Jen Chen, Wen-Ping Lu, et Yuman Fong. 2014. « The Evolution of Liver-Directed Treatments for Hepatic Colorectal Metastases ». *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 28 (11): 991 1003.
- Parker, Katherine H., Daniel W. Beury, et Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2015. « Myeloid-Derived Suppressor Cells ». In *Advances in Cancer Research*, 128:95 139. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.002>.
- Parmiani, Giorgio, Chiara Castelli, Piero Dalerba, Roberta Mortarini, Licia Rivoltini, Francesco M. Marincola, et Andrea Anichini. 2002. « Cancer Immunotherapy with Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going? ». *Journal of the National Cancer Institute* 94 (11): 805 18.
- Patel, Dinesh G. "Dan", Yu-ya Ohnishi, Yixing Yang, Sang-Hyun Eom, Richard T. Farley, Kenneth R. Graham, Jiangeng Xue, So Hirata, Kirk S. Schanze, et John R. Reynolds. 2011. « Conjugated Polymers for Pure UV Light Emission: Poly(Meta-Phenylenes) ». *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49 (8): 557 65. <https://doi.org/10.1002/polb.22224>.
- Pesce, Silvia, Marco Greppi, Giovanna Tabellini, Fabio Rampinelli, Silvia Parolini, Daniel Olive, Lorenzo Moretta, Alessandro Moretta, et Emanuela Marcenaro. 2017. « Identification of a Subset of Human Natural Killer Cells Expressing High Levels of Programmed Death 1: A Phenotypic and Functional Characterization ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (1): 335-346.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.025>.
- Petty, John K., Ken He, Christopher L. Corless, John T. Vetto, et Andrew D. Weinberg. 2002. « Survival in Human Colorectal Cancer Correlates with Expression of the T-Cell Costimulatory Molecule OX-40 (CD134) ». *American Journal of Surgery* 183 (5): 512 18.
- Pino, Maria S., et Daniel C. Chung. 2010. « The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer ». *Gastroenterology* 138 (6): 2059 72. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.

- Pocard, M., H. Tsukui, R. J. Salmon, B. Dutrillaux, et M. F. Poupon. 1996. « Efficiency of Orthotopic Xenograft Models for Human Colon Cancers ». *In Vivo (Athens, Greece)* 10 (5): 463–69.
- Prendergast, George C., Richard Metz, Alexander J. Muller, Lauren M. F. Merlo, et Laura Mandik-Nayak. 2014. « IDO2 in Immunomodulation and Autoimmune Disease ». *Frontiers in Immunology* 5 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00585>.
- Qiu, Y., et K. Park. 2001. « Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 53 (3): 321–39.
- Rebuffini, Elena, Luca Zuccarino, Emma Grecchi, Francesco Carinci, et Vittorio Emanuele Merulla. 2012. « Picibanil (OK-432) in the Treatment of Head and Neck Lymphangiomas in Children ». *Dental Research Journal* 9 (Suppl 2): S192–196. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.109752>.
- Restifo, Nicholas P., Mark E. Dudley, et Steven A. Rosenberg. 2012. « Adoptive Immunotherapy for Cancer: Harnessing the T Cell Response ». *Nature Reviews Immunology* 12 (4): 269–81. <https://doi.org/10.1038/nri3191>.
- Roepman, Paul, Andreas Schlicker, Josep Taberner, Ian Majewski, Sun Tian, Victor Moreno, Mireille H Snel, et al. 2014. « Colorectal Cancer Intrinsic Subtypes Predict Chemotherapy Benefit, Deficient Mismatch Repair and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Molecular Subtypes in Colorectal Cancer ». *International Journal of Cancer* 134 (3): 552–62. <https://doi.org/10.1002/ijc.28387>.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, et al. 2011. « Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy ». *Clinical Cancer Research* 17 (13): 4550–57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>.
- Ruers, T., C. Punt, F. Van Coevorden, J. P. E. N. Pierie, I. Borel-Rinkes, J. A. Ledermann, G. Poston, et al. 2012. « Radiofrequency Ablation Combined with Systemic Treatment versus Systemic Treatment Alone in Patients with Non-Resectable Colorectal Liver Metastases: A Randomized EORTC Intergroup Phase II Study (EORTC 40004) ». *Annals of Oncology* 23 (10): 2619–26. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds053>.
- Ryan-Harshman, Milly, et Walid Aldoori. 2007. « Diet and Colorectal Cancer: Review of the Evidence ». *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien* 53 (11): 1913–20.
- Sabado, Rachel Lubong, Marcia Meseck, et Nina Bhardwaj. 2016. « Dendritic Cell Vaccines ». In *Vaccine Design*, édité par Sunil Thomas, 1403:763–77. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_44.
- Sabel, Michael S. 2009. « Cryo-Immunology: A Review of the Literature and Proposed Mechanisms for Stimulatory versus Suppressive Immune Responses ». *Cryobiology* 58 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.10.126>.
- Sadanandam, Anguraj, Costas A Lyssiotis, Krisztian Homicsko, Eric A Collisson, William J Gibb, Stephan Wullschleger, Liliane C Gonzalez Ostos, et al. 2013. « A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy ». *Nature Medicine* 19 (5): 619–25. <https://doi.org/10.1038/nm.3175>.
- Saiura, Akio, Junji Yamamoto, Kiyoshi Hasegawa, Rintaro Koga, Yoshihiro Sakamoto, Shojiro Hata, Masatoshi Makuuchi, et Norihiro Kokudo. 2012. « Liver Resection for Multiple Colorectal Liver Metastases with Surgery Up-Front Approach: Bi-Institutional Analysis

