



HAL
open science

Analyse de la composante immunitaire des cancers colorectaux et de son impact potentiel sur les stratégies thérapeutiques

Carine El Sissy

► **To cite this version:**

Carine El Sissy. Analyse de la composante immunitaire des cancers colorectaux et de son impact potentiel sur les stratégies thérapeutiques. Immunologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS404 . tel-03884128

HAL Id: tel-03884128

<https://theses.hal.science/tel-03884128>

Submitted on 5 Dec 2022

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale ED 394 Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Plateforme d'Immunomonitoring, Hôpital Européen Georges Pompidou

*INSERM UMRS1138 Immunologie et Cancérologie Intégratives, Centre de Recherche des
Cordeliers*

Analyse de la composante immunitaire des cancers colorectaux et de son impact potentiel sur les stratégies thérapeutiques

Présentée par Carine El Sissy

Thèse de Doctorat

Dirigée par le Professeur Franck Pagès

Présentée et soutenue publiquement le 3 décembre 2021

Devant un jury composé de :

Présidente du Jury	Pr Isabelle Cremer,
Rapporteur	Dr Anne Caignard,
Rapporteur	Pr Pierre Coulie,
Examineur	Pr Mehdi Karoui,
Examineur	Pr Magali Svrcek,
Examinatrice	Pr Eric Tartour,
Directeur de Thèse	Pr Franck Pagès,

*A ma grand-mère
A mes tantes*

*Si tu veux construire un bateau, ne rassemble pas
tes hommes et femmes pour leur donner des ordres,
pour expliquer chaque détail, pour leur dire où trouver chaque chose...*

*Si tu veux construire un bateau,
fais naître dans le cœur de tes hommes et femmes le désir de la mer.*

Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que la recherche est un travail d'équipe. Je n'aurais jamais pu mener ce travail à son terme sans toutes les personnes qui m'ont accompagnée ces dernières années et que je tiens à remercier chaleureusement.

Dans un premier temps, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Madame le Docteur Anne Caignard, Monsieur le Professeur Pierre Coulie,
Vous me faites l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail,

Madame le Professeur Isabelle Cremer,
Vous me faites l'honneur de présider le Jury de cette Thèse,

Madame le Professeur Magali Sverck, Monsieur le Professeur Mehdi Karoui, Monsieur le Professeur Eric Tartour,
Vous me faites l'honneur d'être examinateurs de mon jury,

Monsieur le Professeur Franck Pagès, mon directeur de Thèse, merci de la confiance que vous m'avez accordée depuis mon premier stage d'interne. Je tiens à vous remercier pour vos judicieux conseils et pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger ce travail. Merci de m'avoir transmis le goût de la recherche et communiqué votre passion pour l'innovation en immuno-cancérologie.

Je voudrais également remercier le Professeur Eric Tartour, merci de m'avoir donné l'opportunité d'être AHU dans votre service d'Immunologie à l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Merci de votre confiance et de votre soutien.

Je voudrais remercier l'ensemble du laboratoire d'immunologie de l'hôpital européen Georges Pompidou, Véronique, Marie-Agnès, Clémence, merci de m'avoir tant appris en immunologie et en génétique, pendant mon internat et mon assistantat à vos côtés ; Antonin

merci pour ton aide (surtout pendant la dernière ligne droite !) et ta bonne humeur ; Alain, Anne, Céline, Diane, Fabienne, Frédérique, Joséphine, Laetitia, Lydie, Nadine, Nelly, Nicolas (les 2 !), Pauline, Paula, Stéphane, Stéphanie (les 2 là aussi !), Rosie, vous êtes une super équipe cela a toujours été un plaisir de travailler avec vous au quotidien, merci pour votre aide et soutien pendant toutes ces années à tous les niveaux, vous m'avez beaucoup appris et aidé ; la plate-forme d'immunomonitoring (le 1^{er}) Amos, Florence, Nacilla, Valérie, depuis le début nous travaillons ensemble et c'est toujours avec autant de plaisir, Nacilla quel dommage que tu ne sois plus avec nous ; et l'équipe du Centre de Recherche des Cordeliers Bénédicte, Erwan, Lucie, Tessa, merci pour votre aide dans les mises au points et pour votre soutien ! Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé à l'aboutissement de ce travail.

Merci au Professeur Olivier Adotevi et à toute son équipe pour leur accueil très chaleureux, quel dommage que le COVID ai mis fin prématurément à notre collaboration. J'espère que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble.

Merci à mes parents de m'avoir transmis cette fibre médicale, merci pour votre amour et votre soutien quotidien, vous êtes les meilleurs,

Merci à mon frère, d'être toujours présent, pour toutes ces belles années passées ensemble, tu as aussi choisi cette voie je suis sûre qu'elle te comblera. J'ai hâte d'être là quand ça sera ton tour :) !!

Alexis, merci pour ton soutien quotidien, ton amour, et ta patience. L'année prochaine ça sera à ton tour :) !

Abbréviations

ARS : artères rectales supérieures

ARM : artères rectales moyennes

ASM : artère sacrée moyenne

CCR : Cancer colorectal

CT : Core of the Tumor

DFS : Disease Free Survival, survie sans récurrence

ESMO : European Society for Medical Oncology

ICI : Immune Checkpoint Inhibitor

IM: Invasive Margin

IS : Immunoscore

IS_B : Immunoscore biopsy

LARC: Locally advanced Rectal Cancer

MDSC (myeloid-derived suppressor cells)

MCI : Molécule de costimulation inhibitrice

MDSC (myeloid-derived suppressor cell)

nRCT: Radiochimiothérapie néoadjuvante

OS : Overall Survival, survie globale

RCT : Radiochimiothérapie

TAA : Tumor Associated Antigen, antigens associés à la tumeur

TAM (Tumor-associated macrophages)

TME : Total Mesorectal Excision

TNM : Tumor-Node-Metastase

VEGF : Vascular endothelial growth factor

WSI: Whole Slide Imaging

W&W : Stratégie Watch and Wait de préservation d'organe

Table des matières

Remerciements	4
Abbréviations	7
FIGURES	10
TABLEAUX	13
INTRODUCTION	14
PARTIE I. Le cancer colorectal : focus sur le cancer du rectum	15
A. Le rectum : anatomie.....	15
B. Epidémiologie du cancer du rectum.....	17
C. Diagnostic du cancer du rectum.....	19
D. Prise en charge thérapeutique.....	20
1) Le traitement de référence.....	21
2) Place de la chimiothérapie adjuvante et de la thérapie néoadjuvante totale (TNT).....	22
3) Curiethérapie à haute dose et RT de contact.....	23
4) Nouvelles options thérapeutiques : l'Immunothérapie.....	23
5) Nouvelles options thérapeutiques : exérèse locale et stratégie Watch and Wait.....	24
6) Évaluation de la réponse au traitement néoadjuvant et biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement.....	27
PARTIE II. Le microenvironnement tumoral : rôle du système immunitaire dans les cancers	30
A. Acteurs de l'immunité anti-tumoral.....	30
1) Les débuts de l'immunocancérologie : un rappel historique.....	30
2) La théorie de l'immunosurveillance.....	31
a) Le concept d'« immunoediting ».....	32
b) Le microenvironnement tumoral.....	34
(i) Activité anti-tumorale et cellules de l'immunité innée.....	35
(ii) Activité anti-tumorale et cellules de l'immunité adaptative.....	39
B. Spécificité dans le cancer colorectal, vers une transition clinique de la composante immunitaire intratumorale.....	41
1) Apport de la pathologie digitale et de l'intelligence artificielle dans la prise en charge clinique, évolutions futures.....	41
2) Immunoscore.....	42
a) Concepts et développement de l'Immunoscore.....	42
b) Immunoscore et chimiothérapie adjuvante dans le cancer du côlon.....	44
c) Immunoscore et cancer du rectum : résultats préliminaires.....	45
C. Traitements anti-cancéreux et infiltrat immunitaire.....	46
1) Radiothérapie et microenvironnement tumoral.....	47
a) Effets immunostimulants de la radiothérapie.....	47
b) Effet systémique de la radiothérapie : effet abscopal.....	49
c) Effet secondaire de la radiothérapie : l'immunosuppression.....	49
2) Impact de la chirurgie sur le microenvironnement tumoral.....	50
3) Radiochimiothérapie néoadjuvante et nombres de ganglions.....	51
PARTIE III. Les ganglions lymphatiques : acteurs immunitaires dans le cancer	53
A. Ganglions lymphatiques du rectum.....	53
B. Ganglions lymphatiques drainant la tumeur : intérêt du curage ganglionnaire étendu dans le cancer du rectum, différences entre les pratiques occidentales et asiatiques.....	54
C. Ganglions lymphatiques : le double-jeu.....	55
1) Ganglions sentinelles : une niche pour le développement tumoral.....	55
2) Ganglion lymphatique drainant la tumeur : organe lymphoïde secondaire.....	58
OBJECTIFS	63
RESULTATS	65

Partie I. Article 1: A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait	66
Contexte : Évaluation de l'infiltration immunitaire sur biopsie : un objectif atteignable ?	66
Résultats.....	73
Partie II. Article 2: Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to improve immune checkpoint inhibitors therapy	103
Partie III. Cohorte de validation de biopsies de cancer du rectum, patients suivis par la stratégie de surveillance Watch & Wait (article en préparation)	133
Partie IV. Analyse du statut immunitaire ganglionnaire des patients atteints de cancer du rectum en fonction du degré de réponse au traitement néoadjuvant.....	141
1) Analyses histologiques de l'architecture ganglionnaire	143
a) Analyse optique sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)	143
b) Analyse par Intelligence artificielle sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)	147
2) Analyses en immunohistochimie chromogénique.....	150
3) Immunofluorescence	156
a) Panel 1: CD3/CD20/Ki67/Lyve-1	157
b) Panel 2: CD20/CD27/CD38/Lyve-1.....	158
4) Analyses transcriptomiques par la technique 3'RNAseq (Lexogen)	160
a) Traitement bio-informatique et contrôle qualité	161
b) Comparaison des patients répondeurs ou non répondeurs à la nRT.....	162
c) Comparaison des ganglions proliférant (Ki67 forts) ou non (Ki67 faibles).....	164
5) Analyse du répertoire des cellules T chez les patients répondeurs et non répondeurs à la nRCT	167
DISCUSSION.....	170
I. Optimisation de la prise en charge thérapeutique dans le cancer du rectum, apport de l'analyse du microenvironnement tumoral avant tout traitement.....	171
A. De l'intérêt du biobanking.....	171
B. Apport de l'analyse de l'infiltrat immunitaire des biopsies diagnostiques du cancer du rectum ...	172
C. L'IS _B comme biomarqueur permettant l'évolution de la prise en charge des cancers du rectum ..	174
1) L'intensification de la radiothérapie pourrait annuler l'impact du système immunitaire en termes de pronostic	174
2) Allongement du délai entre la fin de la radiothérapie et la chirurgie pourrait être bénéfique : implication de la composante immune	176
3) Combinaison nRCT et immunothérapie.....	176
4) Stratégies de préservation d'organe	178
D. Perspectives : application de l'IS _B à d'autres types de cancers traités par nRCT.....	179
II. Ganglions lymphatiques, acteurs de la réponse anti-tumorale	181
A. Ganglions lymphatiques : historique	181
B. Revisiter le dogme du curage ganglionnaire systématique.....	182
C. Rôle des lymphocytes B dans la réponse nRCT	186
D. Limitations et perspectives.....	188
Conclusion	190
Bibliographie.....	191
Annexes.....	214

FIGURES

FIGURE 1. ESPACES PERIRECTAUX, COUPE SAGITTALE DU PELVIS MASCULIN, VUE DE GAUCHE. SCHUNKE M, ET AL. PROMETHIUS LERNATLAS DER ANATOMIE, VOL. 2. 3RD ED. STUTTGART: THIEME PUBL.; 2012.....	16
FIGURE 2. LE RECTUM SE DIVISE EN 3 PARTIES : HAUT, MOYEN ET BAS RECTUM (ORONSKY ET AL. 2020)	17
FIGURE 3. TENDANCES DE LA PREVALENCE DE LA COLOSCOPIE (2000-2018) ET DES TAUX D'INCIDENCE DES CANCERS COLORECTAUX (2000-2016), CHEZ LES ADULTES DE PLUS DE 50 ANS AUX ÉTATS-UNIS. (SIEGEL ET AL., 2020)	18
FIGURE 4. IMMUNOEDITION ET LES 3 E.....	33
FIGURE 5. LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE ET ADAPTATIF, ACTEURS IMPLIQUES DANS L'IMMUNITÉ ANTI-TUMORALE (D'APRES GLENN DRANOFF, NATURE REVIEW, 2004)	35
FIGURE 6. ASSOCIATION ENTRE INFILTRAT IMMUNITAIRE ET PRONOSTIC DEDUITE DE L'ANALYSE DE 124 ARTICLES PUBLIES ETUDIANT L'IMPACT DES COMPOSANTES CYTOTOXIQUES, MEMOIRES, REGULARICES ET DES SOUS-POPULATION HELPER EN TERMES DE PRONOSTIC DANS 20 TYPES DE CANCERS.	41
FIGURE 7. DRAINAGE LYMPHATIQUE DU RECTUM.....	54
FIGURE 8. NICHE PRE-METASTATIQUE GANGLIONNAIRE. LES FACTEURS DERIVES DE LA TUMEURS (VEGF, EV) INDUISENT UNE IMMUNOSUPPRESSION LOCALE (MDSC, TREGS), UNE LYMPHANGIOGENESE, UN REMODELAGE DES HEVS. (GILLOT ET AL., 2021)	58
FIGURE 9. VARIABILITE DE L'INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE AU SEIN D'UNE TUMEUR CLASSEE IMMUNOSCORE 1.	68
FIGURE 10. SURFACE MINIMALE (%) REQUISE POUR CHAQUE MARQUEUR (CD3+ ET CD8+), DANS CHAQUE REGION (CT ET IM) PERMETTANT D'ESTIMER UNE DENSITE EN CELLULES IMMUNITAIRE EGALE A CELLE DE LA REGION ENTIERE CHEZ 538 PATIENTS (MARLIOT ET AL., 2020).....	69
FIGURE 11. IMPACT DE LA DENSITE DES CELLULES IMMUNITAIRES (CD3+ ET CD8+) (REPRESENTEE EN ABSCSSE) DANS CHAQUE REGION D'INTERET (CT ET IM) SUR LA SURFACE MINIMALE NECESSAIRE A ANALYSER (REPRESENTEE EN ORDONNEE) POUR OBTENIR UNE DENSITE EN CELLULES IMMUNITAIRES EGALE A CELLE DE LA REGION ENTIERE (MARLIOT ET AL., 2020)	70
FIGURE 12. COMPARAISON DES DENSITES MOYENNES DE CELLULES T CD3+ OU CD8+ DANS LE CT (EN GRIS) ET DANS L'IM (EN BLEU) POUR CHAQUE PATIENT DE LA COHORTE (N=538). LES PATIENTS SONT CLASSES PAR ORDRE CROISSANT DE DENSITE DE CELLULES IMMUNITAIRES DANS LA REGION CT. LES CORRELATIONS DE SPEARMAN AVEC R POUR CT VS IM SONT FOURNIES POUR CHAQUE MARQUEUR.....	71
FIGURE 13. COURBES DE KAPLAN-MEYER ILLUSTRANT LA DFS EN FONCTION DE LA DENSITE EN CD3 (FORTE HI OU FAIBLE LO) DANS LE CENTRE DE LA TUMEUR (CT) (A), LA MARGE D'INVASION (B), OU EN COMBINANT LES DEUX REGIONS (C).	71
FIGURE 14. METHODOLOGIE DE DETERMINATION DE L'IS _B	74
FIGURE 15. COMPARAISON DE L'INTENSITE DE MARQUAGE ENTRE LES DEUX CENTRES (HOLLANDE VS FRANCE).	135
FIGURE 16. A. TTR EN FONCTION DE L'IS _B EN TROIS CATEGORIES (HIGH, EN BLEU, INTERMEDIARE EN JAUNE ET LOW EN ROUGE) CHEZ LES PATIENTS BON REPONDEURS A LA NRCT SUIVIS PAR WATCH AND WAIT. B. TTR EN FONCTION DE L'IS _B EN TERCILE (HIGH, EN BLEU, INTERMEDIARE EN JAUNE ET LOW EN ROUGE) CHEZ LES PATIENTS BON REPONDEURS A LA NRCT SUIVIS PAR WATCH AND WAIT	137
FIGURE 17. PROBABILITE DE RECHUTE A 2 OU 5 ANS EN FONCTION DE L'IS _B EXPRIME EN VARIABLE CONTINUE (IS _B MEANSORE) SANS RELACHEMENT (A) OU AVEC RELACHEMENT (RESTRICTED CUBIC SPLINE ; PONTS DE RELACHEMENT A 25%, 45% ET 70%) (B).	138
FIGURE 18. CONTRIBUTION RELATIVE DES DIFFERENTS PARAMETRES CLINIQUES ET DE L'IS _B SUR LA SURVIE AVANT RECHUTE.....	139
FIGURE 19. TTR EN FONCTION DE L'IS _B EN TROIS CATEGORIES (HIGH, EN BLEU, INTERMEDIARE EN JAUNE ET LOW EN GRIS) CHEZ LES PATIENTS TRAITES PAR NRCT ET BOOST BRACHYTHERAPIE, BON REPONDEURS A LA NRCT SUIVIS PAR WATCH AND WAIT. COHORTE DANEMARK.....	140
FIGURE 20. NOMBRE DE GANGLIONS PAR PATIENT. A. ENSEMBLE DES GANGLIONS DES PATIENTS EN FONCTION DE LA QUALITE DE LA REPONSE AU TRAITEMENT NEOADJUVANT B. MOYENNE DU NOMBRE DE GANGLIONS RETROUVES PAR GROUPE DE PATIENT (P=0,76) NR NON REPONDEUR, R REPONDEUR.	143
FIGURE 21. A. IMAGE NUMERISEE D'UNE LAME HES DE GANGLION AYANT PERMIS LA QUANTIFICATION DES FOLLICULES SECONDAIRES AVEC CENTRE GERMINATIF B. GRAPHIQUE REPRESENTANT LE NOMBRE DE CENTRES GERMINATIFS PAR PATIENT (EN ABSCSSE) EN FONCTION DU DEGRE DE REPONSE A LA NRCT C. BOX-PLOT REPRESENTANT LE NOMBRE TOTAL DE FOLLICULES SECONDAIRES AVEC CENTRE CLAIR CHEZ LES PATIENTS REPONDEURS (R) ET NON REPONDEURS (NR) D. IMAGE NUMERISEE DU MEME	