- of 736 Consecutive Cases ». *World Journal of Surgery* 36 (9): 2171-78. <https://doi.org/10.1007/s00268-012-1616-y>.
- Saltz, Leonard. 2008. « Colorectal Cancer Treatment: What's Next? (Or: Is There Life After EGFR and VEGF?) ». *Gastrointestinal Cancer Research: GCR* 2 (4 Suppl): S20-22.
- Saridaki, Zacharenia. 2014. « Prognostic and Predictive Significance of MSI in Stages II/III Colon Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (22): 6809. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6809>.
- Schena, Emiliano, Daniele Tosi, Paola Saccomandi, Elfed Lewis, et Taesung Kim. 2016. « Fiber Optic Sensors for Temperature Monitoring during Thermal Treatments: An Overview ». *Sensors* 16 (7): 1144. <https://doi.org/10.3390/s16071144>.
- Schlag, P., M. Manasterski, T. Gerneth, P. Hohenberger, M. Dueck, C. Herfarth, W. Liebrich, et V. Schirrmacher. 1992. « Active Specific Immunotherapy with Newcastle-Disease-Virus-Modified Autologous Tumor Cells Following Resection of Liver Metastases in Colorectal Cancer. First Evaluation of Clinical Response of a Phase II-Trial ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 35 (5): 325-30.
- Schlicker, Andreas, Garry Beran, Christine M Chresta, Gael McWalter, Alison Pritchard, Susie Weston, Sarah Runswick, et al. 2012. « Subtypes of Primary Colorectal Tumors Correlate with Response to Targeted Treatment in Colorectal Cell Lines ». *BMC Medical Genomics* 5 (1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-66>.
- Schmoll, Hans-Joachim, Burghardt Wittig, Dirk Arnold, Jorge Riera-Knorrenschild, Dieter Nitsche, Hendrik Kroening, Frank Mayer, Johannes Andel, Reinhard Ziebermayr, et Werner Scheithauer. 2014. « Maintenance Treatment with the Immunomodulator MGN1703, a Toll-like Receptor 9 (TLR9) Agonist, in Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma and Disease Control after Chemotherapy: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 140 (9): 1615-24. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1682-7>.
- Schraml, Barbara U, et Caetano Reis e Sousa. 2015. « Defining Dendritic Cells ». *Current Opinion in Immunology* 32 (février): 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.11.001>.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et M. J. Smyth. 2011a. « Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». *Science* 331 (6024): 1565-70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- . 2011b. « Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion ». *Science* 331 (6024): 1565-70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
- Schulze, T., W. Kimmner, J. Weitz, K.-D. Wernecke, V. Schirrmacher, et P. M. Schlag. 2009. « Efficiency of Adjuvant Active Specific Immunization with Newcastle Disease Virus Modified Tumor Cells in Colorectal Cancer Patients Following Resection of Liver Metastases: Results of a Prospective Randomized Trial ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0526-1>.
- Sconocchia, Giuseppe, Serenella Eppenberger, Giulio C Spagnoli, Luigi Tornillo, Raoul Drosler, Sara Caratelli, Francesca Ferrelli, et al. 2014. « NK Cells and T Cells Cooperate during the Clinical Course of Colorectal Cancer ». *Oncotarget* 3 (8): e952197. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.952197>.
- Seguin, Johanne, Bich-Thuy Doan, Heldmuth Latorre Ossa, Lauriane Jugé, Jean-Luc Gennisson, Mickaël Tanter, Daniel Scherman, Guy G. Chabot, et Nathalie Mignet. 2013.

- « Evaluation of Nonradiative Clinical Imaging Techniques for the Longitudinal Assessment of Tumour Growth in Murine CT26 Colon Carcinoma ». *International Journal of Molecular Imaging* 2013: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/983534>.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, et R. D. Schreiber. 2001. « IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity ». *Nature* 410 (6832): 1107–11. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- Shevach, Ethan M. 2011. « Biological Functions of Regulatory T Cells ». *Advances in Immunology* 112: 137–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387827-4.00004-8>.
- Shi, L., L. Chen, C. Wu, Y. Zhu, B. Xu, X. Zheng, M. Sun, et al. 2016. « PD-1 Blockade Boosts Radiofrequency Ablation-Elicited Adaptive Immune Responses against Tumor ». *Clinical Cancer Research* 22 (5): 1173–84. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1352>.
- Shimodaira, Shigetaka, Kenji Sano, Koichi Hirabayashi, Terutsugu Koya, Yumiko Higuchi, Yumiko Mizuno, Naoko Yamaoka, et al. 2015. « Dendritic Cell-Based Adjuvant Vaccination Targeting Wilms' Tumor 1 in Patients with Advanced Colorectal Cancer ». *Vaccines* 3 (4): 1004–18. <https://doi.org/10.3390/vaccines3041004>.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, et Ahmedin Jemal. 2017. « Cancer Statistics, 2017 ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (1): 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
- Silva, Priscila de Matos, Julia Bier, Lisiery Negrini Paiatto, Cassia Galdino Albuquerque, Caique Lopes Souza, Luis Gustavo Romani Fernandes, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, et Patricia Ucelli Simioni. 2015. « Tolerogenic Dendritic Cells on Transplantation: Immunotherapy Based on Second Signal Blockage ». *Journal of Immunology Research* 2015: 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/856707>.
- Singh, Ravibhushan, et Dilip Bandyopadhyay. 2007. « MUC1: A Target Molecule for Cancer Therapy ». *Cancer Biology & Therapy* 6 (4): 481–86.
- Sinicrope, Frank A. 2018. « Lynch Syndrome—Associated Colorectal Cancer ». Édité par Caren G. Solomon. *New England Journal of Medicine* 379 (8): 764–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1714533>.
- Smith, Kortnye Maureen, et Jayesh Desai. 2018. « Nivolumab for the Treatment of Colorectal Cancer ». *Expert Review of Anticancer Therapy* 18 (7): 611–18. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1480942>.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et D. I. Godfrey. 2001. « NK Cells and NKT Cells Collaborate in Host Protection from Methylcholanthrene-Induced Fibrosarcoma ». *International Immunology* 13 (4): 459–63.
- Snook, Adam E., Benjamin J. Stafford, Peng Li, Gene Tan, Lan Huang, Ruth Birbe, Stephanie Schulz, et al. 2008. « Guanylyl Cyclase C-Induced Immunotherapeutic Responses Opposing Tumor Metastases Without Autoimmunity ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 100 (13): 950–61. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn178>.
- So, T., J. Song, K. Sugie, A. Altman, et M. Croft. 2006. « Signals from OX40 Regulate Nuclear Factor of Activated T Cells C1 and T Cell Helper 2 Lineage Commitment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3740–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600205103>.
- Solbiati, L., T. Ierace, M. Tonolini, V. Osti, et L. Cova. 2001. « Radiofrequency Thermal Ablation of Hepatic Metastases ». *European Journal of Ultrasound: Official Journal of the*