GANGLION IMMUNOMARQUE PAR LE CD3 (ROSE) ET CD20 (MARRON) E. BOX-PLOT REPRESENTANT LE NOMBRE TOTAL DE FOLLICULES CHEZ LES PATIENTS REPONDEURS (R) ET NON REPONDEURS (NR)	145
FIGURE 22 : DISTRIBUTION DES TAILLES DU CORTEX (HAUT) ET DU PARACORTEX (BAS). EN ABCISSE SONT REPRESENTES LES PATIENTS CLASSES EN R ET NR, CHAQUE BARRE CORRESPOND A LA PROPORTION DE CHAQUE CATEGORIES DE TAILLE DE CORTEX OU DE PARACORTEX , ROUGE = FAIBLE EPAISSEUR , VERT = EPAISSEUR INTERMEDIAIRE OU BLEU = FORTE EPAISSEUR. NR NON REPONDEURS, R REPONDEURS	146
FIGURE 23 : A. EXEMPLE DE CAPSULE EPAISSE (FLECHE) CHEZ UN PATIENT REPONDEUR A LA NRCT B. EXEMPLE DE CAPSULE FINE (FLECHE) CHEZ UN PATIENT NON REPONDEUR) A LA NRCT	146
FIGURE 24. EXEMPLE DE RECONNAISSANCE PAR IA DES DIFFERENTES ZONES DU GANGLION : EN VERT LA CAPSULE, EN ROUGE LES VAISSEAUX LYMPHATIQUES (MEDULLAIRE PRINCIPALEMENT) ET EN JAUNES LES CENTRES GERMINATIFS.	148
FIGURE 25. EXEMPLE DE SEGMENTATION SEMANTIQUE	148
FIGURE 26. EXPLICATIONS DES METRIQUES DE SEGMENTATION DICE ET IOU	149
FIGURE 27. DOUBLE MARQUAGE CD3/CD20 ET ANALYSES HALO. A. EXEMPLE DE DOUBLE MARQUAGE CD3 (ROSE) /CD20(MARRON), B. FOCUS SUR UNE ZONE D'INTERET C. RECONNAISSANCE DES CELLULES IMMUNOMARQUEES PAR LE LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGE HALO PERMETTANT UNE QUANTIFICATION DES CELLULES D. MODULE « CLASSIFIER » DE HALO PERMETTANT LA RECONNAISSANCE DES DIFFERENTES REGIONS DU GANGLION, EN ROUGE LES CENTRES GERMINATIFS ZONE CD20+, EN VERT LA ZONE DE PARACORTEX AVEC UNE MAJORITE DE CELLULES CD3+, LA ZONE BLEUE CORRESPONDANT AU TISSU NON IMMUNOMARQUE	152
FIGURE 28. MARQUAGE Ki-67 ET LYVE-1, ANALYSES HALO. A. EXEMPLE DE DOUBLE MARQUAGE Ki-67 (MARRON) LYVE-1 (ROSE). B. FOCUS SUR UNE ZONE D'INTERET C. RECONNAISSANCE DES CELLULES IMMUNOMARQUEES PAR LE LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGE HALO PERMETTANT UNE QUANTIFICATION DES CELLULES D. MODULE « CLASSIFIER » DE HALO PERMETTANT LA RECONNAISSANCE DES DIFFERENTES REGIONS DU GANGLION, EN ROUGE LES ZONES MARQUEES PAR LE LYVE-1, CORRESPONDANT AUX SINUS LYMPHATIQUES, LES ZONES JAUNES CORRESPONDENT A DES ZONES DENSES EN Ki-67. E. DETAIL DE RECONNAISSANCE DES ZONES MARQUEES PAR LE LYVE-1 (ROUGE) ET ZONE AVEC CENTRE GERMINATIF (Ki-67)	153
FIGURE 29. BOX PLOT ILLUSTRANT LA MOYENNE DES DENSITES EN LYMPHOCYTES, EN CELLULES CD3+ ET CD20+ PAR PATIENT, CALCULEE SUR L'ENSEMBLE DES GANGLIONS EN FONCTION DU STATUT DE REPONSE A LA NRCT. UN POINT CORRESPOND A LA MOYENNE DES DENSITES CALCULEE SUR L'ENSEMBLE DES GANGLIONS.	154
FIGURE 30. DENSITE EN Ki67 DANS LES GANGLIONS, DANS LA ZONE MEDULLAIRE ET AU SEIN DES FOLLICULES. PANEL A. BOX PLOT ILLUSTRANT LES DENSITES EN CELLULES Ki67+ DANS L'ENSEMBLE DES GANGLIONS ANALYSES, LES PATIENTS SONT EN ABCISSE. PANEL B. BLOX PLOT ILLUSTRANT LES MOYENNES DES DENSITES EN CELLULES Ki67+ POUR CHAQUE PATIENT. PANEL C. BOX PLOT ILLUSTRANT L'ENSEMBLE DES DENSITES EN CELLULES Ki67 PAR GANGLIONS ANALYSES. TR 0,05<P<0,15, * P<0,05, *** P<0,001 ; **** P<0,0001	155
FIGURE 31. SEQUENCE D'ANALYSE : MARQUAGE EN IF MULTIPLEX, NUMERISATION DES LAMES SUR LE SCANNER VECTRA POLARIS PUIS ANALYSES DES IMAGES OBTENUES PAR LE LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGE HALO AI.....	157
FIGURE 32. BOX PLOT MONTRANT LES DIFFERENCES EN TERMES DE DENSITES EN CELLULES CD3+Ki67+ ET CD20+Ki67+ DANS L'ENSEMBLE DES GANGLIONS, AU NIVEAU DE LA ZONE MEDULLAIRE OU DE LA ZONE EXTRA-MEDULLAIRE. UN POINT REPRESENTE UN GANGLION ANALYSE. * P<0,05, *** P<0,001.....	158
FIGURE 33. PANEL 2 EN IMMUNOFLOUORESCENCE PERMETTANT L'ANALYSE DES SOUS POPULATIONS B, RECONNAISSANCES DES CELLULES IMMUNOMARQUEES PAR LE LOGICIEL HALO (METTRE IMAGE PLUS ZOOMEE)	159
FIGURE 34. BOX PLOT REPRESENTANT LES DENSITES EN CELLULES B NAIVES (CD20+CD27-CD38-), PLASMABLASTES (CD20-CD27+CD38+) ET EN CELLULES B MEMOIRES (CD20+CD27+CD38-) DANS LA TOTALITE DU GANGLION ET DANS LA MEDULLAIRE, R REPONDEURS, NR NON REPONDEUR TR 0,05<P<0,15	159
FIGURE 35. BARPLOT DE LA SOMME DES READS S'ALIGNANT SUR LE GENOME DE REFERENCE, POUR LES GANGLIONS DE CHAQUE PATIENT.	162
FIGURE 36. ANALYSE PAR POSITIONNEMENT MULTIDIMENSIONNEL (MDS) APRES NORMALISATION CHEZ TOUS LES PATIENTS, SELON LES DIMENSIONS 1 ET 2.	163
FIGURE 37. HEATMAP REPRESENTANT LES GENES ASSOCIES AUX SOUS POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B (A) ET T (C) EN FONCTION DU STATUT DE REPONSE A LA NRCT (NR NON REPONDEUR VS R REPONDEUR) ET DU STATUT DE PROLIFERATION Ki67 (- : DENSITE FAIBLE EN Ki67 SUR LES ANALYSES EN IHC ET IF, + : DENSITE FORTE EN Ki67)	166
FIGURE 38. NOMBRES DE CLONES SEQUENCES AU SEIN DES 3 PLUS GROS GANGLIONS DES PATIENTS REPONDEURS (R) ET NON REPONDEURS (NR).....	168
FIGURE 39. D50 DIVERSITY REPRESENTANT LE NOMBRE DE CLONES OCCUPANT 50% DU REPERTOIRE SEQUENCE AU SEIN DES 3 PLUS GROS GANGLIONS DES PATIENTS REPONDEURS (R) ET NON REPONDEURS (NR).	168
FIGURE 40. ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE REPRESENTANT LES INDICES DE JACCARD, UN POINT REPRESENTE UN PATIENT, LES PATIENTS R SONT EN ROUGE LES PATIENTS NR SONT EN BLEU.....	169

FIGURE 41. CLASSIFICATION T EN IRM : **T1is**: TUMEUR IN SITU; **T1sm1/2**: TUMEUR ENVAHIT UNE PARTIE DE LA SOUS-MUQUEUSE; **T1sm3**: ENVAHISSEMENT COMPLET DE LA SOUS-MUQUEUSE; **T2 EARLY**: ENVAHISSEMENT LOCAL DE LA MUSCULARIS PROPRIA; **T2 ADVANCED**: ENVAHISSEMENT COMPLET DE LA MUSCULARIS PROPRIA; **T3A**: EXTENSION DE LA TUMEUR AU MESORECTUM < 1 MM ; **T3B**: EXTENSION DE LA TUMEUR AU MESORECTUM ENTRE 1 ET 5 MM; **T3C**: EXTENSION DE LA TUMEUR AU MESORECTUM ENTRE 5 ET 15 MM ; **T3D**: EXTENSION DE LA TUMEUR AU MESORECTUM > 15 MM; **T4A**: ENVAHISSEMENT DU PERITONE TUMOUR; **T4B**: ENVAHISSEMENT DES ORGANES ADJACENTS. D'APRES SANTIAGO ET AL. 2020 217

TABLEAUX

TABLEAU 1 STRATEGIES DE DEPISTAGE DU CCR EN FRANCE	19
TABLEAU 2. MOYENNE, MEDIANE, DEVIATION STANDARD (SD) COMPARANT LES PATIENTS AVEC UN IS FORT (HI) ET FAIBLE (LO) EN FONCTION DU NOMBRE DE TUILES ANALYSEES	67
TABLEAU 3. CONCORDANCE ENTRE IS CALCULE SUR PIECE OPERATOIRE ET IS _B ASSOCIE	72
TABLEAU 4. COHORTE DE VALIDATION PATIENTS SUIVIS EN WATCH AND WAIT, IS _B	133
TABLEAU 5. DETERMINATION DES IS _B A PARTIR D'IMMUNOMARQUAGES FAIT DANS LES DEUX CENTRES (PAYS-BAS ET	135
TABLEAU 6 : REPARTITION DES DIFFERENTES CATEGORIES D'IS _B EN FONCTION DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES.	136
TABLEAU 7. MODELE DE COX MULTIVARIE POUR LA TTR EN FONCTION DE L'ISB COMBINE AUX PARAMETRES CLINIQUES	138
TABLEAU 8. TABLEAU RECAPITULATIF DES ANALYSES EFFECTUEES SUR LES GANGLIONS EN FONCTION DU DEGRE DE REPOSE AU TRAITEMENT NEOADJUVANT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE CANCER DU RECTUM.....	142
TABLEAU 9 : RESULTATS DES DIFFERENTES METRIQUES DE SEGMENTATION DE L'ALGORITHME DE SEGMENTATION PERMETTANT DE DEFINIR LES ZONES DE CAPSULE, CORTEX (FOLLICULES) ET MEDULLAIRE	150
TABLEAU 10. PROTOCOLE D'IMMUNOMARQUAGE SUR AUTOMATE BENCHMARK XT (ROCHE).....	151
TABLEAU 11. CLASSIFICATION TNM DU CANCER DU RECTUM	215

INTRODUCTION

PARTIE I. Le cancer colorectal : focus sur le cancer du rectum

A. Le rectum : anatomie

Le rectum, **partie terminale du tube digestif**, s'étend depuis le côlon sigmoïde auquel il fait suite au niveau de la troisième vertèbre sacrée jusqu'à l'orifice anal (bord supérieur de l'appareil sphinctérien) (Delmas, 2006). Le rectum comprend le rectum péritonéal et le rectum sous péritonéal.

L'ampoule rectale longue de 12 à 14 cm est un segment dilaté du tube digestif qui s'élargit d'abord progressivement de haut en bas à partir de la jonction recto-sigmoïdienne puis se rétrécit progressivement avant la traversé du releveur. Revêtu de péritoine sur la partie supérieure de sa face antérieure et de ses faces latérales, le rectum est dépourvu de péritoine sur toute sa face postérieure et sur la partie inférieure du reste de la circonférence.

Le mésorectum est une entité anatomique correspondant à un tissu périrectal cellulograisieux entourant le rectum sous la ligne de réflexion péritonéale. Il est principalement développé sur les faces latérales et postérieures du rectum. Le **mésorectum contient les ganglions lymphatiques** mais également les branches vasculaires et nerveuses destinées au rectum. Le mesorectum est entouré par le fascia recti. Le fascia recti est séparé du fascia pelvien par un plan quasiment avasculaire (**Figure 1**). L'exérèse totale du mésorectum (TME) décrite par Heald et al. en 1982 utilise une dissection faite dans ce plan (Heald et al., 1982). La dissection dans ce plan, le « holy plane » de Heald, diminue le risque d'ouverture du fascia recti et diminue l'effet de cône qui est une dissection vers le bas se rapprochant progressivement du rectum en laissant latéralement une partie du mésorectum (Nagtegaal et al., 2002).

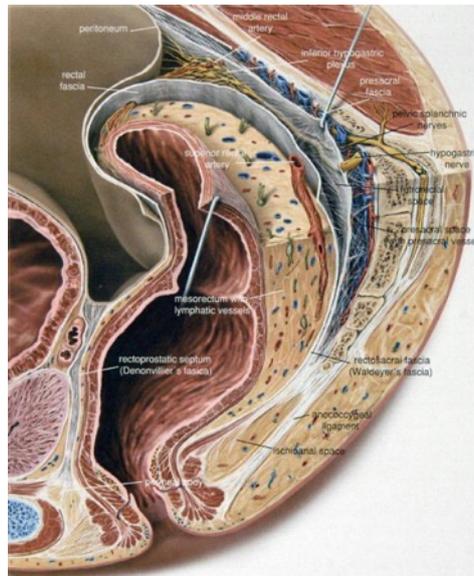


Figure 1. Espaces périrectaux, coupe sagittale du pelvis masculin, vue de gauche. Schunke M, et al. Prometheus LernAtlas der Anatomie, vol. 2. 3rd ed. Stuttgart: Thieme Publ.; 2012

Le rectum se divise **en haut, moyen et bas rectum (Figure 2)**. Les examens les plus fiables pour explorer les différents étages du rectum sont le toucher rectal, la rectoscopie rigide (l'utilisation d'un endoscope souple expose à de nombreuses erreurs en pratique), l'échographie endo-rectale et l'IRM. L'examen TDM est moins performant que l'IRM pour visualiser la tumeur.

Dans le cas d'une tumeur du rectum le siège de la tumeur est défini à partir de son pôle inférieur :

- **bas rectum** : 0 à 5 cm de la marge anale ou à 2 cm ou moins du bord supérieur du sphincter, localisation périnéale.
- **moyen rectum** : > 5 à 10 cm de la marge anale ou > 2 à 7 cm du bord supérieur du sphincter, partie qui descend jusqu'au bord supérieur des muscles releveurs de l'anus et qui est sous-péritonéale.
- **haut rectum** : > 10 à 15 cm de la marge anale ou à plus de 7 cm du bord supérieur du sphincter, situé au-dessus du cul-de-sac de Douglas.
- **jonction rectum-sigmoïde** : > 15 cm ou au-dessus du corps de la 3^{ème} vertèbre sacrée.

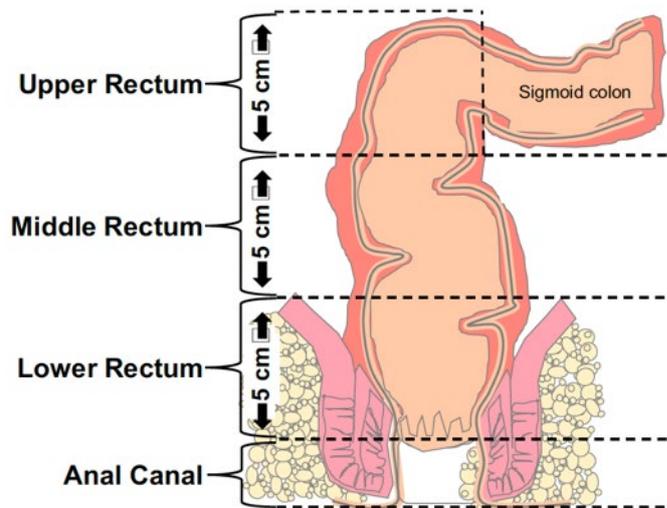


Figure 2. Le rectum se divise en 3 parties : haut, moyen et bas rectum (Oronsky et al. 2020)

Ces considérations anatomiques ont leurs importances dans la prise en charge des cancers du rectum, car la position exacte de la tumeur détermine la stratégie thérapeutique (mise en place d'un traitement néoadjuvant, le type de chirurgie, les possibilités de conservation sphinctérienne...).

B. Epidémiologie du cancer du rectum

Le **cancer colorectal (CCR) est le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes**, représentant près de 10% des tumeurs (Ferlay et al., 2018a). En 2018, dans le monde environ 1,8 millions de nouveaux cas de CCR ont été diagnostiqués et 881 000 décès associés au CCR ont été rapportés (Bray et al., 2018). Il s'agit de la seconde cause de décès par cancer dans la société occidentale (Ferlay et al., 2018b).

Dans environ **un tiers des cas, le cancer colorectal est localisé au niveau du rectum** (Brenner et al., 2012). En Europe, environ 100 000 nouveaux cas de cancers du rectum sont diagnostiqués par an. En France, l'incidence des cancers du rectum est voisine de 15 000 nouveaux cas par an. **Tous stades confondus, la probabilité de survie à 5 ans est d'environ 55%** (Allemani et al., 2018; Bouvier and Launoy, 2015). Le cancer du rectum expose non seulement à une diffusion métastatique (hépatique et pulmonaire principalement) mais aussi à des récives locales très invalidantes et en général non résécables.

Bien que **l'incidence du CCR augmente rapidement dans de nombreux pays à revenu faible et intermédiaire, elle s'est stabilisée ou a diminué dans de nombreux pays à revenu élevé**, dont l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les États-Unis et plusieurs pays d'Europe occidentale (Arnold et al., 2017; Siegel et al., 2020). Cette baisse de l'incidence, qui s'explique par une diminution de la fréquence de la maladie chez les personnes âgées de 50 ans ou plus, a été largement attribuée à la mise en œuvre de **programmes de dépistage des polypes précancéreux**, bien que d'autres facteurs aient pu y contribuer (**Figure 3**).

Des données récentes suggèrent cependant que **l'incidence du CCR augmente sensiblement chez les jeunes adultes (<50 ans)** (Araghi, 2019; Vuik et al., 2019). D'après l'étude de Vuik et al. publiée en 2019, en moyenne l'incidence du CCR a augmenté entre les années 2004 et 2016 de 7,9% par an chez les adultes de 20-29 ans, de 4,9% chez les 30-39 ans (2005-2016) et de 1,6% chez les 40-49 ans (Vuik et al., 2019). Les mêmes observations ont été faites par l'équipe de Araghi et al. (Araghi, 2019). Les causes de cette augmentation ne sont pas encore établies mais plusieurs hypothèses sont retenues, notamment l'augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les jeunes adultes, la consommation de viande rouge, de viande transformée, l'alcool, le tabagisme, la cuisson de la viande à haute température, la consommation de graisses alimentaires, et la diminution de l'activité physique et de la consommation de fibres alimentaires (Huxley et al., 2009).

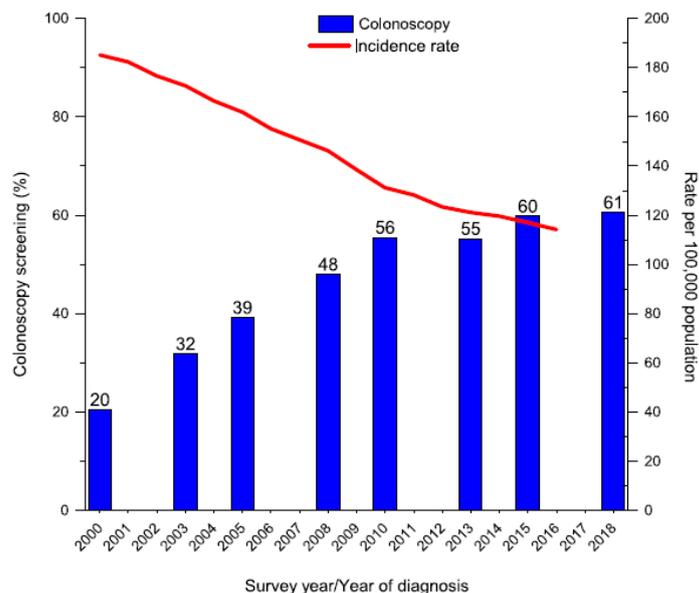


Figure 3. Tendances de la prévalence de la coloscopie (2000-2018) et des taux d'incidence des cancers colorectaux (2000-2016), chez les adultes de plus de 50 ans aux États-Unis. (Siegel et al., 2020)

C. Diagnostic du cancer du rectum

Le diagnostic du cancer du rectum se fait soit devant des **signes cliniques évocateurs** soit dans le **cadre du dépistage organisé du CCR** par la recherche de sang occulte dans les selles par un test immunologique tous les deux ans entre 50 et 74 ans. Dans la population à risque le dépistage est alors individuel et implique une consultation spécialisée et des examens plus approfondis (**Tableau 1**)

	Moyen	Élevé	Très élevé
Personnes concernées	Population générale <ul style="list-style-type: none"> • 50 à 74 ans. • asymptomatique. 	Antécédents personnels de maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) <ul style="list-style-type: none"> • Maladie de Crohn colique. • Rectocolite hémorragique. Antécédents d'adénome* ou de CCR <ul style="list-style-type: none"> • Personnel. • Familial (1^{er} degré). 	Prédisposition héréditaire <ul style="list-style-type: none"> • Polyposes adénomateuses familiales (PAF). • Cancer colorectal héréditaire non polyposique (syndrome de Lynch).
Stratégie de dépistage	Dépistage organisé <ul style="list-style-type: none"> • Test de recherche de sang occulte dans les selles (tous les 2 ans). 	Dépistage individuel <ul style="list-style-type: none"> • Consultation gastro-entérologique/ suivi spécialisé. • Coloscopie*/Chromoendoscopie**. 	Dépistage individuel <ul style="list-style-type: none"> • Consultation oncogénétique (recherche mutation). • Consultation gastro-entérologique. • Chromoendoscopie**.

Tableau 1 Stratégies de dépistage du CCR en France

Plusieurs examens complémentaires sont indispensables dans le cadre du diagnostic de CCR : la coloscopie, l'IRM rectal et le TDM thoraco-abdomino-pelvien.

La coloscopie totale sous anesthésie générale complétée par une rectoscopie rigide permet de **réaliser des prélèvements biopsiques multiples** (au moins 9) **d'une lésion suspecte pour examen anatomopathologique, essentiel au diagnostic de cancer.** Ces prélèvements biopsiques réalisés après préparation colique à base de PEG (polyéthylèneglycol ou macrogol) ou de laxatifs osmotiques vont constituer **les premiers échantillons disponibles pour une évaluation de la tumeur et de son microenvironnement avant tout traitement néoadjuvant ou chirurgie.** Plusieurs études ont montré l'efficacité et la sécurité de la préparation intestinale (Saltzman et al., 2015), cependant cette préparation est susceptible de modifier l'écosystème colique. Des études récentes ont montré que cette préparation colique induisait une **modification du microbiome intestinal et des métabolites** (Drago et al., 2016; Mai and Stine, 2015; Nagata et al., 2019; O'Brien et al., 2013). Aucune étude n'a analysé l'impact de cette préparation colique sur le microenvironnement tumoral notamment sur la composition des infiltrats tumoraux.

La coloscopie permet également de mesurer la lésion, de rechercher une extension circonférentielle, la distance entre le pôle inférieur de la lésion et la marge anale (rectoscopie rigide). **L'IRM pelvienne** est l'examen de référence et doit être systématique. Elle conditionne la suite de la prise en charge personnalisée en établissant un bilan d'extension locorégional, l'évaluation de la « résécabilité » tumorale et le choix du traitement néoadjuvant. Le bilan d'extension comporte également la recherche de métastases à distance, hépatiques et pulmonaires par un scanner thoraco-abdominal. Ainsi, le bilan pré-thérapeutique permet d'établir une classification **cTNM** de la tumeur, et conditionne la prise en charge thérapeutique.

Cette classification **cTNM** sera complétée par la classification **ycTNM**, dans les cancers du rectum localement avancés où un traitement néoadjuvant par radiochimiothérapie (nRCT) est instauré. Cette évaluation réalisée en imagerie renseigne sur la qualité de la réponse locale au traitement néoadjuvant et s'assure de l'absence d'évolution métastatique durant le traitement néoadjuvant. Enfin, la classification finale **pTNM** ou **ypTNM** (si traitement néoadjuvant) est établie, selon l'analyse anatomopathologique de la pièce opératoire.

Il est à noter qu'un très faible nombre de paramètres biologiques systémiques ou issus de l'analyse de la tumeur ou de son microenvironnement est requis pour élaborer une stratégie thérapeutique.

Il s'agit de réaliser la recherche d'un déficit réparation de mésappariement de l'ADN (dont l'instabilité microsatellitaire (MSI) est la conséquence) effectuée aussi bien par biologie moléculaire que par immunohistochimie (détection des protéines hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2), les deux méthodes étant à la fois complémentaires et très bien corrélées (Bibeau et al., 2012; Dedeurwaerdere et al., 2021), bien qu'une **instabilité des microsatellites (MSI ou dMMR) soit beaucoup plus rare dans les cancers du rectum (1 à 3%) que dans les cancers du côlon (15%)**. L'étude des mutations de *RAS* et *BRAF* sont utiles en cas de maladie métastatique (Allegra et al., 2009).

D. Prise en charge thérapeutique

Au cours des vingt dernières années, la **prise en charge du cancer du rectum a beaucoup évolué** du point de vue de l'investigation clinique mais également thérapeutique. Les éléments clés de ces modifications sont les améliorations de la stadification préopératoire, de la technique chirurgicale, de l'évaluation histopathologique de la pièce réséquée et de la combinaison de traitements multimodaux pour améliorer les résultats à long terme.

La prise en charge du cancer du rectum dépend du siège de la tumeur, du stade cTNM établi après l'examen clinique, les examens radiologiques complémentaires (echo-endoscopie, IRM) et du bilan d'extension pré-thérapeutique. Elle repose également sur l'opérabilité du patient. La prise en charge du cancer du rectum dépend également du pays, dans tous les cas une **approche multidisciplinaire** doit être privilégiée car elle offre de meilleures possibilités de contrôle de la maladie (Valentini et al., 2009). Les dernières recommandations européennes en terme de prise en charge du cancer du rectum datent de 2012 suite à la conférence internationale « Multidisciplinary Rectal Cancer Treatment: looking for a european consensus » (EURECCA-CC2) (Valentini et al., 2009) et en 2017 par l'ESMO (Glynne-Jones et al., 2017).

Ainsi, pour les **cancers très précoces** (cT1 sm1, N0, cf *Annexes*) l'option thérapeutique privilégiée est l'**exérèse locale** par voie trans-anales, d'autres options thérapeutiques telles que la résection du rectum avec conservation du sphincter ou une radiothérapie de contact associée ou non à une radiothérapie externe peuvent être envisagées.

Pour les **tumeurs précoces** (T1 sm2-3, T2N0 ou mrT3 a-b N0, < 4cm) le risque métastatique est considéré comme faible, le traitement standard est la résection antérieure du rectum pour les T2 et T3 a-b du haut rectum et pour les T2 du moyen et du bas rectum. **Un traitement néoadjuvant total** (radiochimiothérapie néoadjuvante (nCRT) puis chimiothérapie adjuvante) est prescrit pour les patients présentant une tumeur T3.

Pour les **tumeurs localement avancées** (T3-4 et/ou N+) un traitement néoadjuvant total (TNT) est le **traitement de référence associant chimioradiothérapie néoadjuvante puis une chimiothérapie adjuvante suivant l'exérèse complète du mésorectum par TME**.

1) Le traitement de référence

L'exérèse par TME (Total Mesorectal Excision) a longtemps été le traitement de référence dans le cancer du rectum (Heald, 1979). Depuis 2004, **la radiochimiothérapie néoadjuvante (nRCT) avec 5-fluorouracile (5-FU) a été adoptée comme traitement de référence en complément de la chirurgie** dans le cas des cancers du rectum localement avancés. En effet, l'essai clinique allemand de phase 3 sur le cancer du rectum CAO/ORO/AIO-94 (Sauer et al., 2003) et deux autres essais de confirmation (Bosset et al., 2005; Gerard, 2006), ont montré la supériorité de la nRCT par rapport à la RCT adjuvante. La radiothérapie peut être administrée soit en cure courte (« short course radiotherapy », SCRT 25 Gy en 5 fractions), soit en cure

longue (« long course radiotherapy », LCRT 45-50 Gy en 25 fractions) avec une chimiothérapie concomitante.

La nRCT induit une diminution de la taille tumorale associée à une augmentation du taux de résécabilité, une augmentation du taux de conservation sphinctérienne et une amélioration secondaire de la qualité de vie des patients (Bosset et al., 2005; Wichmann et al., 2002).

La nRCT a permis d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de cancer du rectum en augmentant la préservation sphinctérienne ainsi qu'un bon contrôle local de la maladie, malheureusement sans bénéfice sur la survie (Cammà et al., 2000; Kapiteijn et al., 2001, 1997).

2) Place de la chimiothérapie adjuvante et de la thérapie néoadjuvante totale (TNT)

L'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante afin d'éradiquer toute micro-métastase est encore sujette à débat (Boustani et al., 2016; Minsky, 2019; Turner et al., 2019). Les recommandations actuelles du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Benson et al., 2020) préconisent -dans le cadre d'un cancer du rectum localement avancé- une **chimiothérapie adjuvante après une nRCT et une chirurgie radicale**, en se basant principalement sur des preuves extrapolées à partir d'études sur le cancer du côlon (Group, 2007; QUASAR Collaborative Group, 2007; Taal et al., 2001). Cependant, **l'évolution clinique et la biologie des tumeurs du côlon et du rectum diffèrent considérablement**. Par conséquent, l'extrapolation de la chimiothérapie adjuvante dans le cancer du rectum doit être considérée comme une entité distincte (Milinis et al., 2015). Parmi les cinq essais européens récents (CHRONICLE, QUASAR, EORTC 22921, PROCTO-SCRIPT, I-CNR-RT), **un seul (QUASAR) a trouvé une augmentation significative de la survie dans le groupe chimiothérapie adjuvante. Plusieurs méta-analyses n'ont pas mis en évidence de différences en termes de survie sans récurrence (DFS) et de survie globale (OS) en présence de traitement adjuvant** (Breugnot et al., 2015; Bujko et al., 2015), laissant l'option du traitement adjuvant toujours en débat.

Afin d'optimiser le schéma de traitement pour améliorer la DFS et l'OS des patients, plusieurs petits essais ont testé une **approche de "thérapie néoadjuvante totale" (TNT)** dans laquelle une chimiothérapie d'induction systémique précède la nCRT et la résection (Cercek et al., 2014; Fernandez-Martos et al., 2015; Maréchal et al., 2012; Nogué et al., 2011; Perez et al., 2017).

Cette option, pourrait être bénéfique dans la prévention ou l'éradication précoce des micrométastases, induire une réponse clinique pathologique (pCR) plus élevée (Petrelli, 2020), et faciliter l'acte chirurgical. Un inconvénient potentiel de cette approche intensive est la possibilité de sur-traiter un patient avec un cancer du rectum de stade II à faible risque. De grands essais de confirmation sont nécessaires avant de formuler une recommandation forte en faveur de la TNT.

3) Curiethérapie à haute dose et RT de contact

Différents moyens permettant d'intensifier le traitement préopératoire notamment par différentes options de radiothérapie sont en cours d'évaluation (Tam and Wu, 2019). La **curiethérapie endorectale (ou brachythérapie)** permet d'augmenter la dose de rayonnement au niveau de la tumeur. Un essai de phase III a montré que la curiethérapie était réalisable sans augmentation de la toxicité (Jakobsen et al., 2012). Une dose d'irradiation de 60 Gy plus un « boost » endorectal de 5 Gy sur la tumeur ont permis d'obtenir une réponse clinique complète (RCC) chez 78 % des patients, un taux plus élevé que celui rapporté dans les essais avec la dose d'irradiation traditionnelle (Appelt et al., 2015).

Une autre option est la **radiothérapie de contact (CXRT)** (Gerard et al., 2004; Gérard, 2019; Gérard et al., 2011), popularisée par Jean Papillon à Lyon (France) qui a utilisé un appareil à rayons X portable de 50 kV. Avec cette technique, une préservation d'organe a été obtenue chez 62 % des patients; 11 % des patients ont présenté une récurrence locale, contre 30 % après une chimioradiothérapie classique (Sun Myint et al., 2017). **L'approche CXCRT a le potentiel de réduire la dose délivrée aux tissus sains et ainsi diminuer la toxicité.** Elle est principalement utilisée dans le cadre d'un traitement adjuvant après une excision locale chez les patients pour lesquels une chirurgie radicale n'est pas indiquée en raison de l'âge ou d'un mauvais état général.

4) Nouvelles options thérapeutiques : l'immunothérapie

Si l'**immunothérapie** a permis des améliorations considérables dans de nombreux cancers, tels que le mélanome (Ott et al., 2013) ou le carcinome pulmonaire non à petites cellules (NSCLC) (Ettinger et al., 2019), **cette option thérapeutique est en cours d'évaluation dans les CCR.** Les immunothérapies actuelles, qui ciblent PD-1 ou PD-L1 ou CTLA-4, ont

l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les tumeurs solides avec instabilités microsatellitaires. La **présence d'une instabilité microsatellitaire confère en effet une sensibilité particulière aux immunothérapies**. Dans les CCR, l'utilisation des immunothérapies s'est principalement limitée aux **stades métastatiques** où de bonnes réponses ont pu être observées surtout chez les patients présentant un statut MSI+ (Le et al., 2015; Overman et al., 2018). Très récemment, l'essai de phase III (KEYNOTE-177), a montré la **supériorité du pembrolizumab par rapport à une chimiothérapie standard chez les patients atteints de CCR métastatique MSI** (survie sans progression 16.5 mois vs 8.2 mois) (André et al., 2020).

Bien que la grande majorité des cancers du rectum aient un statut microsatellitaire de type MSS (Microsatellite stable) le traitement néoadjuvant -traitement de référence dans les cancers du rectum localement avancés-, fournit un argument pour évaluer les immunothérapies chez les patients atteints d'un cancer du rectum localement avancé (LARC) avec statut MSI ou MSS. En effet, la radiothérapie (Dovedi et al., 2017) et la chimiothérapie (Teng et al., 2015a) prescrites en néoadjuvant entraînent des modifications au niveau de l'ADN et au niveau cellulaire entraînant une exposition de néoantigènes et ainsi une réponse lymphocytaire. La **nRCT pourrait ainsi « amorcer » le microenvironnement tumoral et en l'associant à l'immunothérapie renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte**. Une étude récente (Chalabi et al., 2020) suggèrent qu'instaurer un traitement néoadjuvant par immunothérapie (anti PD-1 ou combo) chez des patients atteints de stades précoces (I-III) de cancer du côlon, induit un taux de réponse pathologique (régression de la tumeur sur la pièce opératoire) de 100% chez les patients MSI et 27% chez les MSS. Ceci pourrait changer la prise en charge des cancers colorectaux de stade précoces en instaurant une immunothérapie avant chirurgie ou en ajoutant une composante immunothérapique au traitement néoadjuvant par radiochimiothérapie des cancers du rectum.

5) Nouvelles options thérapeutiques : exérèse locale et stratégie Watch and Wait

La radiochimiothérapie néoadjuvante (nRCT) peut avoir un effet substantiel sur la mort des cellules tumorales dans le cancer du rectum, comme en témoignent les 20 % de patients qui obtiennent une réponse pathologique complète (pCR) sur la pièce opératoire (Habr-Gama et al., 2005; Weiser et al., 2014). Chez ces patients, le faible taux de récurrence locale et les

excellents résultats en termes de survie ont fait émerger plusieurs stratégies de désescalade thérapeutiques afin de tenter de préserver l'organe et améliorer la qualité de vie des patients. Une stratégie **d'exérèse locale après radiochimiothérapie**, constitue une première option de traitement. L'essai de phase 3 GRECCAR 2 comparant une exérèse locale (EL) à l'exérèse totale du mésorectum (TME) chez les patients bons répondeurs après chimioradiothérapie (Rullier et al., 2017, 2020), a montré que les petites tumeurs seraient de bonnes candidates et que cette stratégie n'induisait pas plus de récurrences locales/à distance à 5 ans. Les études actuelles incluent des patients avec tumeurs rectales de petites tailles (< 4 ou 5 cm) et testent différentes modalités d'intensification thérapeutique avec un objectif de préservation rectale. L'étude de phase 3 GRECCAR 12 (NCT02514278) qui fait suite à l'essai GRECCAR 2, compare deux bras de traitement néoadjuvant (nRCT seule vs TNT), le but de cet essai est d'évaluer si une intensification du traitement néoadjuvant permet de réaliser une conservation d'organe (exérèse locale) à un plus grand nombre de patient, les patients inclus doivent avoir au diagnostic une tumeur de stade cT2-3Nx de moins de 4cm.

Dans l'essai de phase 3 OPERA (NCT02505750) qui comporte une augmentation de la dose d'irradiation grâce à l'utilisation de la contact-thérapie (chez des patients cT2-3Nx, <5 cm) l'excision locale ou une stratégie de surveillance (Watch and Wait) sont envisagées en cas de réponse clinique complète observée.

L'autre option envisagée par certaines équipes est la "**stratégie Watch & Wait**" (W&W), c'est-à-dire une gestion non-opératoire du cancer du rectum localement avancé présentant une réponse clinique complète après nCRT, afin d'éviter une chirurgie inutile, associée à une mortalité et une morbidité significative, avec des séquelles fonctionnelles urinaires, digestives (à type d'incontinence) et sexuelles sévères. Plusieurs études monocentriques ont suggéré qu'une identification précise des patients ayant obtenu une réponse clinique complète (CCR) pourrait permettre de proposer à ces patients cette stratégie non opératoire (Habr-Gama et al., 2004; Habrgama et al., 2006; Habr-Gama et al., 2009; Maas et al., 2011; on behalf of the Rectal Cancer Consortium et al., 2015). Cependant, la question de la sélection des répondeurs cliniques complets est toujours en cours d'évaluation (Huisman et al., 2020; López-Campos et al., 2020; van der Valk et al., 2018).

Dans le but de générer des données robustes, un registre international regroupant tous les centres incluant des patients dans une stratégie de « Watch and Wait » a été mis en place : la IWWD (International Watch and Wait Database). Des données de plus de 800 patients

répondeurs complets à la nRCT ont été inclus dans ce registre et rapportées (van der Valk et al., 2018). Le taux de récurrence locale à deux ans était de 25,2%, avec un suivi médian de 39,6 mois. La majorité (88%) de ces récurrences locorégionales sont survenues dans les 2 ans suivant la fin du traitement et 97% d'entre elles se trouvaient au niveau de la paroi rectale. Les taux de survie globale à 5 ans étaient de 85%. Ce taux de récurrence locale de plus de 20% a été confirmé dans une méta-analyse portant sur près de 700 patients (Dattani et al., 2018).

Au total, la stratégie de préservation rectale après réponse complète ou quasi-complète après chimioradiothérapie reste en cours d'évaluation. Les résultats encourageants des études suggèrent que cette stratégie est applicable en centre expert chez des malades sélectionnés, en présence :

- d'importantes comorbidités, empêchant une chirurgie radicale plus lourde ou de refus d'une chirurgie plus radicale.
- d'une excellente réponse à la chimioradiothérapie pour des tumeurs très bas situées nécessitant initialement une amputation abdomino-périnéale.

La stratégie non-opératoire est un domaine d'investigation actif et controversé, puisque la détermination des répondeurs cliniques complets est toujours en attente d'un outil solide et robuste permettant de prédire le taux de réponse à la nRCT. Actuellement, la définition de la réponse clinique complète est basée sur des **critères essentiellement radiologiques** (rectoscopie, IRM) et sur l'évaluation clinique par le toucher rectal (Glynne-Jones et al., 2017; Maas et al., 2015).

De **nouveaux biomarqueurs prédictifs de bonne réponse à la nRCT et de non-rechute** sont désormais essentiels afin de proposer cette stratégie de préservation d'organe avec un risque de rechute faible pour le patient.

Ainsi, les stratégies thérapeutiques du cancer du rectum en évaluation proposent des alternatives à type de renforcement thérapeutique ou à type de désescalade suivant le degré d'extension de la tumeur et sa sensibilité au traitement néoadjuvant. Ces stratégies nécessitent d'être guidées par de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la qualité de la réponse à la nRCT.

6) Évaluation de la réponse au traitement néoadjuvant et biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement

La réponse au traitement néoadjuvant dans les cancers du rectum est très variable d'un individu à un autre. Environ **10 à 20% des patients ayant un cancer du rectum localement avancé ont une réponse pathologique complète** évaluée sur la pièce opératoire. Ces patients pourraient bénéficier de la stratégie de préservation d'organe (Watch and Wait) sans sur risque (Habr-Gama et al., 2004). L'identification de ces patients en amont de tout traitement est depuis quelques années au centre de nombreuses recherches. La capacité de prédire quels patients bénéficieront de la nRCT permettrait d'améliorer la stratification des patients en orientant les patients susceptibles d'obtenir une bonne réponse vers une stratégie de conservation d'organe, ou vers une intensification de la nRCT avec une chimiothérapie d'induction - par exemple- chez les patients peu susceptibles de répondre au traitement standard.

Certains paramètres cliniques comme le stade TNM, la taille de la tumeur, la dose et le type de radiothérapie ainsi que la période entre la fin de la radiothérapie néoadjuvante et la chirurgie ont été décrit comme des facteurs influençant le degré de réponse à la radiochimiothérapie.

Bien que l'IRM morphologique soit l'examen de référence pour évaluer le degré de réponse post-nRCT, la différence entre une fibrose stérilisée de toutes cellules tumorales vs une fibrose contenant encore des cellules tumorales n'est aujourd'hui pas possible, limitant ainsi le diagnostic certain de réponse complète (Lambregts et al., 2019). L'analyse des signaux de diffusion en IRM ou l'IRM fonctionnelle paramétrique pourraient permettre de mieux distinguer les patients bons réponders (Haak et al., 2020). Cependant il s'agit de technologies coûteuses et difficilement accessibles. La possibilité de désescalade thérapeutique a ouvert la voie à la **recherche de biomarqueurs** (tissulaires ou sanguins) accessibles et peu coûteux permettant de stratifier les patients en fonction du degré de réponse à la nRCT et permettant de sélectionner les patients réponders complets pour les adresser vers une stratégie de préservation d'organe (Dayde et al., 2017).

Plusieurs biomarqueurs moléculaires dans les tissus tumoraux ont été décrits comme étant associés à la réponse pathologique.

L'évaluation pronostique et théranostique de l'expression de l'EGFR et du statut mutationnel des protéines impliquées dans la voie MAPK/ERK et PI3K/AKT/mTOR a fait l'objet de plusieurs publications. Sur des biopsies diagnostiques -avant tout traitement- de patients atteints d'un cancer du rectum, une expression plus forte des transcrits de l'EGFR était observée chez les patients non répondeurs au traitement (Toiyama et al., 2010). Une étude en immunohistochimie de l'expression de l'EGFR au niveau des biopsies diagnostiques avait montré que seul l'EGFR était un facteur associé au degré de réponse à la nRCT ; 23% des patients EGFR négatifs présentaient une réponse pathologique complète comparé à 4% chez les patients EGFR positifs (Giralt et al., 2005).

Le rôle du gène suppresseur de tumeur p53 dans l'évaluation de la réponse au traitement néoadjuvant est aujourd'hui controversé, en effet les données de la littérature se contredisent : certaines études suggérant qu'une expression nucléaire augmentée de p53 était associée à une radorésistance (Adell et al., 1999), d'autres suggérant que l'expression de p53 était associée à une bonne réponse au traitement néoadjuvant (Chen et al., 2011; Nam et al., 2010). Une méta-analyse rassemblant les données de 1830 patients atteints de cancer du rectum provenant de 30 études publiées, a montré que le statut p53 sauvage était associé à une bonne réponse pathologique (Chen et al., 2012).