- European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology* 13 (2): 149 58.
- Spano, Daniela, et Massimo Zollo. 2012. « Tumor Microenvironment: A Main Actor in the Metastasis Process ». *Clinical & Experimental Metastasis* 29 (4): 381 95. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9457-5>.
- Starnes, Charlie O. 1992. « Coley's Toxins in Perspective ». *Nature* 357 (6373): 11 12. <https://doi.org/10.1038/357011a0>.
- Stoltz, A., J. Gagnière, A. Dupré, et M. Rivoire. 2014. « Radiofrequency Ablation for Colorectal Liver Metastases ». *Journal of Visceral Surgery* 151 Suppl 1 (avril): S33-44. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2013.12.005>.
- Stracci, Fabrizio, Manuel Zorzi, et Grazia Grazzini. 2014. « Colorectal Cancer Screening: Tests, Strategies, and Perspectives ». *Frontiers in Public Health* 2 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00210>.
- Street, S. E., E. Cretney, et M. J. Smyth. 2001. « Perforin and Interferon-Gamma Activities Independently Control Tumor Initiation, Growth, and Metastasis ». *Blood* 97 (1): 192 97.
- Takamatsu, Manabu, Akihiro Hirata, Hirofumi Ohtaki, Masato Hoshi, Tatsuya Ando, Hiroyasu Ito, Yuichiro Hatano, et al. 2015. « Inhibition of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Expression Alters Immune Response in Colon Tumor Microenvironment in Mice ». *Cancer Science* 106 (8): 1008 15. <https://doi.org/10.1111/cas.12705>.
- Tanis, E., B. Nordlinger, M. Mauer, H. Sorbye, F. van Coevorden, T. Gruenberger, P.M. Schlag, C.J.A. Punt, J. Ledermann, et T.J.M. Ruers. 2014. « Local Recurrence Rates after Radiofrequency Ablation or Resection of Colorectal Liver Metastases. Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer #40004 and #40983 ». *European Journal of Cancer* 50 (5): 912 19. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.12.008>.
- Terabe, Masaki, et Jay A. Berzofsky. 2007. « NKT Cells in Immunoregulation of Tumor Immunity: A New Immunoregulatory Axis ». *Trends in Immunology* 28 (11): 491 96. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.05.008>.
- Thanki, Ketan, Michael E. Nicholls, Aakash Gajjar, Anthony J. Senagore, Suimin Qiu, Csaba Szabo, Mark R. Hellmich, et Celia Chao. 2017. « Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Clinical Implications ». *International Biological and Biomedical Journal* 3 (3): 105 11.
- Thomas, Susan N., Fei Zhu, Ronald L. Schnaar, Christina S. Alves, et Konstantinos Konstantopoulos. 2008. « Carcinoembryonic Antigen and CD44 Variant Isoforms Cooperate to Mediate Colon Carcinoma Cell Adhesion to E- and L-Selectin in Shear Flow ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (23): 15647 55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800543200>.
- Thompson, Mikayla R., John J. Kaminski, Evelyn A. Kurt-Jones, et Katherine A. Fitzgerald. 2011. « Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection ». *Viruses* 3 (6): 920 40. <https://doi.org/10.3390/v3060920>.
- Tougeron, David, Émilie Fauquembergue, et Jean-Baptiste Latouche. 2013. « Immunotherapy for colorectal cancer ». *Bulletin du Cancer*, n° 9 (septembre): 871–885. <https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1800>.
- Tougeron, David, Emilie Fauquembergue, Alexandre Rouquette, Florence Le Pessot, Richard Sesboué, Michèle Laurent, Pascaline Berthet, et al. 2009. « Tumor-Infiltrating

- Lymphocytes in Colorectal Cancers with Microsatellite Instability Are Correlated with the Number and Spectrum of Frameshift Mutations ». *Modern Pathology* 22 (9): 1186-95. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.80>.
- Tuan, Juan, et Ying-Xuan Chen. 2016. « Dietary and Lifestyle Factors Associated with Colorectal Cancer Risk and Interactions with Microbiota: Fiber, Red or Processed Meat and Alcoholic Drinks ». *Gastrointestinal Tumors* 3 (1): 17-24. <https://doi.org/10.1159/000442831>.
- Umansky, Viktor, Carolin Blattner, Christoffer Gebhardt, et Jochen Utikal. 2016. « The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression ». *Vaccines* 4 (4): 36. <https://doi.org/10.3390/vaccines4040036>.
- Uyldegroot, C, J Vermorken, M Hannajr, P Verboom, M Groot, G Bonsel, C Meijer, et H Pinedo. 2005. « Immunotherapy with Autologous Tumor Cell-BCG Vaccine in Patients with Colon Cancer: A Prospective Study of Medical and Economic Benefits ». *Vaccine* 23 (17-18): 2379-87. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.015>.
- Vacchelli, Erika, Lorenzo Galluzzi, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, Jerome Galon, Catherine Sautès-Fridman, Eric Tartour, Laurence Zitvogel, et Guido Kroemer. 2012. « Trial Watch: FDA-Approved Toll-like Receptor Agonists for Cancer Therapy ». *Oncotarget* 1 (6): 894-907. <https://doi.org/10.4161/onci.20931>.
- Vesely, Matthew D., Michael H. Kershaw, Robert D. Schreiber, et Mark J. Smyth. 2011. « Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer ». *Annual Review of Immunology* 29 (1): 235-71. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>.
- Viljoen, Katie S., Amirtha Dakshinamurthy, Paul Goldberg, et Jonathan M. Blackburn. 2015. « Quantitative Profiling of Colorectal Cancer-Associated Bacteria Reveals Associations between *Fusobacterium* Spp., Enterotoxigenic *Bacteroides Fragilis* (ETBF) and Clinicopathological Features of Colorectal Cancer ». Édité par Andrew McDowell. *PLOS ONE* 10 (3): e0119462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119462>.
- Vincent, J., G. Mignot, F. Chalmin, S. Ladoire, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Martin, L. Apetoh, C. Rebe, et F. Ghiringhelli. 2010. « 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity ». *Cancer Research* 70 (8): 3052-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3690>.
- Vollmer, Jörg, et Arthur M. Krieg. 2009. « Immunotherapeutic Applications of CpG Oligodeoxynucleotide TLR9 Agonists ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (3): 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.008>.
- Wang, David, John Louie, et Daniel Sze. 2013. « Intra-Arterial Therapies for Metastatic Colorectal Cancer ». *Seminars in Interventional Radiology* 30 (01): 012-020. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1333649>.
- Wang, Haidong, Mohsen Naghavi, Christine Allen, Ryan M Barber, Zulfiqar A Bhutta, Austin Carter, Daniel C Casey, et al. 2016. « Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 ». *The Lancet* 388 (10053): 1459-1544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1).
- Ward, Robyn Lynne, Kay Cheong, Su-Lyn Ku, Alan Meagher, Terence O'Connor, et Nicholas John Hawkins. 2003. « Adverse Prognostic Effect of Methylation in Colorectal Cancer Is Reversed by Microsatellite Instability ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal*