Le taux d'ACE (antigène carcinoembryonnaire) sanguin a largement été étudié comme marqueur pronostique et comme marqueur de réponse à la nRCT (Ghadimi, 2005, 2005; Lopes-Ramos et al., 2015; Palma et al., 2014). **Le taux d'ACE, en pré-traitement ou post-nRCT s'est avéré être un facteur associé à la régression tumorale et à la réponse pathologique complète.** Ainsi, l'ACE semble être un marqueur utile à la fois pour la prédiction de la réponse au traitement et pour l'évaluation pronostique, cependant une standardisation des seuils à partir desquels l'ACE devient prédictif demeure nécessaire.

L'activation de la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle important dans les effets thérapeutiques de la nRCT (Sharabi et al., 2015). Plusieurs équipes ont évalué les effets prédictifs et pronostiques du microenvironnement tumoral dans le cancer du rectum traité par nCRT. Ainsi, une forte infiltration en T CD8⁺ a été associée à une bonne réponse au traitement néoadjuvant dans plusieurs études. En 2011, Yasuda et al. ont rapporté dans les cancers du rectum, qu'une forte densité en CD8⁺ et CD4⁺ évaluée par immunohistochimie sur les biopsies avant traitement était corrélée à une réduction de la taille tumorale et à une amélioration du grade histologique (Yasuda et al., 2011). Ces résultats ont été validés dans d'autres études : de fortes densités en CD3⁺ et CD8⁺ sur les biopsies avant traitement néo-

adjuvant étaient associées à une bonne réponse au traitement (Huang et al., 2019; Teng et al., 2015a). Cependant, certaines études ne retrouvaient pas cette association (McCoy et al., 2017; Mirjolet et al., 2018)

Il est donc essentiel de disposer d'un test standardisé d'évaluation du microenvironnement tumoral.

Au total, à ce jour, aucun biomarqueur prédictif n'a été suffisamment robuste pour stratifier les patients en fonction de leur degré de réponse à la nRCT. L'intégration de divers types de biomarqueurs, des caractéristiques clinico-pathologiques et d'imagerie, pourrait permettre le développement d'un biomarqueur moléculaire robuste et rentable dans le cancer du rectum. Ce « score » faciliterait un traitement personnalisé, en évitant aux patients non répondeurs un traitement inefficace et permettant de proposer aux patients bons répondeurs une désescalade chirurgicale.

PARTIE II. Le microenvironnement tumoral : rôle du système immunitaire dans les cancers

A. Acteurs de l'immunité anti-tumoral

1) Les débuts de l'immunocancérologie : un rappel historique

La notion selon laquelle le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance et l'éradication des cellules cancéreuses n'est pas récente.

En 1891, il fut rapporté pour la première fois le succès de l'immunothérapie par William Coley (1862-1936), médecin du Memorial Sloan Kettering Cancer Institute à New York. Jeune interne de chirurgie, une de ses premières patientes fut Bessie Dashiel, 17 ans, qui mourut en moins de 10 semaines d'un sarcome d'Ewing malgré l'amputation du bras atteint. Ceci affecta profondément Coley, il se mit alors à relire tous les dossiers de patients atteints de tumeurs similaires. Son attention se porta sur un dossier datant de 1883 (7 ans avant Bessie Dashiel) d'un patient atteint d'un sarcome du cou inopérable qui semblait avoir disparu après que le patient eut développé un érysipèle. Le patient fut renvoyé chez lui sans tumeur résiduelle. Coley retrouva le patient. Celui-ci, encore vivant, n'avait aucune trace de tumeur résiduelle (McCarthy, 2006). Après des recherches, Coley fut convaincu qu'une infection sévère pouvait entraîner la régression voire la guérison d'un cancer. En 1891 (il y a 130 ans), il injecta pour la première fois une patiente avec une souche de Streptocoque et observa une régression de la tumeur. Il répéta cela chez 2 autres patients qui moururent de choc septique, cependant il constatait à chaque fois une diminution tumorale (Coley, 1891). Par la suite, il injecta à ses patients une combinaison de bactéries tuées par la chaleur (*Serratia marsecens* et *Streptococcus pyogenes*), connue sous le nom de toxine de Coley. A la fin de sa carrière, Coley avait pris en charge plus de 1000 patients avec un taux de guérison de 10% dans les tumeurs osseuses et sarcomes inopérables (Coley, 1891; Jacob Bickels et al., 2002; Wiemann and Starnes, 1994).

Aujourd'hui, 130 ans plus tard, ce principe est encore d'actualité (Guallar-Garrido and Julián, 2020; Redelman-Sidi et al., 2014). En effet, la BCG thérapie intravésicale est une biothérapie encore utilisée dans la prévention des récurrences des tumeurs superficielles de vessie.

2) La théorie de l'immunosurveillance

L'immunosurveillance est une théorie selon laquelle le système immunitaire à la fois inné et adaptatif est capable de reconnaître et détruire les cellules tumorales à l'origine d'une néoplasie. Ce fut en 1909 que Paul Ehrlich (1854-1915) postula pour la première fois le concept d'immunosurveillance. En effet, pour lui les cellules « mutantes » générées en permanence ont besoin des cellules du système immunitaire -véritable patrouille- pour être éradiquées avant l'apparition de manifestations cliniques (Ehrlich, 1909, 1957). Ce postulat sous-entendait l'existence d'antigènes spécifiques de tumeur. Cette affirmation ouvrit alors plus d'un siècle de débats autour du contrôle immunologique des tumeurs.

Il fallut attendre la moitié du XX^{ème} siècle pour que Sir Macfarlane Burnet (Burnet, 1957) et Lewis Thomas (Thomas, 1959) fassent le lien entre la régression tumorale et la réponse immunitaire. En 1970, fut alors théorisé **le concept d'immunosurveillance** anti-tumorale par Burnet (Burnet, 1970, 1964) dans lequel les lymphocytes auraient un rôle de sentinelle à la fois dans la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses.

Dans les années 1960, Lloyd John Old (1933-2011) (L J Old and Boyse, 1964) et Georges Klein (1925-2016) (Klein, 1966) démontrèrent que des souris pouvaient être immunisées contre des tumeurs syngéniques induites par divers carcinogènes théorisant ainsi l'existence d'antigènes associés à la tumeur (TAA).

Dans les années 1990, le développement de souris déficientes pour les différentes populations immunitaires et celui des anticorps monoclonaux a permis de valider le concept d'immunosurveillance anti-tumorale. RAG-1 et RAG-2 sont des enzymes de recombinaison exprimées exclusivement dans les lymphocytes. Elles sont essentielles pour le réarrangement du TCR et du BCR. Après injection d'un carcinogène chimique, le MCA (3-méthylcholanthrène), les souris KO RAG2^{-/-} développent des tumeurs plus rapidement et à une plus grande fréquence que les souris contrôles sauvages (Shankaran et al., 2001). De plus, 100% des souris RAG2^{-/-} développent des tumeurs spontanées. Ainsi, les lymphocytes préviennent non seulement la formation de tumeurs induites par un carcinogène, mais aussi la formation de tumeurs spontanées. Par la suite, plusieurs souris KO pour les différentes sous-populations lymphocytaires cytotoxiques ont montré une susceptibilité accrue au

développement de tumeurs après injection de MCA (Crowe et al., 2002; Dunn et al., 2006; Gao et al., 2003; Girardi et al., 2003; Smyth et al., 2001).

Qu'en est-il chez l'Homme ?

Dès les années 70, des études de suivi de patients greffés sous immunosuppresseurs (Penn et al., 1971) ou de patients atteints d'un déficit immunitaire primaire (Gatti and Good, 1971) ont montré un risque relatif de développer un cancer plus important chez ces patients par rapport à la population générale. Ces cancers sont le plus souvent secondaires à une infection virale telle que les infections par EBV ou HHV8 (Penn, 1999).

a) Le concept d'« immunoediting »

La présence de tumeurs malignes chez l'Homme en l'absence d'immunodépression suggère l'existence de mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire.

Ainsi, le concept d'« **immunoediting** » et ses trois composantes (les **3 « E »: Élimination, Équilibre et Échappement**) a été proposé au début des années 2000 par R. Schreiber afin d'expliquer les interactions complexes entre les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses conduisant à la suppression du cancer ou à son évolution influencée par la composante immune (**Figure 4**) (Dunn et al., 2002, 2004; Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011). Ainsi, l'histoire naturelle du cancer implique des interactions entre la tumeur et les mécanismes de défense de l'hôte.

L'« immunosurveillance » des tumeurs (Burnet, 1957; Schreiber et al., 2011), un concept selon lequel le système immunitaire peut reconnaître et éliminer les tumeurs primaires en développement, est maintenant démontré après des décennies de controverse.

Lorsque l'**élimination (i)** de la tumeur est incomplète, un état **d'équilibre (ii)** temporaire se met en place. Cet équilibre transitoire qui met en jeu des acteurs immunitaires et des modifications du comportement de la cellule tumorale (p.ex. dormance (Aguirre-Ghiso, 2007; Páez et al., 2012), peut se prolonger pendant de nombreuses années. Ceci pourrait expliquer l'émergence très tardive (plusieurs dizaines d'années après la tumeur primaire) de métastases de mélanomes ou de cancers du sein (Avril et al., 1994; Meltzer, 1990; Tsao et al., 1997).

La pression sélective exercée par les cellules immunitaires favorise l'émergence de clones tumoraux ayant acquis un mécanisme d'échappement à la reconnaissance. Ces clones ont accumulé des anomalies génétiques. De plus, les lymphocytes subissent un épuisement progressif (exhaustion) secondaire à une stimulation antigénique chronique, par absence

d'éradication de la composante tumorale. À ce stade, le système immunitaire n'est plus capable de contenir la croissance de la tumeur, cette phase d'**échappement (iii)** conduit à des tumeurs malignes cliniquement détectables (Dunn et al., 2004).

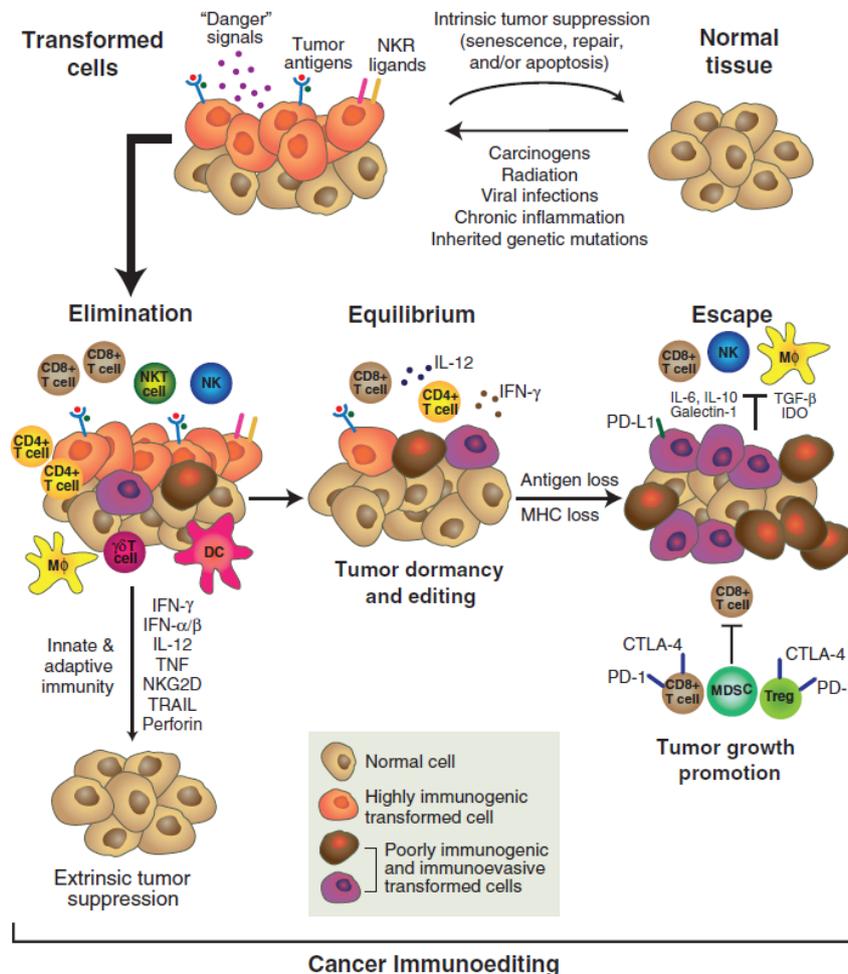


Figure 4. Immunoediting du cancer : rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. *Science*. 2011

Dans les années 90, l'**identification et la caractérisation moléculaire des premiers antigènes associés aux tumeurs (TAA) chez l'Homme** par l'équipe du Professeur Thierry Boon à Bruxelles ont constitué une étape décisive pour la compréhension de l'immunologie des tumeurs (Boon et al., 1992; van der Bruggen et al., 1991; Traversari et al., 1992). Les travaux expérimentaux à l'origine de cette découverte reposaient sur la culture de cellules issues de mélanome de patients, en présence des lymphocytes périphériques du même sujet (Hérin et al., 1987). Au cours de cette co-culture, les lymphocytes reconnaissant des antigènes tumoraux prolifèrent et se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

pouvant être clonés. Les clones ainsi obtenus sont utilisés pour sélectionner des sous-populations de cellules tumorales dont les génomes peuvent alors être comparés. C'est ainsi que les gènes codant pour ces antigènes dits « de tumeur » ont été identifiés. Ces expériences pionnières, réalisées à partir de cellules de mélanome humain, ont permis d'identifier les **gènes MAGE** (melanoma antigen). A la suite de ce travail plusieurs centaines d'antigènes associés aux tumeurs ont été isolés et d'autres gènes de tumeur identifiés. Ces gènes codent pour des protéines qui peuvent être dégradées par la cellule et présentées à sa surface sous forme de peptides par l'intermédiaire des molécules d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). La mise en évidence des TAA a ouvert la voie à la possibilité d'une part de prévoir des **vaccins thérapeutiques** (Baurain et al., 2008; Coulie et al., 2002) mais aussi des effecteurs T spécifiques d'antigènes tumoraux.

La compréhension de ces mécanismes couplée à une **meilleure connaissance de la physiologie lymphocytaire et des récepteurs membranaires régulant son activation a permis le développement récent des immunothérapies dans le traitement des cancers**. Le succès des immunothérapies - permettant de lever l'immunosuppression des cellules T - souligne la possibilité d'un dialogue renoué entre la tumeur et la composante immune et d'une déconnexion fonctionnelle réversible pour une proportion de patients.

b) Le microenvironnement tumoral

Un grand nombre de types cellulaires immunitaires appartenant à la fois à l'immunité innée et adaptative sont présents dans le microenvironnement tumoral (Figure 5). Ces diverses populations leucocytaires sont présentes dans le microenvironnement tumoral dans des proportions variables en fonction de la localisation de la tumeur (Coussens et al., 2013; Fridman et al., 2012) et du stade d'évolution de celle-ci. Ainsi, en fonction du type de tumeurs solides des profils de complexité immunitaire uniques et distincts ont été mis en évidence, impliquant une **spécificité tissulaire du microenvironnement tumoral**.

Les cellules de l'**immunité innée**, telles que les lymphocytes **Natural Killer** (NK), NK-T, les lymphocytes $T\gamma\delta$, les granulocytes, les mastocytes, les macrophages, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les cellules dendritiques immatures, les ILC (innate lymphoid cells) (Bruchard and Ghiringhelli, 2019) peuvent être mises en évidence dans le microenvironnement tumoral. Les cellules de l'**immunité adaptative** sont également représentées : lymphocytes B, lymphocytes T CD4 auxiliaires ou « helper » (T CD4 de type Th1, Th2, Th17, Tfh), lymphocytes T régulateurs (Treg) et lymphocytes **TCD8 effecteurs**

cytotoxiques. Cet infiltrat se répartit de façon hétérogène au sein de la tumeur, du stroma avoisinant, du tissu sain en contact avec la tumeur (marge d'invasion), ainsi que dans des îlots lymphoïdes tertiaires néoformés (TLS) à proximité de la tumeur.

Depuis une quinzaine d'années, les travaux de l'équipe du Pr. Franck Pagès et du Dr. Jérôme Galon notamment dans les CCR ont permis de démontrer que **le type, la densité et la localisation des cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral ont une forte valeur pronostique** (Galon, 2006; Galon et al., 2007; Pagès et al., 2005). L'ensemble de ces critères a été regroupé sous la terminologie de « **contexture immunitaire** ».

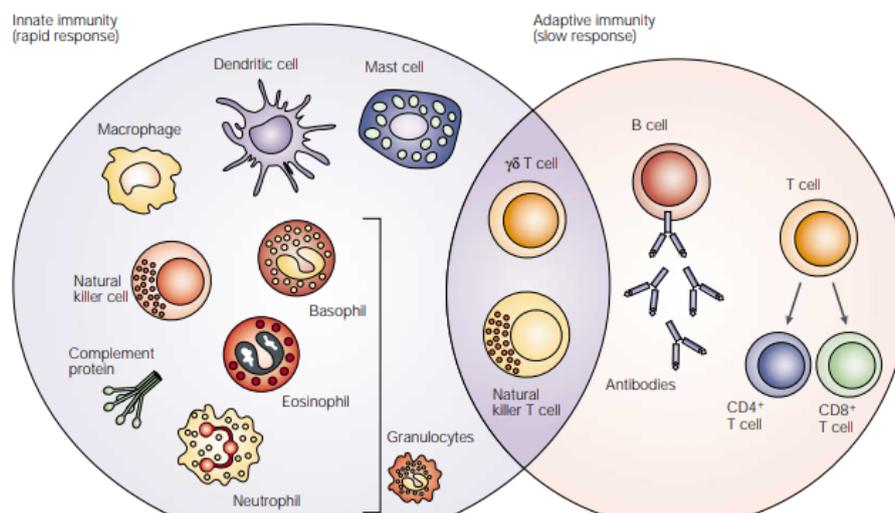


Figure 5. Le système immunitaire inné et adaptatif, acteurs impliqués dans l'immunité anti-tumorale (d'après Glenn Dranoff, Nature Review, 2004)

(i) Activité anti-tumorale et cellules de l'immunité innée

Les **cellules NK** jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires innées et adaptatives ainsi que dans l'immunosurveillance des tumeurs en reconnaissant et en éliminant les cellules tumorales (Russick et al., 2020; Smyth et al., 2000). Les cellules NK utilisent des mécanismes de cytotoxicité directe et indirecte dépendante des anticorps (ADCC ou Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) pour lyser la cellule cible. Les cellules NK sécrètent des cytokines (Interferon γ : IFN γ et Tumor Necrosis Factor α : TNF- α) pouvant activer les NK en boucle autocrine et d'autres cellules cytotoxiques dont les lymphocytes T CD8+ et les macrophages (Gajewski et al., 2013).

L'implication des cellules NK dans le contrôle du processus tumoral a été évoquée dans des modèles murins déficients en cellules NK (beige, souris traitées par anti-asialo-GM1) qui développaient un nombre croissant de tumeurs spontanées et une dissémination métastatique accrue (Barlozzari et al., 1985; Hanna and Burton, 1981; Talmadge et al., 1980).

Chez l'Homme, bien que peu fréquent dans le microenvironnement tumoral les **NK ont été associés à un pronostic favorable dans certaines tumeurs solides** (Nersesian et al., 2020), telles que les cancers gastriques (Ishigami et al., 2000), les cancers du sein (Triki et al., 2019) et colorectaux (Coca et al., 1997; Liska et al., 2012). Les cellules NK sont activées par des récepteurs activateurs (p.ex.. NKp46, NKG2D) reconnaissant des signaux de stress ou de danger exprimés par les cellules cancéreuses tels que la surexpression des ligands de NKG2D (natural killer group 2D), alors que l'expression sur la cellule cible de molécules du CMH-I délivre un signal inhibiteur pour l'activation des NK. Ainsi, les cellules tumorales n'exprimant plus de CMH-I activent les cellules NK. NKG2D (récepteur activateur) se lie à des molécules présentant une homologie structurale avec le CMH de classe I telles que MICA (MHC class I chain-related A) soluble ou la protéine ULBP (UL16-binding proteins) qui sont exprimées en réponse aux dommages de l'ADN. Cependant, les cellules tumorales acquièrent des mécanismes d'échappement à la surveillance immunitaire par les cellules NK. En effet, bien que la plupart des tumeurs expriment à leur surface des ligands de NKG2D, certaines tumeurs les sécrètent. Ces ligands sécrétés jouent alors le rôle de leurre pour contourner les réponses immunitaires des cellules NK et T. Ainsi, les protéines solubles MICA et ULBP ont été détectées dans le sérum de patients cancéreux, ces patients présentaient un niveau réduit d'expression de NKG2D et une altération de l'activation des cellules NK et T (Groth et al., 2011).

Les **cellules NKT** (Natural Killer T cells) sont des lymphocytes T non conventionnels car ils ne reconnaissent pas les molécules du CMH mais la molécule non polymorphe CD1d présentant des antigènes lipidiques. Les NKT partagent les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK, comme l'expression du marqueur CD161. Les lymphocytes NKT sont considérés comme des lymphocytes T innés ayant un phénotype de cellules activées/effectrices, et ils sont très conservés chez la souris et chez l'Homme (Bendelac et al., 2007). Les NKT sont impliqués dans l'efficacité de l'immunité anti-tumorale par des mécanismes directs (lyse des cellules tumorales) ou indirect (sécrétion de cytokines de type Th1) (Webb et al., 2020).

Les **macrophages associés aux tumeurs (TAM)** sont dérivés des monocytes sanguins et peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse tumorale (Hu et al., 2016). Classiquement les macrophages sont classés en macrophages M1 et M2 en fonction de leurs propriétés fonctionnelles. Les macrophages M1, classiquement activés par les cytokines de type 1 (IFN- γ) et les produits microbiens, ont une activité cytotoxique et sécrètent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-13. Ils sont capables de détruire les cellules cancéreuses en libérant des enzymes lysosomales, de l'oxyde nitrique ainsi que le TNF (Noy and Pollard, 2014). Ces macrophages ont également une fonction présentatrice d'antigènes permettant l'activation lymphocytaire. À l'inverse les macrophages M2, activés par des voies alternatives, favorisent la croissance tumorale via l'angiogenèse, le remodelage de la matrice et la suppression d'une réponse adaptative efficace via la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou IL-6. La déplétion des TAM inhibe la croissance de modèles murins d'adénocarcinome pulmonaire (Fritz et al., 2014), de mélanome (Tham et al., 2015) et du côlon (Ries et al., 2014). Chez l'Homme, le bénéfice pronostique des TAM est sujet à controverse. En effet, dans de nombreux cancers, une forte densité en TAMs est corrélée à un mauvais pronostic et à la survie (Hu et al. 2016 ; Jung et al. 2016). Cependant, certaines études ont montré un effet bénéfique des TAMs, ainsi une densité forte en TAMs était corrélée à une apoptose accrue, une meilleure survie sans récurrence dans les cancers de l'estomac et de l'œsophage (Ohno et al. 2003). L'une des raisons potentielles des observations contradictoires, sont l'absence de distinction entre polarisation M1 et M2 dans la plupart des études chez l'Homme. Dans une étude de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules où la polarisation des TAMs a été analysée, un ratio élevé de macrophages M1/ M2 élevé dans le tissu malin était associé à une meilleure survie (Ohri et al. 2009). Il semble donc nécessaire d'évaluer à la fois le nombre et le type de population de macrophages dans le microenvironnement tumoral.

Les **MDSC** (myeloid-derived suppressor cells) constituent une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures dotées d'un **phénotype immunosuppresseur** (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Chez l'homme, les MDSC sont identifiées par l'expression de CD11b et CD33 et par l'absence de HLA-DR et de marqueurs de cellules myéloïdes et lymphoïdes plus matures. La présence de MDSC est favorisée par le VEGF (vascular endothelial growth factor) et l'hypoxie (Tartour et al., 2011). Les MDSC peuvent être subdivisées en 2 principaux groupes i/ les MDSC monocytaires (M-MDSC), les plus abondantes et ii/

granulocytaires (PMN-MDSCs) en fonction de l'expression de CD14 et CD15, respectivement. Le phénotype immunosuppresseur des MDSC nécessite l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire. Ces signaux sont fournis par les cellules T et les cellules stromales du microenvironnement tumoral via la sécrétion d'IFN- γ (Medina-Echeverez et al., 2014), l'IL-4, l'IL-13, le TGF- β (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Comme les TAM, **les MDSC favorisent la croissance et la progression tumorale**. Les effets immunosuppresseurs des MDSC sont principalement médiés par leur capacité à inhiber la réponse T anti-tumorale (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Les MDSC expriment des niveaux élevés d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) et d'arginase 1. iNOS génère du NO (nitric oxide) qui i/ inhibe la fonction des lymphocytes T en perturbant la signalisation JAK3/STAT5, ii/ inhibe l'expression du CMH de classe II sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et iii/ induit l'apoptose des lymphocytes T. De plus, il a été décrit que les MDSC entraînaient la prolifération des Treg via la sécrétion de IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygénase 1) (Zoso et al., 2014). Les MDSC contribuent également à la croissance et à la progression tumorale par des mécanismes non immunologiques, notamment en favorisant l'angiogenèse et les métastases tumorales. Un taux élevé de MDSC a été associé à une diminution de la survie globale chez les patients atteints de cancer du sein et de cancers gastro-intestinaux (Gabitass et al., 2011; Solito et al., 2011).

Selon les types histologiques de cancers et leurs stades évolutifs, l'ensemble des types cellulaires de l'immunité innée ont pu montrer une activité anti-tumorale.

Ainsi, **l'immunité innée constituant le premier acteur de la réponse immune anti-tumorale pourrait être suffisante pour éliminer des cellules tumorales**. Son rôle serait primordial dans les sites épithéliaux durant les phases précoces du développement tumoral. De plus, **sa mise en jeu est essentielle à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative**. Lors de la réponse innée, la production de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α ainsi que les molécules relarguées ou exposées par la cellule tumorale (Damage-Associated Molecules Patterns ou DAMPs tels que l'ADN mitochondrial, HSP, HMGB1, ATP, ou l'acide urique) vont favoriser la maturation des cellules dendritiques, pré-requis à l'émergence d'une réponse adaptative. Il faut cependant garder à l'esprit qu'une réponse innée chronique non contrôlée (i.e. une inflammation chronique) peut à l'inverse avoir une activité pro-tumorale.

(ii) Activité anti-tumorale et cellules de l'immunité adaptative

L'association entre une forte infiltration en **cellules T CD8+ cytotoxiques**, ainsi qu'en lymphocytes T CD3+ et en lymphocytes T mémoires CD45RO+, et une meilleure survie sans récurrence (DFS, disease-free survival) et/ou survie globale (OS, overall survival) a largement été décrite dans les différents cancers (**Figure 6**), tels que le mélanome, la plupart des carcinomes épidermoïdes, le cancer du poumon à grandes cellules et plusieurs types d'adénocarcinomes (Fridman et al., 2012, 2017; Galon et al., 2006; Pages et al., 2010). Parmi l'ensemble des cellules immunitaires infiltrant le microenvironnement tumoral, les **cellules T CD8+ sont celles qui ont la valeur pronostique la plus importante en termes de survie** sans récurrence et de survie globale (Bruni et al., 2020). Cependant, les carcinomes à cellules claires du rein (ccRCC) ainsi que le cancer de prostate font exception à cette règle (Giraldo et al., 2015; Petitprez et al., 2019), dans lesquels une forte infiltration de la tumeur en cellules T CD8+ était associée à diminution de la survie sans progression et de la survie globale. L'hypothèse de la présence d'un microenvironnement pro-angiogénique et pro-inflammatoire dans le ccRCC a été avancée pour expliquer l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation négative à la surface des CD8+ reflet de leur état d'« exhaustion » au sein de ces tumeurs. En effet, dans les ccRCC présentant des taux faibles facteurs angiogéniques, une forte infiltration en CD8+ était corrélée à un bon pronostic (Giraldo et al., 2015). Cette association négative entre une forte infiltration en cellules CD8+ présentant un phénotype « épuisé » (Tim-3+PD-1+) et le pronostic a été confirmée dans le ccRCC (Granier et al., 2017). Ce travail a notamment pointé l'importance de l'évaluation de l'état fonctionnel des cellules infiltrant le microenvironnement tumoral insistant sur la complexité des interactions cellulaires au sein du microenvironnement tumoral.

Compte-tenu que la majorité des cellules tumorales expriment le CMH de classe I et que les cellules T CD8+ ont une capacité cytotoxique, la recherche en immunologie des tumeurs s'est initialement largement concentrée sur les cellules T CD8+. Cependant, il est aujourd'hui clairement établi que les cellules T helper (Th) CD4+ jouent également un rôle essentiel pour maintenir une immunité anti-tumorale efficace et durable (Knutson and Disis, 2005). La différenciation des cellules Th est régulée par le microenvironnement (cytokines, molécules de costimulation...) présent lors de l'activation des cellules CD4+. Les Th peuvent se différencier en différents sous-types : **Th1** qui produisent de l'IFN- γ et du TNF ; **Th2** qui

sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 ; **Th17** qui sécrètent de l'IL-17, les cellules T régulatrices (**Treg**) et les cellules follicular helper (**Tfh**). Ces sous-populations couvrent un large éventail de fonctions, et possèdent des valeurs pronostiques très variables.

Les cellules de type Th1 et la réponse IFN- γ sont très fortement associées à un bon pronostic dans quasiment l'ensemble des cancers (Fridman et al., 2012, 2020; Tartour et al., 1998). Des données récentes, indiquant qu'un taux élevé de cellules Th1 était associé à une diminution de la survie après chirurgie dans les cancers du poumon à petites cellules ont soulevé des questions sur la validité des cellules Th1 comme indicateur de bon pronostic dans ce type de cancer (Jian et al., 2017).

L'impact pronostique des autres sous-populations Th (Th2, Th17, Treg) est moins clair, car il diffère en fonction du type de cancer, du stade et du microenvironnement tumoral (Stoll et al., 2015). Une orientation Th2 notamment via la production de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 est très majoritairement associée à des tumeurs agressives. Ainsi, une forte infiltration en lymphocytes Th2 était associée à une survie globale plus courte chez les patients atteints de cancer du pancréas (De Monte et al., 2011). Cependant, une généralisation à l'ensemble des cancers ne peut être faite, ainsi dans les lymphomes de Hodgkin et dans le cancer du sein une forte infiltration en Th2 a été associée à un bon pronostic (Schreck et al., 2009; Yoon et al., 2010). Les mêmes observations ont été faites en ce qui concerne le rôle des lymphocytes Th17. Ainsi, une forte infiltration en Th17 était associée à la fois à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux (Tosolini et al., 2011), les carcinomes hépatocellulaires (Zhang et al., 2009) ou encore dans les cancers du poumon non à petites cellules (Chen et al., 2010) mais à un meilleur pronostic dans les cancers de l'œsophage (Lv et al., 2011), du col de l'utérus (Punt et al., 2015) ou de l'ovaire (Kryczek et al., 2009).

Les cellules Treg sont un sous-type de cellules T CD4⁺ qui suppriment les réponses immunitaires auto-immunes, caractérisées par une forte expression de CD25 et du facteur de transcription FOXP3 (forkhead box protéine P3) ainsi que par la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que le TGF- β et l'interleukine 10 (IL-10). Dans le contexte de tumeur, les cellules régulatrices FOXP3⁺ restreignent la sécrétion d'IFN γ par les LT (Jarnicki et al., 2006). L'impact pronostique de la présence de Treg au sein de la tumeur est variable selon les études (Fridman et al., 2017). Dans certaines tumeurs, comme dans les tumeurs ORL, les cellules FOXP3⁺ semblent avoir un effet protecteur dans le contrôle tumoral (Badoual, 2006). L'action modulatrice sur l'inflammation locale pourrait ainsi être bénéfique au déploiement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, en inhibant la réponse inflammatoire pro-tumorale locale (Badoual et al., 2009).

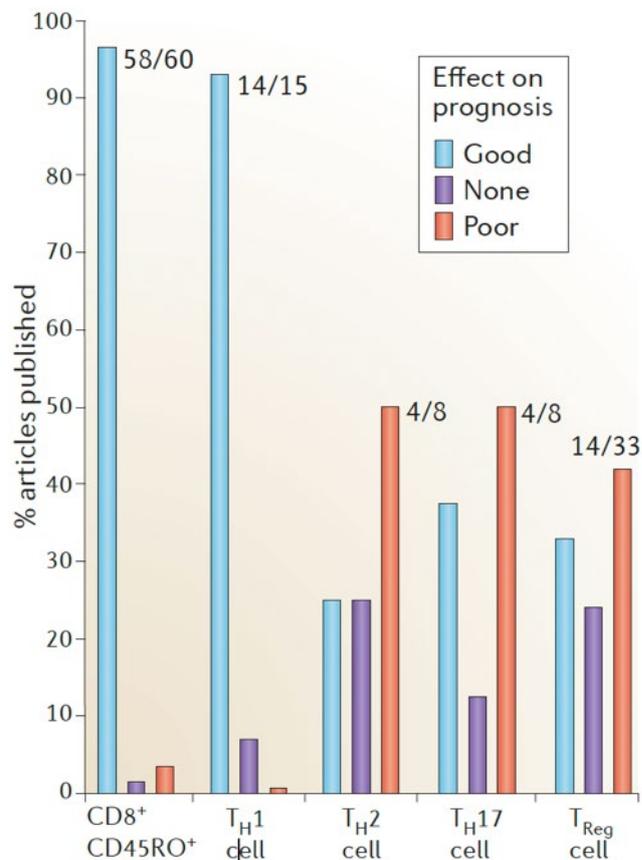


Figure 6. Association entre infiltrat immunitaire et pronostic déduite de l'analyse de 124 articles publiés étudiant l'impact des composantes cytotoxiques, mémoires, régularices et des sous-population helper en termes de pronostic dans 20 types de cancers.

B. Spécificité dans le cancer colorectal, vers une transition clinique de la composante immunitaire intratumorale

1) Apport de la pathologie digitale et de l'intelligence artificielle dans la prise en charge clinique, évolutions futures

Le procédé pour observer et analyser une cellule ou un tissu biologique n'avait pas évolué depuis le XIXe siècle : un prélèvement est déposé sur une lame de verre qui, une fois placée sous la loupe du microscope optique s'offre au regard du pathologiste. C'était sans compter sur Dirk G. Soenkel qui imagine dès la fin des années 90s un nouveau futur pour

l'anatomopathologie en se posant une question qui semble aujourd'hui triviale : « Pourquoi les anatomopathologistes ne pourraient-ils pas eux aussi regarder des écrans d'ordinateur ? ».

Avec l'avènement de la pathologie digitale (WSI, whole slide imaging) dans les années 2000s cette observation au microscope pourrait un jour faire partie de l'histoire ancienne. En effet, **la digitalisation de l'anatomopathologie est une petite révolution médicale** : il est désormais possible de numériser, stocker, classer, partager des lames mais également - surtout - analyser, quantifier de manière extrêmement précise et à l'échelle cellulaire des tissus issus de prélèvements chirurgicaux ou biopsiques. Au cours des deux dernières décennies, cette révolution a donné lieu à un nombre exponentiel d'applications en clinique, dans l'enseignement et en recherche.

En 2017, la FDA autorise pour la première fois l'utilisation de la pathologie digitale en pratique clinique de routine afin d'établir des diagnostics anatomopathologiques (Commissioner, 2020; Mukhopadhyay et al., 2018). Aujourd'hui, seuls 2 systèmes de digitalisation des lames ont reçu cette autorisation par la FDA.

Depuis quelques années, le développement et le perfectionnement des **algorithmes d'intelligence artificielle (AI)** font l'objet d'intenses recherches en radiologie et en anatomopathologie pour un diagnostic assisté par ordinateur. **L'intelligence artificielle combinée à la pathologie digitale et à la numération de lame entière a été à l'origine d'un nouveau champ d'application** (Niazi et al., 2019) en recherche particulièrement en anatomopathologie et surtout en oncologie mais progressivement en pratique clinique pour le diagnostic pathologique.

2) Immunoscore

a) Concepts et développement de l'Immunoscore

Grâce à l'avènement de ces nouvelles technologies, il était désormais possible et « facile » de quantifier les cellules du microenvironnement tumoral.

Les premiers travaux de notre équipe ont porté sur l'étude de **l'infiltrat immunitaire sur section de tumor microarray (TMA)**. Le TMA permet d'inclure dans un bloc de paraffine plusieurs centaines de cylindres biopsiques prélevés à partir de différents blocs, permettant

ainsi d'analyser plusieurs centaines d'échantillons de plusieurs patients sur une seule et même lame. Compte tenu de l'hétérogénéité de l'infiltration immunitaire dans les tumeurs plusieurs prélèvements de chaque région tumorale (la tumeur, CT et marge d'invasion, IM) ont été analysés afin de fournir des informations sur la physiopathologie de la tumeur et éventuellement son pronostic.

Ces études ont révélé qu'une **forte densité en lymphocytes T CD3+, T CD8+ cytotoxiques et en T CD45RO+ mémoires était corrélée à une survie sans récurrence (DFS) prolongée et un accroissement de la survie globale (OS)** (Galon, 2006; Pagès et al., 2005).

De plus, ce **critère pronostique immunitaire semblait être plus déterminant que celui fourni par l'extension tumorale (classification AJCC/UICC-TNM)** qui constitue encore à ce jour le standard d'évaluation pronostique des tumeurs solides (Galon et al., 2006; Mlecnik et al., 2011, 2016a).

Ainsi la "texture" immunitaire - définie comme le type, l'orientation fonctionnelle, la densité et la localisation des cellules immunitaires adaptatives dans des régions tumorales distinctes (Galon, 2006 ; Galon et al., 2013) semblait être le facteur pronostique le plus important pour la survie et la dissémination tumorale dans les cancers colorectaux.

De ces investigations de recherche, un test appelé « **Immunoscore** » (IS) a été dérivé par l'équipe de Franck Pagès et Jérôme Galon afin d'inclure ce test dans la pratique clinique. Il ne s'agissait plus d'analyser l'infiltrat immunitaire sur des TMA mais sur lame entière (WSI). L'immunoscore est basé sur la **quantification à l'aide d'outils de pathologie digitale de deux populations de lymphocytes, les cellules T CD3+ et les cellules T CD8+ cytotoxiques, dans la tumeur (CT) et sa marge d'invasion (IM)**.

Afin d'évaluer la performance pronostique de ce test, une **étude rétrospective internationale** sous l'égide du SITC (The Society for Immunotherapy of Cancer) incluant des patients atteints de cancers colorectaux a débuté en 2012. Les résultats de cette étude incluant plus de 3539 patients **ont confirmé que l'Immunoscore détenait une valeur pronostique supérieure à celle du système de stadification AJCC/UICC-TNM** (Pagès et al., 2018).

L'IS est le premier test basé sur la pathologie numérique permettant de quantifier de manière standardisés les infiltrats immunitaires.

En 2020, l'ESMO a inclus l'immunoscore dans ses guidelines (ESMO Clinical Guidelines, 2020) (Argiles et al., 2020). L'immunoscore est ainsi devenu **le premier biomarqueur - reconnu par les institutions académiques- permettant de quantifier l'infiltrat immunitaire intra-tumoral dans un but pronostique**. Ce changement de paradigme dans la classification du cancer du côlon incluant désormais la composante immunitaire comme facteur pronostique a été confirmé par l'introduction de la qualité de la réponse immunitaire comme un des critères diagnostiques essentiels et souhaitables dans le cancer colorectal dans la dernière version (5^{ème} édition) du « WHO Digestive System Tumors » (Quezada-Marín et al., 2020). L'immunoscore y est cité comme preuve du pouvoir pronostique de la réponse immunitaire dans le cancer du côlon.

Dans l'optique d'une transition vers une pratique clinique de routine les caractéristiques de performance analytique d'Immunoscore ont été évaluées. Ces analyses ont montré que l'immunoscore était un test immunitaire **robuste, reproductible, quantitatif et standardisé** (Marliot et al., 2020). Ainsi, la valeur de l'IS est constante au sein d'un même bloc tumoral (de la coupe 1 à la 100^e coupe) et entre les différents blocs potentiellement éligibles (présence de CT et IM) pour la réalisation du test. De plus, une grande constance de la valeur de l'IS est observée dans l'analyse de cas réalisés par différents opérateurs.

Enfin, une étude nationale prospective multicentrique (PHRC national) a permis de valider la performance pronostique et sa faisabilité de l'immunoscore en pratique clinique dans le cancer du côlon (article en préparation). L'utilisation de ce test pourrait améliorer l'appréciation pronostique, la prise en charge thérapeutique des patients et pourrait permettre de prédire la réponse à certaines thérapies anti-tumorales.

b) Immunoscore et chimiothérapie adjuvante dans le cancer du côlon

Le rôle du statut immunitaire de la tumeur dans la réponse aux traitements anti-cancéreux (chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie...) est une question au centre de nombreuses études.

Cette question a été étudiée par l'équipe dans deux études récentes dans le cancer du côlon de stade III. Tout d'abord, l'immunoscore a été évalué chez 763 patients atteints d'un cancer du côlon de stade III selon l'AJCC/UICC-TNM et provenant de l'étude internationale immunoscore (Mlecnik et al. 2020). Seuls **les patients présentant un Immunoscore intermédiaire (Int.) ou élevé ont répondu à la chimiothérapie et ont eu une survie**

prolongée par rapport aux patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie (HR= 0,42 ; 95% CI= 0,25 à 0,71 ; P = 0,0011). En revanche, les patients à faible score immunologique n'ont pas bénéficié de manière significative d'un traitement par chimiothérapie, que ce soit dans les cas de maladie de stade III à haut risque (P = 0,12) ou à faible risque (P = 0,17).