- of the American Society of Clinical Oncology* 21 (20): 3729-36. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.03.123>.
- Watanabe, T., M. Tada, H. Nagai, S. Sasaki, et M. Nakao. 1998. « Helicobacter Pylori Infection Induces Gastric Cancer in Mongolian Gerbils ». *Gastroenterology* 115 (3): 642-48.
- Wesley, Johnna, James Whitmore, James Trager, et Nadeem Sheikh. 2012. « An Overview of Sipuleucel-T: Autologous Cellular Immunotherapy for Prostate Cancer ». *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8 (4): 520-27. <https://doi.org/10.4161/hv.18769>.
- Wichtowski, Mateusz, Piotr Nowaczyk, Jacek Kocur, et Dawid Murawa. 2016. « Irreversible electroporation in the treatment of locally advanced pancreas and liver metastases of colorectal carcinoma ». 1: 39-44. <https://doi.org/10.5114/wo.2016.57815>.
- Wilmanns, C., D. Fan, C. A. O'Brian, C. D. Bucana, et I. J. Fidler. 1992. « Orthotopic and Ectopic Organ Environments Differentially Influence the Sensitivity of Murine Colon Carcinoma Cells to Doxorubicin and 5-Fluorouracil ». *International Journal of Cancer* 52 (1): 98-104.
- Xiang, Bo, Adam E. Snook, Michael S. Magee, et Scott A. Waldman. 2013. « Colorectal Cancer Immunotherapy ». *Discovery Medicine* 15 (84): 301-8.
- Yamakado, Koichiro, Yasutaka Inaba, Yozo Sato, Taku Yasumoto, Sadao Hayashi, Takashi Yamanaka, Koji Nobata, Haruyuki Takaki, et Atsuhiko Nakatsuka. 2017. « Radiofrequency Ablation Combined with Hepatic Arterial Chemoembolization Using Degradable Starch Microsphere Mixed with Mitomycin C for the Treatment of Liver Metastasis from Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Study ». *CardioVascular and Interventional Radiology* 40 (4): 560-67. <https://doi.org/10.1007/s00270-016-1547-3>.
- Yamane, Letícia. 2014. « Serrated Pathway in Colorectal Carcinogenesis ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (10): 2634. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2634>.
- Yu, M. W., et C. J. Chen. 1994. « Hepatitis B and C Viruses in the Development of Hepatocellular Carcinoma ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 17 (2): 71-91.
- Yu, Muming, Bin Lu, Yancun Liu, Ying Me, Lijun Wang, et Peng Zhang. 2017. « Tim-3 Is Upregulated in Human Colorectal Carcinoma and Associated with Tumor Progression ». *Molecular Medicine Reports* 15 (2): 689-95. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6065>.
- Zbar, B., et T. Tanaka. 1971. « Immunotherapy of Cancer: Regression of Tumors after Intralesional Injection of Living Mycobacterium Bovis ». *Science (New York, N.Y.)* 172 (3980): 271-73.
- Zeng, Ni, Gilles Dumortier, Marc Maury, Nathalie Mignet, et Vincent Boudy. 2014. « Influence of Additives on a Thermosensitive Hydrogel for Buccal Delivery of Salbutamol: Relation between Micellization, Gelation, Mechanic and Release Properties ». *International Journal of Pharmaceutics* 467 (1-2): 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.055>.
- Zerbini, Alessandro, Massimo Pilli, Amalia Penna, Guido Pelosi, Claudia Schianchi, Atim Molinari, Simona Schivazappa, et al. 2006. « Radiofrequency Thermal Ablation of Hepatocellular Carcinoma Liver Nodules Can Activate and Enhance Tumor-Specific T-Cell Responses ». *Cancer Research* 66 (2): 1139-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2244>.

-
- Zhang, Bin, Zhijun Wang, Liangliang Wu, Meng Zhang, Wei Li, Jianhua Ding, Jun Zhu, Huafeng Wei, et Ke Zhao. 2013. « Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Colorectal Carcinoma ». Édité par Derya Unutmaz. *PLoS ONE* 8 (2): e57114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057114>.
- Zhang, Hao, Zhen-long Ye, Zhen-gang Yuan, Zheng-qiang Luo, Hua-jun Jin, et Qi-jun qian. 2016. « New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells ». *International Journal of Biological Sciences* 12 (6): 718-29. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14405>.
- Zhou, Encheng, Qing Huang, Ji Wang, Chengfeng Fang, Leilei Yang, Min Zhu, Jianhui Chen, Lihua Chen, et Milian Dong. 2015. « Up-Regulation of Tim-3 Is Associated with Poor Prognosis of Patients with Colon Cancer ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (7): 8018-27.



VII. Annexes



Abstract 1 (e-publication)**Developmental Therapeutics—Immunotherapy****The anti-tumour immune response after radiofrequency ablation of colorectal cancer.**

Katia Lemdani, Claude Capron, Johanne Seguin, Nathalie Mignet, Vincent Boudy, Frederique Peschaud, Jean Francois Emile, Robert Malafosse.

DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e14540 Journal of Clinical Oncology - published online before print May 30, 2017

Abstract

Background: Results of radiofrequency ablation (RFA), increasingly used to treat liver tumors, are compromised by local and systemic relapse. Hyperthermia related cancer cells death, release of tumor antigens and expression of danger signals activate a tumor-specific T-cells response. This effect remains ineffective to avoid recurrence. Therefore we propose to combine RFA with an activation of a solid immune antitumor response as curative treatment of a colorectal (CRC) metastatic disease in immunocompetent mouse. **Methods:** RFA was used to treat a CT26-luc tumor. In two distinct clinical situations, distant macroscopic or microscopic tumors were established as metastases before or at the time of RFA. Immune response was modulated by an injection in situ of a thermo-reversible hydrogel loaded by GM-CSF and BCG, targeting dendritic cells. In the group of mice with large far lesions this strategy was combined with immune checkpoint inhibition. The efficiency was assessed on survival, evolution of distant lesions, characterization of lymphocyte infiltration in tumors and systemic immunity through specific TNF- α and IFN- γ expression in spleen and draining lymph nodes. **Results:** The in situ immunogel injection after RFA resulted in a prolonged survival of mice. Regression of distant lesions was related to a strong systemic antitumor immune response and a great improvement of tumor infiltration by specific cytotoxic lymphocytes. In adjuvant situation, the use of immunogel induced a complete cure of microscopic secondary lesions without any treatment. Immune escape of large secondary lesions was reversed by association of RFA-immunogel vaccination with a systemic check point blockade, separately ineffective. **Conclusions:** Validation of this strategy, combining RFA of liver metastases and activation of a strong immune response controlling the residual disease, could result in a clinical assay including this approach within the standard treatment of CRC. Furthermore the powerful synergy between RFA-in situ immunomodulation as a starter treatment and checkpoint blockade ineffective alone in CRC or after single RFA, allows reconsidering the use of immune checkpoint inhibitors in metastatic microsatellite stable CRC.

Abstract 2 (e-publication)**GASTROINTESTINAL (COLORECTAL) CANCER****Therapeutic and cytotoxic responses after radiofrequency ablation combined to in situ immunomodulation and PD1 blockade in colorectal cancer.**

Katia Lemdani, Nathalie Mignet, Johanne Seguin, Vincent Boudy, Jean Francois Emile, Claude Capron, Robert Malafosse

DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e15562 Journal of Clinical Oncology 36, no. 15_suppl - published online before print.

Abstract

Background: After radiofrequency ablation (RFA), cancer cells death releasing tumor antigens and expression of danger signals activate a specific T-cell response however inadequate to avoid recurrence. We purpose to combine RFA with priming of a strong immune antitumor response as curative treatment of colorectal cancer (CRC). **Methods:** After RFA of colorectal liver metastases in patients, the tumour infiltration by lymphocyte (TILs) was characterized on later resected distant lesions. In mice, RFA was used to treat a CT26-luc tumor as primary lesion. Macroscopic or microscopic distant tumors were established as secondary lesions. Injection, in the treated area, of a thermo-reversible hydrogel loaded by GM-CSF and BCG, targeted recruitment and maturation of dendritic cells. In mice with far large lesions, this strategy was combined with PD1 checkpoint inhibition. The efficiency was assessed on survival, morphologic and bioluminescent evolution of distant lesions, characterization of TILs and specific TNF α and IFN- γ expression in spleen and lymph nodes **Results:** Proportion and characteristics of TILs were comparable in 17 patients who had preoperative RFA and in 53 paired patients who had a single hepatectomy for colorectal metastases. After RFA in mice the in situ injection of immunogel resulted in prolonged survival. Regression of distant lesions was related to the induction of a strong immune response and a great increase in TILs. This approach induced a complete cure of microscopic secondary lesions without another treatment. Immune escape of large secondary lesions was reversed by association of the RFA-immunogel with systemic PD1 checkpoint inhibition separately ineffective. **Conclusions:** The lack of an efficient distant immune response in RFA treated patients confirmed relevance of a new strategy. Combined to RFA the in situ priming of a strong immune response targeting microscopic disease is an effective abscopal adjuvant treatment. For distant large lesions the synergy between in situ immunomodulation and PD1 blockade, ineffective in microsatellite stable CRC or after single RFA, allows reconsidering the use of checkpoint inhibitors in CRC.

Communication écrite 1

«Improvement of immune response after radiofrequency ablation in colorectal cancer » .K. LEMDANI, N. Mignet, JF.Emile, R. Malafosse. ASCO-SITC 2018.

LA LIGUE
CONTRE LE CANCER

EDF INNOV'

Improvement of immune response after radiofrequency ablation in colorectal cancer

Hôpital Universitaire
Paris Ile-de-France Ouest
P. LAFITTE, M. LAFITTE, B. LAFITTE, A. LAFITTE

AVOIRD
ASSOCIATION VOLONTAIRE D'ONCOLOGIE RADIATIONNELLE

Katia Lemdani^{1,2}, Nathalie Mignet³, Johanne Seguin³, Edward Oujagir³, Frédéricque Peschaud², Jean-François Emile¹, Claude Capron¹, Robert Malafosse^{1,2}, EA 4340, Ambroise Paré Hospital, and University of Versailles Saint-Quentin en Yvelines, France - 2) Department of Digestive and Oncologic Surgery, Ambroise Paré Hospital, Boulogne, France - 3) U7635, University of Pharmacy Paris Descartes, Paris, France

BACKGROUND

Liver metastases : 50 % in colorectal cancer
Surgery : 20% of cases
RADIOFREQUENCY ABLATION (RFA) :

- non-resectable liver metastases
- Cancer death cells : Immune response
- Insufficient to prevent recurrences.

STUDY DESIGN

- IN ADJUVANT MODEL
RFA and in situ immunomodulation in distant micro-metastasis model of CCR
- IN METASTATIC MODEL
RFA and in situ immunomodulation combined to immune checkpoint-blockade inhibitor in macrometastasis model of CCR.

METHODS

MODEL I (micro-metastasis)
Primary tumor (CT26-Luc) → Secondary tumor (CT26-Luc) → RFA → Ccl-1/CMC5F-8/CC → RFA

MODEL II (macro-metastasis)
Primary & Secondary Tumors (CT26-Luc) → Checkpoint blockade → RFA

RESULTS

Model I (Micro-metastasis)