La deuxième étude portait sur la capacité de l'Immunoscore à **prédire la réponse à la chimiothérapie adjuvante** dans l'essai Immunoscore-IDEA (International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy) France regroupant 1062 patients (Pagès et al., 2020). Cette étude testait la non-infériorité d'une chimiothérapie adjuvante (FOLFOX ou CAPOX) de 3 mois versus 6 mois, chez les patients ayant un cancer du côlon de stade III (Grothey et al., 2018). Notre équipe a observé que seuls les patients présentant un immunoscore Int. ou élevé avait un bénéfice en termes de survie sans récurrence lors d'un traitement de 6 mois par FOLFOX (91,36% de la cohorte), comparé au traitement de 3 mois (HR = 0,53 ; 95% CI= 0,37-0,75 ; Log-rank P = 0,0004), pour les cancers à faible risque clinique (T1-3 N1) et également à haut risque (T4 ou N2) (tous P < 0,001). À l'inverse, les patients présentant un Immunoscore faible (46,4 %) ne présentaient aucun bénéfice significatif d'un traitement par FOLFOX 6 mois par rapport à un traitement de 3 mois. Ainsi, ces patients semblaient être doublement pénalisés car ils présentaient (i) un risque accru de récurrence et (ii) une absence de bénéfice d'une durée de traitement plus longue.

Le protocole FOLFOX comprend du 5-fluorouracile (5-FU) qui peut partiellement épuiser ou inactiver transitoirement les cellules immunitaires inhibitrices (Vincent et al., 2010), et l'oxaliplatine, une chimiothérapie induisant une mort cellulaire immunogénique (Garg et Agostinis, 2016). L'activité de la chimiothérapie dans les cancers du côlon pourrait donc en partie être médiée par une réponse immunitaire anti-tumorale permettant d'éliminer les cellules tumorales disséminées après chirurgie.

c) Immunoscore et cancer du rectum : résultats préliminaires

En 1986, Jass (Jass, 1986) a pour la première fois démontré qu'une forte infiltration lymphocytaire évaluée sur des coupes histologiques dans la marge d'invasion (IM) des tumeurs rectales était la seule variable retenue dans un modèle pronostique multivarié avec la classification TNM. Cette observation a été confirmée par d'autres études (Nagtegaal et al., 2001; Szynglarewicz et al., 2007). Ce résultat a été validé par notre équipe sur une cohorte de 111 patients atteints de cancer du rectum n'ayant pas reçu de nCRT (Anitei et al., 2014).

L'immunoscore avait alors été évalué par la quantification des densités de cellules CD3+ et CD8+ dans les régions CT et IM par des analyses immunohistochimiques de TMA avec un logiciel d'analyse d'image. La quantité d'infiltrat immunitaire était significativement associée à des différences de DFS et d'OS (HR= 1,81 et 1,72, respectivement ; $P < 0,005$), **et était également un facteur pronostique plus puissant que la classification TNM pour prédire la récurrence et la survie en analyse multivariée ($P < 0,001$).**

Dans cette même étude, la densité immunitaire (CD3 et CD8) des biopsies diagnostiques d'une petite cohorte de 33 patients qui seraient aujourd'hui éligibles à la radiochimiothérapie néoadjuvante, (nCRT) a été analysée. Les densités de cellules CD3+ et CD8+ étaient diminuées sur la biopsie diagnostique chez les patients présentant une rechute de leur cancer. **Ainsi, la qualité d'infiltrat immunitaire pourrait être pronostique par-delà l'influence qu'elle pourrait avoir sur les traitements néoadjuvants.**

Dans les cancers du rectum localement avancés, le traitement par radiochimiothérapie néoadjuvante (avant l'acte chirurgical) est désormais le traitement de référence. L'étude de l'infiltrat immunitaire au niveau de la pièce opératoire est alors compromise, en effet la radiochimiothérapie induit un remodelage de l'architecture histologique, une modification de l'infiltrat immunitaire. Ainsi le seul matériel disponible afin d'étudier le microenvironnement tumoral avant tout traitement sont les biopsies diagnostiques faites lors de la coloscopie. Les coloscopies sont rarement faites dans le centre qui prend en charge le patient en cas de diagnostic de cancer. Aujourd'hui en France –contrairement à certains pays européens (Casparie et al., 2007)- il n'existe aucune base de données regroupant les prélèvements anatomopathologiques analysés par des laboratoires de villes ou hospitaliers. Ces prélèvements biopsies précieux pour l'analyse initiale du microenvironnement tumoral sont ainsi très difficiles à récupérer et l'analyse des différents marqueurs prédictifs de bonne réponse au traitement néoadjuvant un véritable « challenge ». Cet obstacle logistique pourrait -dans certains cas- être atténué dans les prochaines années avec la généralisation de la pathologie digitale.

C. Traitements anti-cancéreux et infiltrat immunitaire

Les thérapies « classiques » anti-cancéreuses non ciblées (radiothérapie, chimiothérapie) mais également la chirurgie, modifient le microenvironnement tumoral et notamment sa composante immunitaire. La compréhension des différents mécanismes et leurs conséquences

sur le système immunitaire est essentielle à l'optimisation d'utilisation de ces thérapies (délai d'administration, délai entre une chimiothérapie néoadjuvante et chirurgie, association à une immunothérapie...).

1) Radiothérapie et microenvironnement tumoral

Grâce à son efficacité, la radiothérapie (RT) est actuellement administrée en première ligne de traitement chez plus de 60 % des patients atteints de cancer (Jaffray, 2012), généralement en association avec la chimiothérapie. Bien que la cible première de la RT soit la cellule cancéreuse en prolifération, la radiothérapie entraîne également des modifications au niveau du microenvironnement tumoral et notamment immunitaire. Ainsi les souris nude, - dépourvues de système immunitaire -, ne répondent que partiellement à la radiothérapie en comparaison à des souris sauvages. Ces données récentes avaient déjà été décrites *in vivo* en 1979 par Helen Stone, dans une étude montrant une relation forte entre la radiosensibilité de la tumeur irradiée et l'immunocompétence de l'hôte. Dans cet article, la dose nécessaire pour contrôler 50 % des tumeurs (TCD50) de souris immunodéprimées était environ le double de la dose qui était nécessaire chez les souris immunocompétentes (60 Gy *vs* 30 Gy) (Stone et al., 1979).

Ces modifications sont dictées par le type de rayonnement, la dose, **l'intensité/fractionnement**, la **méthode d'administration**, la **taille du champ** et la **dose cumulative totale**. La RT joue un rôle double : d'un côté elle permet une stimulation de la réponse immunitaire et entraîne une élimination des cellules tumorales mais elle induit également un effet immunosuppresseur pouvant entraîner un « effet rebond » et une progression tumorale.

a) Effets immunostimulants de la radiothérapie

La radiothérapie (RT) favorise la présentation des antigènes tumoraux par les cellules tumorales en majorant le pool cellulaire d'antigènes spécifiques et en **favorisant transitoirement l'expression du CMH de classe I (secondaire à la production d'IFN γ) et de Fas** rendant ainsi les cellules tumorales plus vulnérables à la destruction par les lymphocytes T cytotoxiques (Chakraborty et al., 2003; Reits et al., 2006).

Elle génère également une **mort cellulaire « immunogène »**. En effet, la dichotomie traditionnelle de la mort cellulaire proposée par Kerr et Wyllie en 1972 (Kerr et al., 1972) - l'une permettant une élimination « propre » et non inflammatoire des cellules *i.e.* l'**apoptose** et l'autre induisant un phénomène inflammatoire qui atteint la région située autour de la cellule détruite *i.e.* la **nécrose**- a été remise en question par la démonstration que la mort apoptotique pouvait être associée à la libération de signaux pro-inflammatoires et dangereux (Galluzzi et al., 2007). La mort cellulaire induite par la chimiothérapie et la RT est très immunogène via la libération de signaux de danger de type danger-associated molecular patterns (DAMPs) et **favorise la présentation croisée des antigènes de tumeurs par les cellules dendritiques (DC) aux lymphocytes T**, conduisant à une réponse anti-tumorale (Ma et al., 2010; Zitvogel et al., 2011). Ainsi les trois signaux de danger identifiés comme critiques pour l'induction de la mort cellulaire immunogène, la **translocation de la calréticuline correspondant à un « eat-me » signal** à la surface de la cellule « mourante » aboutissant à la phagocytose des fragments cellulaires tumoraux, la **libération de la *high mobility group box-1 (HMGB1)*** se liant aux récepteurs TLR4, la **libération active d'ATP** par les cellules engagées dans la mort apoptotique, nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à l'attraction des cellules présentatrices d'antigène (Formenti and Demaria, 2009) ont tous été décrits dans les cellules irradiées (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et al., 2009; Obeid et al., 2007).

Les DCs activées présentent alors les antigènes de tumeurs aux lymphocytes T naïfs au sein des ganglions lymphatiques drainant la tumeur et entraînent une réponse immunitaire cytotoxique spécifique de l'antigène tumoral (Demaria and Formenti, 2012). La RT génère la sécrétion de CXCL6 et des molécules d'adhésion ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et E-selectine entraînant le recrutement de lymphocytes T effecteurs au site de la tumeur (Gaugler et al., 1997; Matsumura et al., 2008) et ainsi la mort de la cellule tumorale par apoptose. L'activation lymphocytaire assure également la formation de lymphocytes T mémoires présents dans la circulation générale. De plus, la RT entraîne une amplification de la réponse immunitaire anti-tumorale en induisant un microenvironnement pro-inflammatoire avec libération de cytokines pro-inflammatoires IL1- β , IL2, IL6, IL12, IFN de type I (IFN- α / β) et TNF- α (Schaue and McBride, 2010).

Ainsi, la RT est capable d'induire une mort cellulaire pouvant être perçue par le système immunitaire comme dangereuse en libérant des antigènes associés à la RT (radiation-associated antigenic proteins, RAAPs) (Ozpiskin et al., 2019) et de convertir ainsi la tumeur irradiée en un **vaccin anti-tumoral *in situ*** (« *in situ* cancer vaccine ») (Formenti and Demaria, 2009).

b) Effet systémique de la radiothérapie : effet abscopal

Le terme abscopal introduit en 1953 par R.H. Mole est dérivé du préfixe latin *ab* (en dehors) et du nom grec *scopos* (la cible) (Mole, 1953). R.H Mole remarqua que la régression tumorale pouvait être observée au niveau de régions à distance de la zone tumorale irradiée et décrivit ainsi pour la première fois l'effet non ciblé de la radiothérapie. Mais ce type d'effet restait anecdotique. Dans les années 2000s, les expériences de S. Demaria ont permis de démontrer le rôle du système immunitaire et notamment le rôle des lymphocytes T dans l'effet abscopal (Demaria et al., 2004). Ainsi, en utilisant un modèle de tumeur non métastatique 67NR implantée dans les deux flancs de souris immunocompétentes et en n'irradiant qu'une seule des deux tumeurs afin de mesurer l'effet abscopal sur la tumeur non irradiée Demaria et al. ont montré que seule la restauration d'une fonction des cellules dendritiques permettait d'induire un effet de type abscopal qui était médié par l'activation des lymphocytes T anti-tumoraux.

Mais ce n'est qu'avec l'arrivée des immunothérapies par blocage des molécules de costimulation inhibitrice (MCI) et les observations faites de régression de métastase à distance du site d'irradiation, que l'effet abscopal a fait l'objet d'un regain d'intérêt (Postow et al., 2012). Depuis, de nombreux essais cliniques testent la combinaison d'une RT avec différents types d'immunothérapies. Actuellement, le site clinicaltrials.gov recense 29 essais en cours décrivant l'effet abscopal dont une seule étude de phase III dans les cancers du poumon non à petites cellules (NCT03774732).

c) Effet secondaire de la radiothérapie : l'immunosuppression

La RT peut également entraîner des effets immunosuppresseurs. En effet, la RT a longtemps été considérée comme immunosuppressive comme l'atteste son utilisation en irradiation corporelle pré-greffe.

Les cytokines induites par la RT jouent un rôle central dans la balance immunitaire anti-tumorale. Ainsi, comme nous venons de le voir la RT induit la libération de signaux de DAMPs générant une réaction pro-inflammatoire avec libération de cytokines telles de IL1- β , IFN- α ou TNF- α conduisant au recrutement de macrophages de type M1 participant à la réponse immunitaire anti-tumorale. L'évolution se fait ensuite vers un état anti-inflammatoire avec sécrétion de cytokines de type IL-4, IL-10 générant une polarisation de type M2 aux macrophages (Allavena et al., 2008; Schaue and McBride, 2010). Les macrophages M2 exercent alors une forte activité immunosuppressive en inhibant à la fois les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les cellules NK et les lymphocytes NKT en provoquant l'apoptose des lymphocytes T, en induisant *via* la libération de TGF- β et d'IL-10, la formation de lymphocytes T régulateurs CD4+FOXP3+ (Treg) à partir des lymphocytes T CD4+ (iTreg) et en attirant au site tumoral irradié les lymphocytes Treg naturels (nTreg) via la libération de chimiokines telles que CCL3, CCL5, CCL20 ou CCL22 (Noy and Pollard, 2014). La radiation ionisante entraîne une altération physique des cellules immunitaires, mais la « résistance » cellulaire aux radiations dépend du type cellulaire ainsi les Treg sont plus résistantes aux radiations ionisantes que les lymphocytes T cytotoxiques (Kachikwu et al., 2011).

La radiothérapie via la sécrétion d'IFN γ entraîne une surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales et du récepteur PD-1 sur les lymphocytes T (Dovedi et al., 2014). Le signal PD1/PDL-1 entraîne alors l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes cytotoxiques aboutissant à nouveau à un microenvironnement immunosuppressif.

2) Impact de la chirurgie sur le microenvironnement tumoral

L'observation de cas de **dissémination métastatique post-chirurgicale** a abouti à l'étude du rôle de la chirurgie -bien qu'elle soit nécessaire à la résection de la tumeur primaire- sur le système immunitaire et notamment sur le contrôle des métastases à distance à la fois dans des modèles précliniques et chez les patients.

Différents niveaux d'explications ont été avancés au cours des dernières années. Ainsi, la **dissémination des cellules tumorales dans la circulation générale** lors de l'acte chirurgical ou la **stimulation de l'angiogenèse** en post-opératoire peut conduire à une croissance métastatique malgré la résection de la tumeur primaire (Tohme et al., 2017).

De plus, en période post-opératoire et lors de la phase de cicatrisation, un **état pro-inflammatoire** se met en place, pouvant être responsable d'un état favorisant la tumorigénèse (Eming et al., 2007). En effet, certaines études ont montré **une augmentation de la sécrétion de certaines cytokines et de chimiokines en post-opératoire** (IL-6, CXCL-10) et lors du processus de cicatrisation (IL-6, G-CSF, CCL2). A noter, que cette sécrétion semble corrélée avec la « lourdeur » de l'acte chirurgical (chirurgie mini-invasive vs laparoscopie) (Crucitti et al., 2015; Sammour et al., 2010). Ainsi, les mécanismes d'immunosuppression lors de la période de cicatrisation offrent potentiellement aux cellules cancéreuses disséminées une fenêtre d'opportunité pour se multiplier au niveau d'un site secondaire.

Il a également été montré que la chirurgie induisait un **dysfonctionnement des cellules NK**. Chez des patients atteints d'un cancer colorectal il a été observé une diminution de la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK périphériques par rapport au groupe contrôle (individus sains), cette diminution était observée jusqu'à 2 mois post-chirurgie (Angka et al., 2018).

Le type de chirurgie (laparoscopie vs chirurgie ouverte) semble également jouer un rôle important sur le taux de NK circulants (Liu et al., 2010; Wichmann et al., 2005). La diminution du nombre de cellules NK et de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) conduit à une immunosuppression qui, à son tour, contribue à l'expansion des cellules tumorales résiduelles ou à la formation de micrométastases.

Ainsi, les nouvelles approches à type de désescalade chirurgicale par les stratégies de préservation d'organes pourraient également réduire les effets immunosuppresseurs de l'acte chirurgical.

3) Radiochimiothérapie néoadjuvante et nombres de ganglions

Les traitements oncologiques n'agissent pas uniquement sur la tumeur mais également au niveau des ganglions drainant, cela a son importance dans le cadre de traitements néoadjuvants. En effet, il a été montré que le traitement par **nRCT des cancers du rectum induisait une diminution du nombre de ganglions lymphatiques** examinés sur les pièces opératoires post nRCT (Bosset et al., 2005; Wichmann et al., 2002). Ainsi dans une méta-analyse datant de 2012, la nRCT induisait une diminution du nombre de ganglions examinés sur les pièces opératoires de 7 à 53% (Miller et al., 2012).

Au niveau histologique, la radiochimiothérapie induit également des modifications architecturales au niveau ganglionnaire. Il a été démontré au niveau de la tumeur primaire que la présence de **fibrose ou de nécrose sur la pièce opératoire post-nRCT étaient des critères de bonne réponse** au traitement et sont des stigmates de la présence de cellules tumorales (Dworak et al., 1997; Junker et al., 1997). Les mêmes observations ont été faites au niveau ganglionnaire dans différents type de cancers notamment dans le cancer du rectum (Mirbagheri et al., 2014; Takahashi et al., 2020). Un **score LRG** (lymph node regression grade) basé sur le même système que le TRG (tumor regression grade) utilisé en pratique clinique pour évaluer la régression tumorale dans le cancer du rectum, a été proposé (Caricato et al., 2007). Ce score a été évalué dans plusieurs études cliniques (Li et al., 2016; Mirbagheri et al., 2014) montrant une **corrélation du LRG avec le risque de rechute**. Les effets d'un traitement néoadjuvant sur les ganglions lymphatiques -tumorales ou non- est une question essentielle mais difficile à étudier. Des études ont montré une **relation entre la tumeur primaire et la régression des ganglions lymphatiques**. Une nouvelle stadification pathologique incluant la régression tumorale au niveau ganglionnaire permettrait une stratification plus précise des patients à la fois sur le plan pronostique mais également thérapeutique.

PARTIE III. Les ganglions lymphatiques : acteurs immunitaires dans le cancer

Les ganglions lymphatiques sont des acteurs centraux du système lymphatique et immunitaire. Ils jouent un **rôle essentiel mais contradictoire dans la progression tumorale**. En effet, ce sont avant tout des **organes sentinelles responsables de l'immuno-surveillance anti-tumorale** mais aussi de lieu de formation de **niches métastatiques immunotolérantes** aboutissant à la dissémination secondaire du cancer. Cet antagonisme est le reflet de la manière dont le cancer arrive à manipuler le système lymphatique et immunitaire.

A. Ganglions lymphatiques du rectum

Le drainage lymphatique du rectum prend son origine dans la muqueuse et dans la sous-muqueuse du rectum. Le premier relais lymphatique est pararectal puis le drainage suit les vaisseaux de l'ampoule rectale. **Les ganglions sont situés autour des vaisseaux du rectum, principalement autour des artères**. La vascularisation artérielle du rectum est assurée essentiellement par les artères rectales supérieures (ARS) plus accessoirement par les artères rectales moyennes (ARM) et par l'artère sacrée moyenne (ASM).

Les ganglions lymphatiques drainant le rectum sous la réflexion péritonéale, suivent **deux voies principales** (1) le long de l'artère rectale supérieure et de l'artère mésentérique inférieure dans les ganglions para-aortiques, (2) le long des artères rectales moyenne et inférieure dans les ganglions obturateurs, iliaque interne et iliaque externe puis se terminant au niveau des ganglions para-aortiques (**Figure 7**).

Les ganglions du mésorectum ou ganglions para-rectaux se situent principalement au niveau des faces postérieure et latérale du rectum. A noter que 56-75% des ganglions du mésorectum se situent au niveau de la face postérieure, les deux tiers de ces ganglions étant dans la partie supérieure du mésorectum (Canessa et al., 2001; Pirro et al., 2008; Topor et al., 2003).

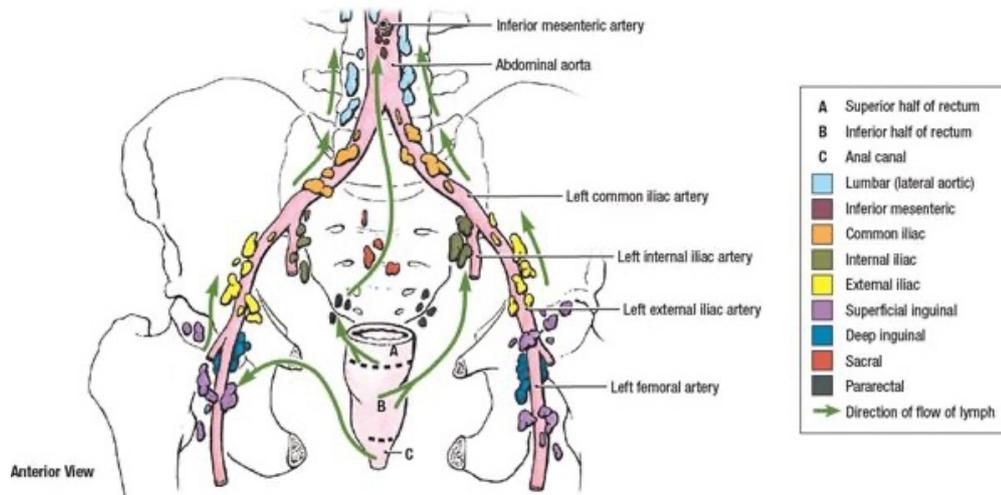


Figure 7. Drainage lymphatique du rectum

B. Ganglions lymphatiques drainant la tumeur : intérêt du curage ganglionnaire étendu dans le cancer du rectum, différences entre les pratiques occidentales et asiatiques

Comme dans la plupart des cancers, la place du curage ganglionnaire a fait partie intégrante de la prise en charge thérapeutique dans le cancer du rectum. Ce curage est aujourd'hui à l'origine de différences dans les pratiques thérapeutiques occidentales et asiatique.