Mice Survival

Tumor Growth

Systemic Immune response

Tumor lymphocytes infiltration

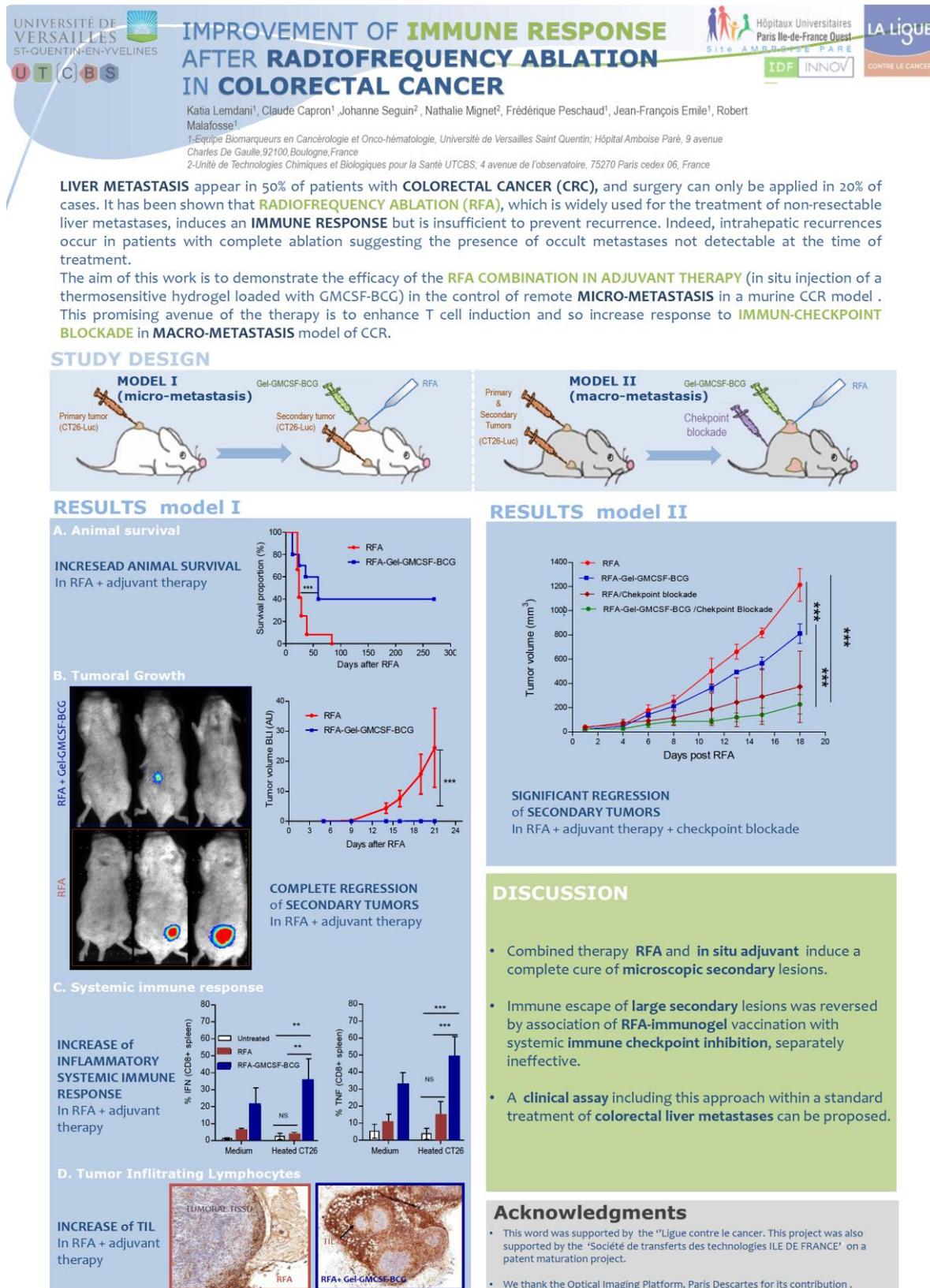
CONCLUSIONS

- Combined therapy: RFA and in situ adjuvant induce a complete cure of microscopic secondary lesions.
- Immune escape of large secondary lesions was reversed by association of RFA, immunogel vaccination with systemic immune checkpoint inhibition, separately ineffective.
- A clinical assay including this approach within a standard treatment of colorectal liver metastases is proposed.

REFERENCES
1) K. Lemdani et al., The effect of immune response after radiofrequency ablation of colorectal cancer, ASCO-SITC 2018
2) K. Lemdani et al., IMMUNOMODULATION AFTER LOCAL TREATMENT OF COLORECTAL LIVER METASTASES

Communication écrite 2

« Radiofrequency ablation immune response enhanced by in situ immunomodulation therapy ». K. LEMDANI, N.Mignet, JF.Emile, R. Malafosse. IRCI 2017.



Communication écrite 3

- « Improvement of immune response after radiofrequency ablation ». K. LEMDANI, J. Seguin, N. Mignet, JF.Emile, R. Malafosse. ARC 2015.
- « Optimisation de la réponse immune après radiofréquence sur des tumeurs colorectales murines ». K. LEMDANI, N. Mignet, JF.Emile, R. Malafosse .Cancéropole IDF 2016.

Optimisation de la réponse immune après radiofréquence de tumeurs colorectales

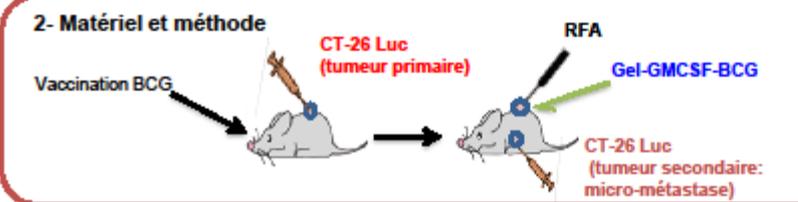
Katia Lemdani¹, Claude Capron¹, Johanne Seguin², Nathalie Mignet², Robert Malafosse¹, Jean-François Emile¹.



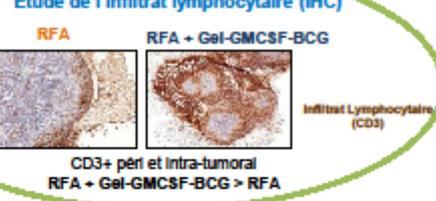
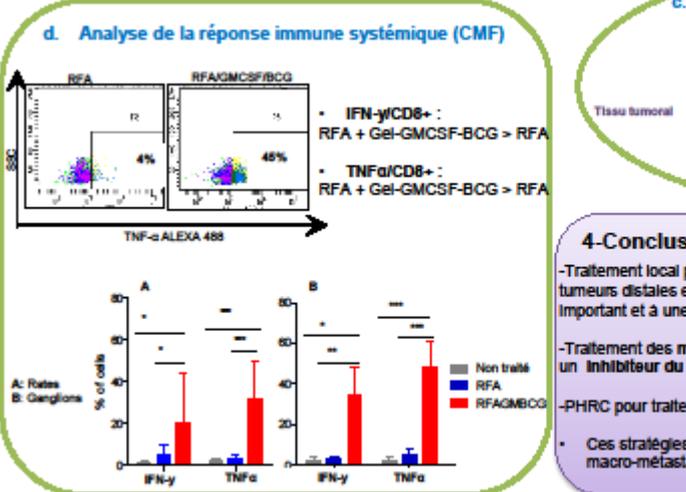
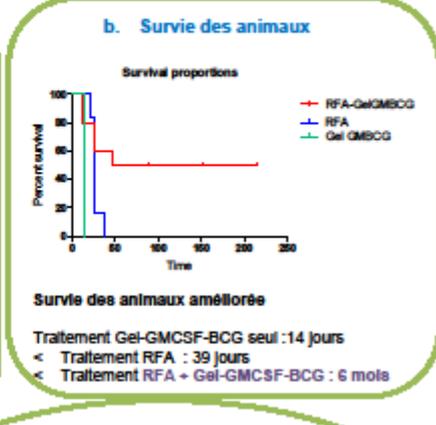
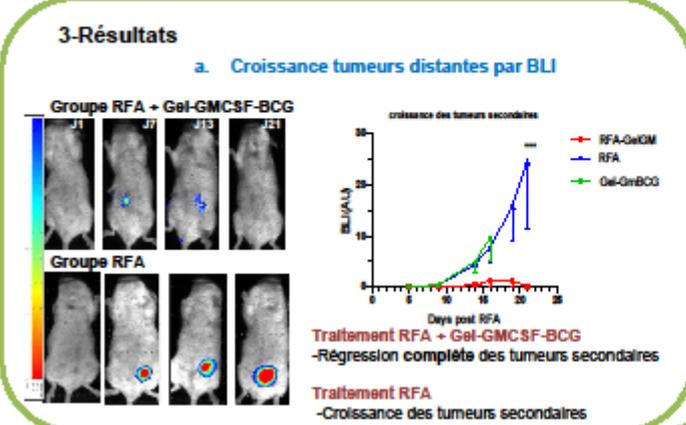
¹-Equipe Biomarqueurs en Cancérologie et Onco-hématologie, 9 avenue Charles De Gaulle, 92100, Boulogne, France
²-Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé UTCBS, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cedex 08, France

1- Introduction
 Les métastases hépatiques apparaissent chez 50% des patients atteints de cancer colorectal (CRC), et la chirurgie ne peut être appliquée que dans 20% des cas. Il a été montré que l'ablation par radiofréquence (RFA), qui est largement utilisée pour le traitement des métastases hépatiques non résecables, induit une réponse immunitaire mais qui est insuffisante pour empêcher la récurrence¹. En effet, des récurrences intrahépatiques apparaissent chez des patients ayant eu une ablation complète ce qui suggère la présence de métastases occultes non détectables au moment du traitement.

Le but du travail est de démontrer l'efficacité de l'association RFA à un traitement adjuvant (injection in situ d'un hydrogel thermosensible chargé en GM-CSF-BCG) dans le contrôle des micro-métastases à distance dans un modèle murin de CCR.



- Critères d'analyse**
- Survie
 - Croissance tumorale
 - Infiltrat lymphocytaire
 - Réponse immune systémique



4-Conclusions et perspectives

- Traitement local par RFA associé à l'hydrogel-GM-CSF-BCG efficace sur les tumeurs distales et la survie des animaux associé à un infiltrat lymphocytaire important et à une activation des lymphocytes T spécifiques.
- Traitement des macro-métastases en associant l'hydrogel + GM-CSF/BCG à un inhibiteur du checkpoint (anti PD1).
- PHRC pour traitement du CCR chez l'homme.
- Ces stratégies combinées pourraient améliorer la réponse immunitaire des macro-métastases diagnostiquées chez le patient au moment du traitement.

1. Hender, J. Activation and dramatically increased cytotoxic activity of tumor specific T lymphocytes after radio-frequency ablation in patients with hepatocellular carcinoma and colorectal liver metastases. World J Gastroenterol 2006.

Communication orale 1**GMCSF loaded hydrogel improve antitumor immune response in colorectal carcinoma**

Katia Lemdani¹, Nathalie Mignet², Johanne Seguin², Jean-François Emile¹, Vincent Boudy², Claude Capron¹, Robert Malafosse¹.

(1).EA 4340 Ambroise Pare Hôpital, Boulogne and University of Versailles-Saint-Quentin, Saint-Quentin, France; Ambroise Pare, AP-HP, University Versailles-SQY, Boulogne-Billancourt, France; Versailles

(2) .UMR 8258 CNRS / U1022 INSERM Paris V University France, Paris,

Background: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) has become an attractive vaccine adjuvant capable of enhancing the antitumor immune response by inducing DC proliferation, maturation and migration, as well as expansion and differentiation of lymphocytes. The systemic administration of this protein has a half-life of 60 min and can induce immunosuppressive effects at high doses. Biocompatible hydrogels are increasingly used for the delivery of drugs and vaccines to enhance the anti-cancer immune response. We propose a hydrogel formulation for the tumoral release of GMCSF in order to improve the immune response observed after radiofrequency of colorectal tumors.

Methods: Physicochemical techniques have been established to determine the optimum formulation of the hydrogel. The properties of the hydrogel were studied by rheology and muco-adhesion tests were put in place. The residence time of the hydrogel and protein in the tumor zone was demonstrated by optical imaging. In addition, the kinetics of release and the integrity of the encapsulated GMCSF were determined. Finally, the formulation of a thermo-reversible hydrogel loaded by GM-CSF was tested in combination with RFA on CT26 colorectal tumors. The efficiency was assessed on survival, evolution of lesions, characterization of tumoral lymphocyte infiltration and pro-inflammatory cytokines expression in peripheral T lymphocytes.

Communication orale 2



Caractérisation des thermogels par imagerie

Katia Lemdani^{*1,2}, Johanne Seguin^{*1}, Claude Capron^{*2}, Nathalie Mignet^{*1}, and Robert Malafosse^{*2}

¹Unité de pharmacologie chimique et génétique et d'imagerie – Inserm, CNRS : UMR8151, Université Paris V - Paris Descartes, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris – Paris, France

²Biomarqueurs en Cancérologie et Onco-Hématologie (BCOH) – Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ) : EA4340 – 9 avenue Charles De GAULLE.92100, France

Résumé

Les hydrogels sont des réseaux réticulés de polymères hydrophiles présentant une grande stabilité chimique et biologique. Il existe deux types de polymères ; les hydrogels chimiques formés par des liaisons covalentes et les hydrogels physiques ou dits " réversibles " formés par enchevêtrement de polymères par des liaisons fragiles de type hydrogène par exemple. Nous nous sommes intéressés à l'étude de formes thermogélifiantes qui présentent un aspect sol-gel température dépendant. L'intérêt d'utiliser ces formes est démontré dans plusieurs travaux expérimentaux et essais cliniques ; la constitution d'une matrice par les hydrogels permet d'envisager une cinétique de libération contrôlée du principe actif donc un séjour raccourci des patients. De plus, la possibilité d'introduire des additifs bioadhésifs permet d'envisager son indication dans des protocoles de traitement local.

Le choix de la composition de l'hydrogel est défini par un cahier de charge qui répond à des exigences physicochimiques ; la capacité de gélification, la libération ralentie des substances actives, l'efficacité thérapeutique maintenue ainsi que d'autres critères. Ces caractéristiques sont étudiées par des techniques d'analyse thermique, de rhéologie, de mucoadhésion tissulaire et de dissolution de l'hydrogel .De plus, la stabilité *in vivo* des thermogels est exploitée par des techniques d'imagerie dont nous disposons au laboratoire. Le suivi de l'hydrogel après injection locale est réalisé par technique IRM afin d'étudier sa stabilité dans le site d'injection. D'autre part, une sonde d'imagerie optique constituée d'une albumine marquée à la cyanine5 a été développée par les chimistes de l'unité pour un suivi de la protéine en imagerie de fluorescence. Ce modèle facile d'accès permet de mimer une cinétique de libération *in vivo* d'une substance active dans l'hydrogel.