Dans les années 1950, la chirurgie du cancer du rectum impliquant un curage étendu des ganglions lymphatiques péri-aortiques et pelviens latéraux a été mise en place aux États-Unis (Deddish, 1951; Sauer and Bacon, 1952). Cependant, cette chirurgie lourde et associée à une augmentation de la fréquence du risque hémorragique, des dysfonctionnements urinaires et sexuels, fut progressivement abandonnée (Georgiou et al., 2009; Stearns and Deddish, 1959). Dans les années 2000, plusieurs études cliniques ont montré une réduction du risque de récidives locales avec l'utilisation d'une radiochimiothérapie (RCT) préopératoire (Gerard, 2006; Peeters et al., 2007). Ainsi, **la radiochimiothérapie néoadjuvante (nRCT) suivie de l'excision totale du mésorectum (TME) sans curage de la paroi pelvienne latérale est devenue le traitement de référence pour le cancer du rectum localement avancé.**

Une seule étude prospective randomisée (Nagawa et al., 2001) a comparé la durée de survie sans récurrence et la durée de survie globale de deux groupes de malades ayant un cancer du rectum traité par proctectomie par TME après radiothérapie préopératoire associée ou non à

un curage de la paroi pelvienne latérale. Dans cette étude, **aucune différence au niveau des durées de survie dans les deux groupes de malades n'a été retrouvée.**

Une méta-analyse récente (Anania et al., 2021), a montré qu'il n'y avait **aucun bénéfice oncologique à associer la TME à un curage élargi aux ganglions pelviens latéraux.**

Le curage latéral a par ailleurs, une morbidité propre. Elle allonge la durée opératoire, augmente les pertes sanguines et les troubles génito-urinaires en raison du non-respect de l'innervation pelvienne.

A l'exception de l'Asie, **le curage pelvien latéral systématique n'est pas recommandé, car il augmente la morbidité postopératoire et il n'améliore ni le taux de survie, ni le contrôle local de la maladie.**

C. Ganglions lymphatiques : le double-jeu

Les ganglions lymphatiques (LN) drainant la tumeur jouent un **rôle paradoxal dans le cancer.** Du point de vue chirurgical et histologique les ganglions drainant la tumeur (ganglions sentinelles) sont réséqués et analysés pour déterminer la **propagation métastatique** de la maladie permettant ainsi d'établir la prise en charge et le pronostic du patient. Du point de vue immunologique, **les ganglions lymphatiques sont avant tout des organes lymphoïdes secondaires permettant l'orchestration des réponses immunitaires** (Chen and Mellman, 2013).

1) Ganglions sentinelles : une niche pour le développement tumoral

Le développement de métastases est précédé par des modifications au sein du microenvironnement de l'organe métastatique en vue de l'arrivée et de la colonisation des cellules tumorales (Peinado et al., 2011). Le « dialogue » entre la cellule tumorale (« the seed », la graine) et le microenvironnement (« the soil », le sol) a été observé et décrit pour la première fois par Stephen Paget en 1889 et est à l'origine de la théorie de « la graine et du sol » (« Seed and Soil ») (Paget, 1889). Le concept de niche pré-métastatique a depuis été formulé par l'équipe de David Lyden (Kaplan et al., 2005). Cette étude pionnière a révélé que certains facteurs excrétés ou sécrétés par les cellules tumorales permettaient de moduler le microenvironnement de l'organe où se développeront les métastases ultérieurement. Ces facteurs préparent ainsi l'organe cible à l'« accueil » des cellules tumorales favorisant leur

survie et leur prolifération. Les principaux événements de ce processus d'amorçage comprennent la **sécrétion de facteurs de croissance pro-métastatiques**, de **chimiokines/cytokines**, ainsi que la libération de **vésicules extracellulaires (EV)** telles que des exosomes par la tumeur primaire. Ces facteurs dérivés de la tumeur primaire entraînent une augmentation du nombre de cellules immunosuppressives et le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) dans l'organe pré-métastatique. Ces changements moléculaires et cellulaires créent ainsi un microenvironnement unique qui favorise la croissance métastatique. La formation de ces niches pré-métastatiques a été décrite dans de nombreux organes, tels que le poumon (Maru, 2015), le foie (Houg and Bijlsma, 2018), les os (Ren et al., 2015). Cependant, les données concernant la formation de ces niches au sein des organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions sont récentes. Hirakawa et al. ont été les premiers à observer le remodelage des ganglions lymphatiques à un stade pré-métastatique (Hirakawa et al., 2005, 2006). Ils ont montré que les facteurs de croissance vasculaire (VEGF-A et VEGF-C) étaient responsables de l'induction de la lymphangiogénèse dans les ganglions sentinelles. Depuis, plusieurs études ont permis d'élucider d'autres mécanismes impliqués dans la formation de niche-pré-métastatiques au sein des ganglions lymphatiques : augmentation de la lymphangiogénèse et du flux lymphatique, remodelage des HEVs (high endothelial venules), recrutement de cellules myéloïdes et la réduction du nombre et de la fonction des lymphocytes effecteurs (**Figure 9**).

La lymphangiogénèse et le remodelage des HEVs sont des étapes clés de la dissémination métastatique ganglionnaire.

- La **lymphangiogénèse du LN** est principalement dirigée par le VEGF-A, le VEGF-C, l'intégrine et l'érythropoïétine et est corrélée à une augmentation des métastases systémiques (Hirakawa et al., 2005, 2006). Le VEGF-C stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales lymphatiques (LEC) entraînant la formation de vaisseaux lymphatiques et l'élargissement des vaisseaux pré-existants augmentant ainsi la surface de contact entre les cellules tumorales et les lymphatiques (Ma et al., 2018). Ce remodelage lymphatique contrôlé principalement par des facteurs solubles issus de la tumeur primaire a été observé avant même la détection de cellules tumorales au sein du ganglion. Cette expansion lymphatique pourrait jouer un rôle clé dans la formation de la niche pré-métastatique au sein des ganglions, entraînant la colonisation des LN par les cellules tumorales.

- Le **remodelage des HEVs** au sein des LN joue également un rôle essentiel dans la progression tumorale au sein des LN. En effet, les HEVs en perdant l'expression de molécules de surface (ex : BMP-4) entraînent une **diminution du recrutement des lymphocytes naïfs** et ainsi de la réponse anti-tumorale. Les HEVs altérés entraineraient également une augmentation de l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires aux cellules tumorales en prolifération, en effet le processus de métastase ganglionnaire ne semble pas dépendre de l'angiogénèse (Padera et al., 2016).

Les LN drainant la tumeur présentent un microenvironnement immunosuppresseur. Ainsi, on trouve moins de cellules T effectrices dans les LN métastatiques et pré-métastatiques (Kohrt et al., 2005). De plus, les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) s'accumulent dans les LN sentinelles entraînant le recrutement de cellules T régulatrices inhibitrices (Tregs) inhibant la prolifération et l'activation des cellules T (Kohrt et al., 2005; Watanabe et al., 2008). De nombreuses similitudes ont été observées entre les LNs drainant la tumeur et ceux drainant des zones d'inflammation chronique. Les LECs jouent un rôle central dans l'immunosuppression intra-ganglionnaire. Il a été montré il y a quelques années que les LECs exprimaient à leur surface à la fois les molécules de CMH de classe I et II (Rouhani et al., 2014), cependant le niveau d'expression du CMH de classe II varie en fonction de leur location anatomique, ainsi le CMH-II est très fortement exprimé au niveau des ganglions (Rouhani et al., 2014; Santambrogio et al., 2019). Les LECs sont dépourvues des molécules co-stimulatrices (CD80, CD86, CD40) nécessaires à l'activation des cellules T CD8+ mais expriment très fortement PD-L1 (Tewalt et al., 2012). Ainsi les LECs des ganglions (LN-LEC) sont capables de capter et cross-présenter des auto-antigènes issus de la lymphe via le CMH-I et d'induire la suppression des LTCD8+ naïves autoréactives (Lund et al., 2012). En situation de cancer, les LN-LEC sont alors capables de cross-présenter des antigènes issus de la tumeur et altérer ainsi la réponse CD8 anti-tumorale (Jalkanen and Salmi, 2020; Lund et al., 2012).

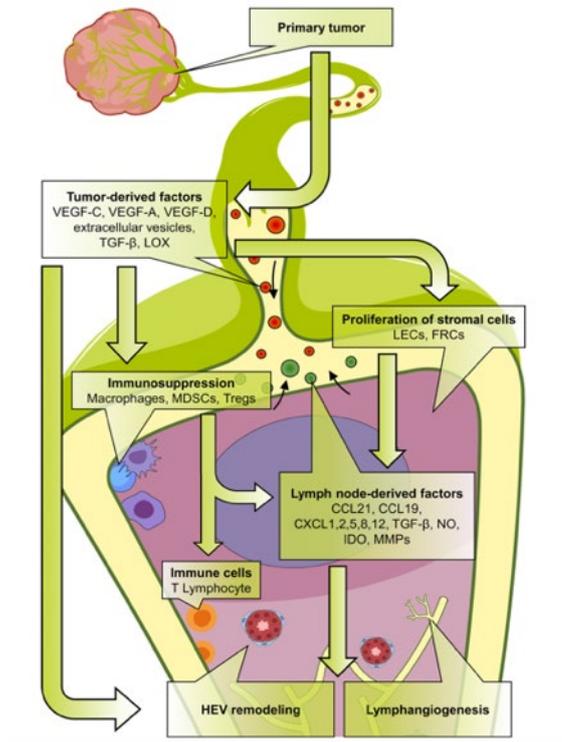


Figure 8. Niche pré-métastatique ganglionnaire. Les facteurs dérivés de la tumeurs (VEGF, EV) induisent une immunosuppression locale (MDSC, Tregs), une lymphangiogenèse, un remodelage des HEVs. (Gillot et al., 2021)

2) Ganglion lymphatique drainant la tumeur : organe lymphoïde secondaire

Les mécanismes impliqués dans la formation de la niche-prémetastatique permettant le développement de métastases intra-ganglionnaires sont désormais de mieux en mieux décrits. A l'inverse, la description de la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale intra-ganglionnaire n'est encore qu'à ses débuts.

Après le processus de sélection du lymphocyte T CD8 pertinent vient l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8 dans le ganglion. Les lymphocytes se différencient en cellules mémoires largement distribuées dans le corps et divisées en différentes sous-populations en fonction de leur mode de circulation et de leurs principales fonctions. Les deux premières populations à avoir été décrites en 1999 sont les lymphocytes T CD8 centraux mémoire (T_{CM}) et effecteurs mémoire (T_{EM}) (Sallusto et al., 1999). Les T_{CM} circulent à travers les organes lymphoïdes secondaires (SLO). Ces cellules n'ont pas d'activité effectrice directe, mais sont capables de se différencier rapidement en lymphocytes T effecteurs en cas de contact avec son antigène cible. Les T_{EM} circulent entre le sang et les tissus périphériques

et ont des fonctions effectrices accrues, à savoir plus rapides et plus efficaces que celles des lymphocytes T effecteurs générés lors de la primo-infection. Dans le début des années 2010, une 3ème population de cellules mémoires localisées quant à elles au sein de différents tissus a été décrite : les T résidents mémoires (T_{RM}) (Gebhardt et al., 2009; Jiang et al., 2012; Masopust et al., 2010). Contrairement aux cellules circulantes, les T_{RM} expriment des marqueurs de rétention tissulaire et ne circulent pas. Les T_{RM} ont été décrits dans la plupart des tissus (peau, poumons, foie, cerveau, intestins...) où ils jouent le rôle de sentinelles contre les ré-infections locales et les cellules tumorales (Gebhardt et al., 2018). En 2014, la présence de T_{RM} au sein des SLO -dont les ganglions- a été pour la première fois décrite dans des modèles murins d'infection chronique (Schenkel et al., 2014). En effet, les SLO étant la première ligne de défense où se déroule la première rencontre avec les antigènes, Schenkel et al. ont émis l'hypothèse de la présence de T_{RM} au sein des SLO (SLO- T_{RM}). Ils ont ainsi objectivé dans un modèle murin d'infection chronique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), la présence de lymphocytes T CD8 spécifiques du LCMV au sein des SLO ayant un phénotype T_{RM} , avec notamment l'expression de CD69 à leur surface. Des expériences de parabiose, ont montré que ces lymphocytes T CD8+CD69+ ne circulaient pas, démontrant ainsi leur rôle de résidents. Ces T_{RM} des SLO se situaient au niveau de la zone de première rencontre avec les antigènes : au niveau des sinus des ganglions lymphatiques et au niveau de la pulpe rouge de la rate. La même équipe a montré en 2018 (Beura et al., 2018) dans le même modèle murin d'infection chronique qu'une re-stimulation des T_{RM} des tissus périphériques entraînait une augmentation des T_{RM} spécifiques au sein des SLO. Ces SLO- T_{RM} pourraient dériver des T_{RM} présents dans les tissus périphériques. Enfin, les SLO- T_{RM} semblent exprimer des gènes communs aux T_{RM} présents dans les tissus périphériques et aux T_{CM} .

Cette population CD8+ T_{RM} a récemment été décrite dans les tissus lymphoïdes humains (Sathaliyawala et al., 2013; Thome et al., 2014; Woon et al., 2016) notamment dans le cadre d'infections chroniques.

En 2018, la même équipe qui a mis en évidence la présence de la population SLO- T_{RM} a montré chez les patients VIH+, la présence de lymphocytes T_{RM} CD8+ spécifiques du VIH au sein des ganglions de patients *elite controllers*, c'est-à-dire capable de contrôler spontanément la répllication virale en absence de traitement anti-rétroviral (Buggert et al., 2018). Des analyses par RNA-Seq ont montré que ces T_{RM} spécifiques du VIH exprimaient des gènes d'une signature effectrice et cytotoxique, suggérant ainsi que les T_{RM} spécifiques du VIH pourraient jouer le rôle de cellules effectrices au sein des ganglions permettant le

contrôle de l'infection. Cette étude a notamment pointé du doigt l'incapacité des études antérieures -qui s'intéressaient essentiellement aux composantes lymphocytaires sanguines- à saisir la composante principale de la réponse T CD8+ spécifique du VIH résidant dans les ganglions lymphatiques.

Cette même observation pourrait être faite dans le cancer. En effet, l'étude de l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules mémoires T_{CM}, T_{EM} et T_{RM} s'est largement concentrée sur les tumeurs primaires, tandis que ces données sont largement insuffisantes au niveau des ganglions. En septembre 2021, Molodtsov et al. (Molodtsov et al., 2021) ont montré dans un modèle murin de mélanome la présence de T_{RM} spécifiques de tumeur au sein des ganglions drainant la tumeur et que cette population était nécessaire au contrôle de la maladie au sein des ganglions lymphatiques. Afin d'étendre ces observations à l'Homme, les ganglions régionaux issus de patients atteints de mélanome ont été étudiés par immunohistochimie et par analyse d'expression de gènes. Des lymphocytes CD8+CD69+ étaient bien présents au sein des ganglions métastatiques et se trouvaient à l'interface avec les cellules métastatiques. Des analyses en immunofluorescence montraient la présence de cellules CD8+CD103+CD69+ au sein de ces ganglions métastatiques. Une analyse transcriptomique des lymphocytes T issus d'un ganglion métastatique d'un patient atteint de mélanome a permis de mettre en évidence 4 clusters transcriptomiques dont un exprimant les caractéristiques de T_{RM}. Afin d'étudier la signification pronostique de la présence de T_{RM} au sein des ganglions les auteurs ont identifié une signature transcriptomique à partir des gènes les plus exprimés (LN-T_{RM}). Cette signature fut ensuite testée sur l'ensemble des données de mélanome de la base de données TGCA (The Cancer Genome Atlas). Les patients ayant une signature LN-T_{RM}^{HI} avait en moyenne une médiane de survie globale de 670 jours plus longue que les patients LN-T_{RM}^{LO}. Ainsi, les T_{RM} intra-ganglionnaires semblent être présents dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de mélanome et une signature transcriptomique LN-T_{RM} est prédictive d'une meilleure survie globale.

L'impact de la composante innée intra-ganglionnaire en termes d'extension tumorale intraganglionnaire et de survie a également été étudié. Ainsi, dans le mélanome, une forte densité en macrophages (CD68+) et en cellules endothéliales (CD34+) était retrouvée au niveau des ganglions sentinelles. Cette densité était d'autant plus forte que le ganglion sentinelle présentait un envahissement tumoral. Dans la même étude aucune différence en termes de densité en cellules NK NKp46+ n'était retrouvée entre les ganglions sentinelles envahis ou non, une tendance à une plus forte infiltration en T CD8+ était retrouvée dans les

ganglions non envahis. Une corrélation entre la densité en NK NKp46+ et le taux de récurrence à 5 ans était retrouvée dans cette étude (Messaoudene et al., 2015).

Ces dernières années ont été marquées par l'avènement des immunothérapies dans la prise en charge oncologique. Il est très largement admis que les mécanismes sous-jacents au fonctionnement de ces immunothérapies sont le résultat de la réactivation des lymphocytes T dirigés contre les cellules tumorales au sein de la tumeur, toute l'attention scientifique s'est ainsi tournée vers l'étude de ce microenvironnement au dépend des ganglions drainant la tumeur. Mais des études récentes, sur le **rôle des ganglions lymphatiques drainant la tumeur dans la réponse aux immunothérapies** ont suscité un regain d'intérêt pour l'étude de ces ganglions. En effet, plusieurs études pré-cliniques ont montré l'importance des ganglions drainant la tumeur dans l'efficacité des immunothérapies par anti PD-1/PD-L1. Fransen et al. (Fransen et al., 2018) ont montré sur des modèles murins de tumeurs du colon (MC38 colon carcinoma) qu'une immunothérapie par anti PD-1 induisait une augmentation du nombre total de lymphocytes dans les ganglions drainant la tumeur, qui n'était pas retrouvée dans les ganglions ne drainant pas la tumeur. Ceci suggère qu'une **immunothérapie anti PD-1 pourrait induire une activation des lymphocytes T dans les ganglions drainant la tumeur**. L'ablation chirurgicale des ganglions drainant la tumeur chez ces souris avant l'administration de l'immunothérapie par anti PD-1 et anti PD-L1 entraînait une moins bonne réponse (taille de la tumeur et survie) par rapport aux souris contrôles, suggérant **un rôle important de la circulation lymphocytaire entre le site de la tumeur et les ganglions drainant la tumeur pour une efficacité optimale de l'immunothérapie**.

Enfin, en comparant le niveau d'infiltration immunitaire (cellules CD45+) au niveau du microenvironnement tumoral (TME) chez les souris ayant subi ou non l'ablation des ganglions drainant la tumeur et mises sous anti-PD1, les auteurs ont montré une différence significative de la densité leucocytaire au sein du TME : les souris dont les ganglions étaient présents présentaient un infiltrat plus important. Les auteurs suggèrent ainsi que le traitement par anti-PD1 permettrait de **lever l'inhibition des lymphocytes T CD8+ au sein des ganglions drainant la tumeur entraînant ensuite un influx de ces lymphocytes effecteurs au sein du microenvironnement tumoral**. Ainsi les ganglions drainant la tumeur semblent jouer un rôle clé dans la régulation de la réponse anti-tumoral et dans le degré d'efficacité thérapeutiques des immunothérapies par PD-1 et PD-L1 dans un modèle murin de tumeur. D'autres études ont montré le rôle des ganglions drainant la tumeur dans l'efficacité des immunothérapies dans des modèles pré-cliniques (Dammeijer et al., 2020; Fransen et al., 2018)

Ces données sont des arguments forts en faveur de la préservation des ganglions lymphatiques drainant la tumeur et de l'adjonction d'une immunothérapie néo-adjuvante afin de booster les capacités anti-tumorales des lymphocytes présents au niveau ganglionnaire. Aujourd'hui plus de 150 études cliniques sont en cours afin d'évaluer l'intérêt et la place de l'immunothérapie en tant que traitement néoadjuvant, associé ou non à des traitements classiques dans le cancer (radiothérapie, chimiothérapie). L'intérêt d'étudier non pas le seul microenvironnement tumoral mais aussi les ganglions drainant la tumeur semble aujourd'hui crucial afin de pouvoir comprendre les différents mécanismes de réponse et de non réponse à ces traitements. Dans une revue récente, Fransen et al. (Fransen et al., 2021) prônent pour l'étude immunologique systématique et approfondie des ganglions drainant la tumeur et ainsi reconsidérer le rôle des ganglions dans les traitements par immunothérapie.