Mots-Clés: RFA, métastases occultes, immunomodulateur, thermogel, infiltrat lymphocytaire

*Intervenant

Brevet



BASE BREVETS

IMMUNOMODULATION APRÈS UN TRAITEMENT ANTITUMORAL LOCO-RÉGIONALE

DESCRIPTION	DOCUMENTS
N° et date de publication de la demande	W02018041981 - 2018-03-08
Type de la demande	A1
N° et date de dépôt	PCT/EP2017071924 - 2017-08-31
N° et date de priorité	EP16306102 - 2016-08-31 ; EP17305558 - 2017-05-16
Classification CIB	A61K 9/06 ; A61K 38/19 ; A61K 39/04 ; A61K 47/10 ; A61K 47/36
Classification CPC	A61K 9/0019 ; A61K 9/0024 ; A61K 9/06 ; A61K 38/193 ; A61K 39/04 ; A61K 47/10 ; A61K 47/36 ; A61K2039/54 ; A61K2039/55522 ; A61K2039/585
Famille de brevets	W02018041981A1

Abrégé

La présente invention porte sur un polymère d'hydrogel thermosensible comprenant au moins un copolymère thermosensible, une solution aqueuse et un excipient mucoadhésif. Ledit hydrogel polymère thermosensible comprend, en outre, au moins un adjuvant immunostimulateur, et/ou au moins une cytokine, et/ou au moins une chimiokine et/ou au moins une protéine de choc thermique. Un autre élément de l'invention est un polymère d'hydrogel thermosensible, élaboré d'après l'invention, destiné à être utilisé dans le traitement de tumeurs, ou de métastases, chez un sujet atteint d'un cancer, de préférence un cancer métastatique.

INTERVENANTS**Demandeur(s) :**

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)) - - FR

CENTRE NAT RECH SCIENT (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) - - FR

UNIV PARIS DESCARTES (UNIVERSITE PARIS DESCARTES) - - FR

ASSIST PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS (ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS) - - FR

ECOLE NAT SUPERIEURE DE CHIMIE DE PARIS (ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE PARIS) - - FR

UNIV DE VERSAILLES ST QUENTIN EN YVELINES (UNIVERSITE DE VERSAILLES-ST QUENTIN EN YVELINES) - - FR

Inventeur(s) :

MALAFOSSE ROBERT (MALAFOSSE, Robert) - - FR

MIGNET NATHALIE (MIGNET, Nathalie) - - FR

BOUDY VINCENT (BOUDY, Vincent) - - FR

SEGUIN JOHANNE (SEGUIN, Johanne) - - FR

LEMDANI KATHIA (LEMDANI, Kathia) - - FR

CAPRON CLAUDE (CAPRON, Claude) - - FR

Titre : Optimisation de la réponse immune après traitement locorégional de tumeurs colorectales murines

Mots clés : RFA, immunothérapie, infiltrat lymphocytaire

Résumé : Les métastases hépatiques compliquent l'évolution de 50% des cancers colorectaux (CCR). Plus de la moitié des patients présentent une récurrence à distance avec métastases occultes pour lesquelles une chirurgie peut être réalisée dans moins de 20% des cas. L'ablation par radiofréquence (RFA) induit une réponse lymphocytaire T qui n'est pas évaluée après une intervention chirurgicale seule. L'immunothérapie combinée à la RFA pourrait potentialiser cet effet conduisant à une réponse tumorale à distance. Nous proposons une approche qui combine la RFA avec hydrogel thermoréversible libérant des agents immunomodulateurs (GMCSF et BCG) sur le site du traitement

Premièrement, nous nous sommes intéressés à la sélection et à la caractérisation de la formulation optimale d'hydrogel par des techniques physicochimiques. Les propriétés de l'hydrogel ont été étudiées par rhéologie et des tests de muco-adhésion ont été mis en place. Le temps de résidence de l'hydrogel et de la protéine dans la zone tumorale a été démontré par imagerie optique. De plus, la cinétique de libération et l'intégrité du GMCSF encapsulé ont été déterminées.

Ensuite, nous avons démontré l'efficacité de l'association de la RFA avec le dépôt local de l'hydrogel immunomodulateur sur un modèle murin de cancer colorectal. En effet, nous avons observé une survie améliorée des animaux et régression complète des tumeurs distantes chez les animaux traités par la combinaison complète. Cette réponse est caractérisée par un niveau élevé de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules T CD4 et TCD8 et une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs. Ceci a permis d'envisager une association avec l'immunothérapie anti-PD1 dans le traitement de macrométastases échappant au traitement combiné RFA avec l'hydrogel immunomodulateur. En effet, l'immunothérapie dans le traitement du cancer colorectal métastatique présente une efficacité limitée chez les patients. Notre travail propose a démontré que l'efficacité de l'immunomodulation locale dans l'amélioration des réponses immunitaires dans le cancer colorectal. Ces résultats permettent de reconsidérer l'utilisation de l'immunothérapie chez les patients atteints de CCR métastatique non MSI.

Title: Optimization of the immune response after locoregional treatment of colorectal murine tumors

Keywords: Radiofrequency ablation, immunotherapy, lymphocytes infiltrating tumor

Abstract: Liver metastases complicate the progression of 50% of colorectal cancers (CRC). More than half of the patients have recurrent remissions with occult metastases for which surgery can be performed in less than 20% of cases. Radiofrequency ablation (RFA) induces a T lymphocyte response that is not observed after surgery alone. Combined immunotherapy with RFA may potentiate this effect leading to a distant tumor response. We propose an approach that combines RFA with thermoreversible hydrogel releasing immunomodulatory agents (GMCSF and BCG) at the treatment site. First, we focused on the selection and characterization of the optimal hydrogel formulation by physicochemical techniques. The properties of the hydrogel were studied by rheology and mucoadhesion tests were set up. The residence time of the hydrogel and the protein in the tumor zone was demonstrated by optical imaging. In addition, the release kinetics and integrity of the encapsulated GMCSF were determined.

Then, we demonstrated the effectiveness of the combination of RFA with the local deposition of the immunomodulatory hydrogel on a mouse model of colorectal cancer. Indeed, we observed improved survival of animals and complete regression of distant tumors the complete treatment group. This response is characterized by a high level of pro-inflammatory cytokine secreted by CD4 and TCD8 T cells and an increase Lymphocytes infiltrating tumors. The immune escape of large lesions was reversed by association with anti-PD1 immunotherapy. Indeed, immunotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer has limited efficacy in patients. Our work has demonstrated the effectiveness of local immunomodulation in improving immune responses in colorectal cancer. These results make it possible to reconsider the use of immunotherapy in patients with non-MSI metastatic CRC.