Cette remarque semble également pertinente pour tout traitement néoadjuvant (notamment dans le cancer du rectum), en effet les traitements néoadjuvants entraînent un remaniement des cellules tumorales avec libération d'antigènes de tumeurs, qui pourrait induire une réponse immunitaire au niveau des ganglions lymphatiques drainant la tumeur, ainsi une exérèse systématique des ganglions ne semblent plus aujourd'hui être la seule option thérapeutique.

Il nous est donc paru essentiel d'analyser le retentissement ganglionnaire lors de la nCRT afin d'évaluer le bénéfice potentiel de la préservation des ganglions lors des stratégies de W&W.

OBJECTIFS

Les objectifs définis lors de l'initiation de mon travail de Thèse étaient :

- D'analyser la composante immunitaire du microenvironnement tumoral des cancers du rectum localement avancés avant traitement, et d'étudier son association avec la qualité de la réponse induite par la radiochimiothérapie néoadjuvante et la survie des patients.
- D'analyser la composante immunitaire du microenvironnement tumoral et des ganglions drainant après radiochimiothérapie néoadjuvante en relation avec la qualité de réponse au traitement observé
- D'évaluer la valeur pronostique et prédictive de la réponse au traitement du test Immunoscore appliqué aux biopsies diagnostiques
- D'évaluer l'apport de la prise en compte de la composante immunitaire des tumeurs du rectum localement avancées traitées par radiochimiothérapie néoadjuvante pour une évolution de la prise en charge thérapeutique des patients, à type de :
 - Stratégie de conservation d'organe (Watch and Wait)
 - Renforcement thérapeutique lors du traitement néoadjuvant et en situation adjuvante
 - Combinaison potentielle avec une immunothérapie ciblant les immune checkpoints

RESULTATS

Partie I. Article 1: A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait

Contexte : Évaluation de l'infiltration immunitaire sur biopsie : un objectif atteignable ?

Le traitement de référence du cancer du rectum localement avancé est la radiochimiothérapie néoadjuvante. Ce traitement entraîne au niveau systémique et local de profondes modifications notamment architecturales au sein de la tumeur rendant impossible l'analyse du microenvironnement tumoral sur la pièce de résection opératoire. En effet, la détermination des zones tumorales (CT) et de la marge d'invasion (IM) est d'autant plus aléatoire que le patient sera bon répondeur au traitement néoadjuvant. De plus la quantification de l'infiltrat immunitaire au niveau de la pièce opératoire réséquée sera en partie le reflet des modifications induites localement par le traitement néoadjuvant.

Ainsi, le seul tissu vierge de tout traitement est la biopsie initiale effectuée lors de la colonoscopie diagnostique.

L'étude immunitaire de ce tissu de petite taille, précieux, prélevé lors de la coloscopie diagnostique au niveau de zones cliniquement « suspectes », pourrait non seulement poser le diagnostic de cancer mais également amener à proposer des repositionnements thérapeutiques notamment en termes de traitement néoadjuvant. Cependant, la faisabilité de cette investigation immunitaire et surtout la représentativité de ce prélèvement n'étaient pas évidentes : il s'agit d'un tissu petit où seule l'analyse de la zone tumorale et non de la marge d'invasion est possible.

Afin d'étudier la faisabilité, la reproductibilité et la fiabilité de l'évaluation de l'infiltrat immunitaire sur les biopsies, nous nous sommes appuyés sur différents travaux de l'équipe :

1) Un échantillonnage de la tumeur permet d'observer une valeur pronostique en termes de DFS dans les CRC

Des travaux réalisés il y a déjà 10 ans au sein de notre équipe (non publiés) avaient posé la question de l'impact de l'échantillonnage de la tumeur sur la valeur pronostique associée

pour les paramètres CD3 et CD8. L'équipe avait tiré avantage de l'apport de la pathologie digitale pour l'analyse des immunomarquages des régions tumorales, issues des pièces opératoires, afin de « simuler » *in silico* la situation de prélèvement biopsique. En effet, chaque région analysée par le logiciel d'analyse d'images était divisée en tuiles de 0.72 mm de côté (100 à 700 tuiles pour une tumeur). Nous avons déterminé, sur une cohorte de 230 patients présentant un CCR, quel serait le nombre minimum de tuiles jointives à analyser (3, 5, 10, ou 40), pour obtenir de façon reproductible (1000 tirages au sort de chaque nombre de tuiles analysées par patient) une valeur pronostique, en termes de DFS, pour chaque marqueur d'intérêt. Les résultats présentés dans le **Tableau 2** donnent la moyenne, la médiane, la SD et la p value du HR comparant les patient IS High au patients IS Low (cut off à la médiane) pour la région tumorale (CT). Ainsi, une valeur pronostique significative était observée dès une surface tumorale de 3 tuiles et augmentait suivant le nombre de tuiles analysées. La performance était plus importante pour le marqueur CD3 que le marqueur CD8. Ceci montrait la forte performance pronostique de l'évaluation immunitaire en termes de DFS, observée dès l'analyse de 3 tuiles et permettait d'envisager la faisabilité d'une évaluation immunitaire sur biopsies pour ces marqueurs d'intérêt.

Tableau 2. Moyenne, médiane, déviation standard (SD) comparant les patients avec un IS fort (Hi) et faible (Lo) en fonction du nombre de tuiles analysées

Name	mean_hr.median	median_hr.median	sd_hr.median	mean_hr.pv.median	median_hr.pv.median	sd_hr.pv.median
CD3CT-HivsLo_03_tiles	0,469402	0,4565	0,114467844	0,051229084	0,016033094	0,093044148
CD3CT-HivsLo_05_tiles	0,438977	0,427	0,09833444	0,029759976	0,008184095	0,055844834
CD3CT-HivsLo_10_tiles	0,412208	0,407	0,078645189	0,015142306	0,004861849	0,032114809
CD3CT-HivsLo_20_tiles	0,393517	0,388	0,061780001	0,007753643	0,002991995	0,014139723
CD3CT-HivsLo_40_tiles	0,380273	0,376	0,053223973	0,005040151	0,00206209	0,009669577
CD8CT-HivsLo_03_tiles	0,479178	0,466	0,112353057	0,055107966	0,016042985	0,097015585
CD8CT-HivsLo_05_tiles	0,462243	0,449	0,100781193	0,04168924	0,011605529	0,077275513
CD8CT-HivsLo_10_tiles	0,451807	0,4455	0,082994686	0,029269346	0,011074314	0,051615859
CD8CT-HivsLo_20_tiles	0,451784	0,448	0,072006321	0,025031226	0,011866201	0,037700658
CD8CT-HivsLo_40_tiles	0,466819	0,463	0,064637359	0,029075708	0,01644712	0,039680748

2) Cet échantillonnage de la tumeur est-il pour autant un reflet exact de la qualité de l'infiltration immunitaire de la totalité de la surface tumorale ?

2.1) Il existe une hétérogénéité d'infiltrat CD3+ et CD8 + dans les cancers colorectaux

Nous avons récemment évalué et modélisé l'hétérogénéité de l'infiltrat lymphocytaire (CD3, CD8) au sein des tumeurs de côlon (travaux non encore publiés). L'hétérogénéité était définie par différentes mesures statistiques telles que l'étendue, la déviation standard, le coefficient de variation ou encore l'entropie. L'idée directrice de ce travail est d'évaluer si la prise en

compte additionnelle de l'hétérogénéité permettrait d'améliorer la performance pronostique de l'IS.

Au sein d'une tumeur du côlon classée parmi une même catégorie d'IS (IS low, intermediate ou high) deux profils d'infiltration en CD3 et CD8 ont pu être mis en évidence (**Figure 9**) :

- un **profil « homogène »** où l'ensemble des « tuiles » (carré de 720 µm de côté permettant la segmentation du tissu analysé) de la tumeur étudiée avait une densité lymphocytaire identique
- un **profil « hétérogène »** dans lequel une différence importante en terme de densité lymphocytaire au niveau des tuiles comparées entre elles était observée. Cette l'information était ainsi « lissée » par la mesure de la densité globale.

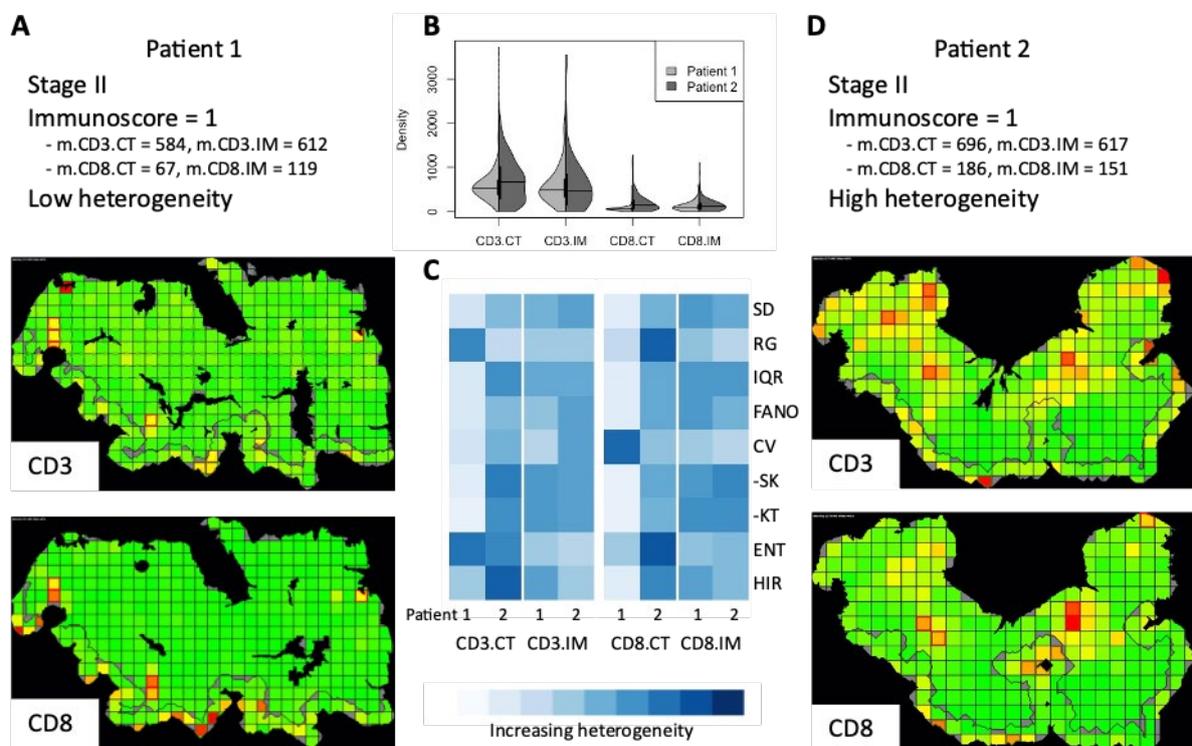


Figure 9. Variabilité de l'infiltration lymphocytaire au sein d'une tumeur classée Immunoscore 1.

Cette constatation de l'hétérogénéité d'infiltrat au sein de la tumeur est à garder en mémoire dans l'analyse d'un tissu de petite taille telle que les biopsies. Ainsi, le calcul de la densité immunitaire du marqueur CD3 ou CD8 sur biopsie, pourrait ne pas être représentatif du reste de la tumeur dans le cadre d'une infiltration de type hétérogène.

2.2) La surface de biopsie tumorale (environ 10% de la surface analysée en pleine lame) est insuffisante pour refléter la densité moyenne de l'ensemble de la région CT

La surface de tissu analysée sur une biopsie représente en moyenne 10% de la surface tissulaire totale analysée sur une lame de fragment de la pièce opératoire. Ainsi, compte tenu de la faible surface analysée, la question de la représentativité de la densité immunitaire déterminée sur biopsie doit être soulevée. Dans une étude précédemment publiée par l'équipe, la surface minimale à analyser afin d'être représentatif de l'ensemble de la tumeur a été déterminée (Marliot et al., 2020). Ainsi l'étude de 55 à 78% de la surface totale de chaque région (CT et IM) était nécessaire pour obtenir une estimation fiable ($\pm 10\%$) des densités moyennes de CD3+ ou CD8+ pour 50% des patients de la cohorte (**Figure 10**).

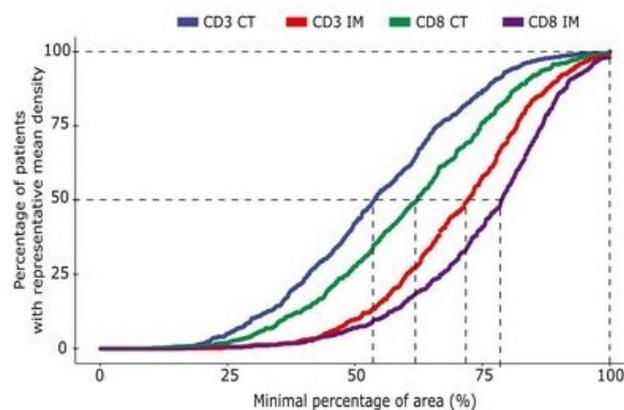


Figure 10. Surface minimale (%) requise pour chaque marqueur (CD3+ et CD8+), dans chaque région (CT et IM) permettant d'estimer une densité en cellules immunitaires égale à celle de la région entière chez 538 patients (Marliot et al., 2020).

L'analyse de l'infiltrat immunitaire sur la biopsie diagnostique -ne représentant qu'en moyenne 10% de la surface analysée sur pièce opératoire-, ne renseigne pas avec précision sur la valeur de la densité moyenne de l'ensemble de la région d'intérêt.

2.3) Plus la densité est faible, plus la surface nécessaire à prendre en compte doit être importante pour refléter la densité moyenne de la région

Dans la même étude (Marliot et al., 2020), les données suggéraient que la surface minimale à analyser sur une biopsie pour obtenir une densité immunitaire représentative de la densité immunitaire de l'ensemble de la région (CT ou IM) était d'autant plus grande que l'infiltrat

immunitaire était faible (**Figure 11**), cet effet était plus prononcé dans la région CT que dans la région IM.

Cette information était également à prendre en compte dans l'analyse de l'infiltrat immunitaire au sein des biopsies. Ainsi, un résultat de faible infiltration d'une biopsie tumorale doit être pris avec précaution compte tenu de la faible surface analysée (risque de sous-estimation de la densité réelle du marqueur immunitaire).

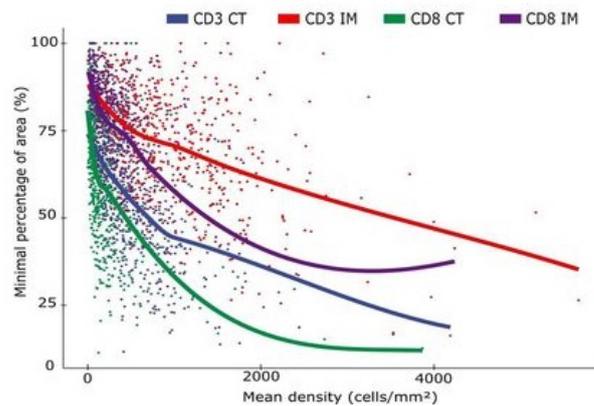


Figure 11. Impact de la densité des cellules immunitaires (CD3+ et CD8+) (représentée en abscisse) dans chaque région d'intérêt (CT et IM) sur la surface minimale nécessaire à analyser (représentée en ordonnée) pour obtenir une densité en cellules immunitaires égale à celle de la région entière (Marliot et al., 2020)

3) La biopsie ne permet pas d'analyser la marge d'invasion : conséquences potentielles

Sur une large cohorte de patients présentant un CCR (n=538), nous avons observé que les densités immunitaires des marqueurs CD3 et CD8 dans les deux régions d'intérêt (la tumeur (CT) et son front d'invasion (IM)) n'étaient que faiblement corrélées (r^2 CT vs IM = 0,61 pour le CD3 et de 0,68 pour les CD8) (**Figure 12**). Ainsi, l'évaluation de la densité immunitaire dans la tumeur ne nous renseigne pas sur la densité observée dans la marge d'invasion.

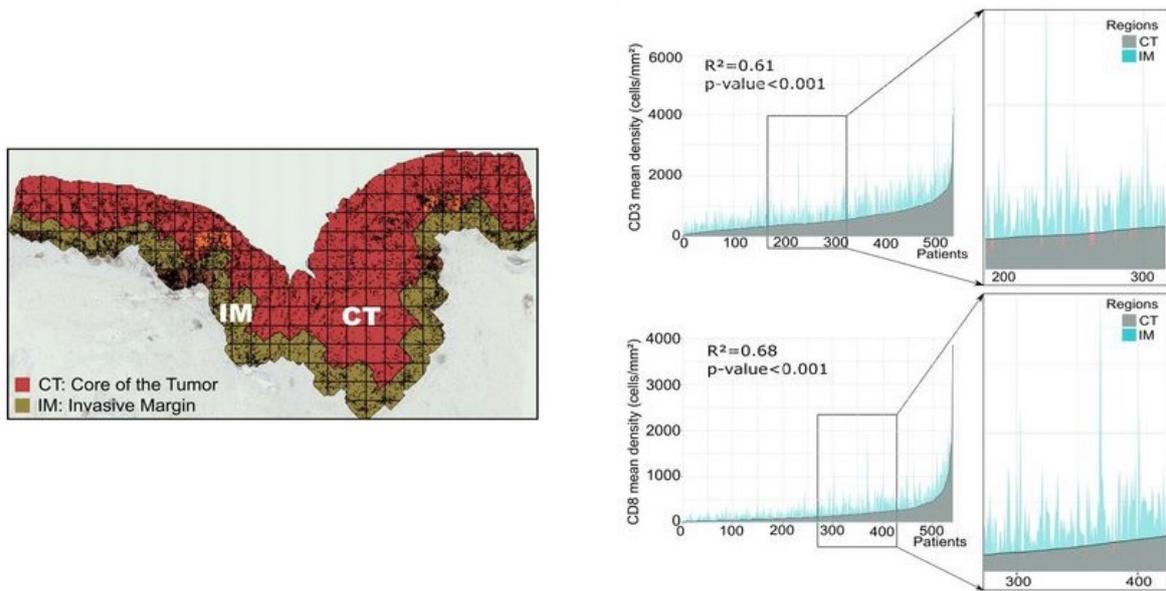


Figure 12. Comparaison des densités moyennes de cellules T CD3+ ou CD8+ dans le CT (en gris) et dans l'IM (en bleu) pour chaque patient de la cohorte (n=538). Les patients sont classés par ordre croissant de densité de cellules immunitaires dans la région CT. Les corrélations de Spearman avec R pour CT vs IM sont fournies pour chaque marqueur.

Les études initiales menées par notre équipe avaient montré l'importance de chacune de ces deux régions pour la prédiction de la survie sans récurrence (**Figure 13**) et de la survie globale (non montré). Ainsi, l'absence de prise en compte de la marge d'invasion constitue une perte d'information sur le plan pronostique.

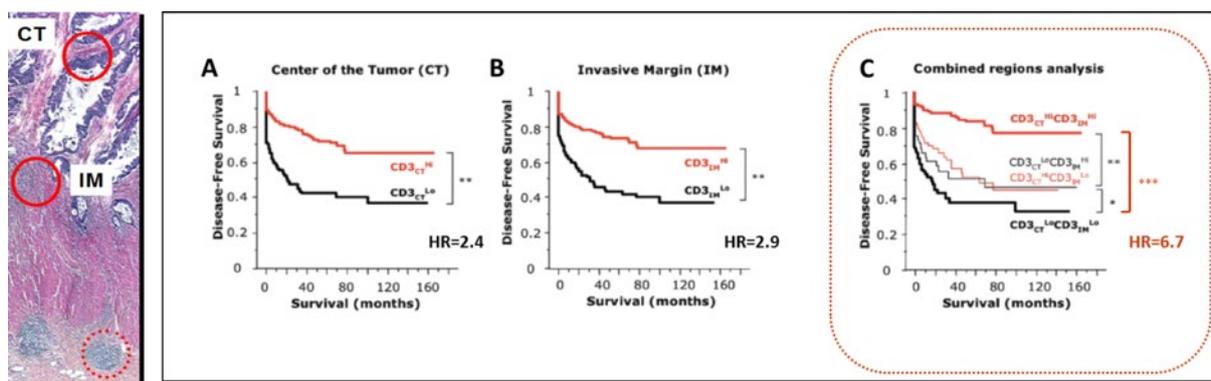


Figure 13. Courbes de Kaplan-Meier illustrant la DFS en fonction de la densité en CD3 (forte Hi ou Faible Lo) dans le centre de la tumeur (CT) (A), la marge d'invasion (B), ou en combinant les deux régions (C).

4) L'IS appliqué aux biopsies (IS_B), comme variable catégorielle, permet d'atténuer les variations de densités observées entre les biopsies et les pièces opératoires

J'ai testé quel était le degré de concordance entre le score immunitaire évalué sur la biopsie (**Figure 14**) et celui fourni par l'ensemble de la tumeur, accessible après l'acte de chirurgie d'exérèse. 33 tumeurs du côlon ont été analysées. Les résultats sont représentés dans la **Tableau 3**. Une corrélation partielle a été observée entre les 2 scores (test kappa = 0.45 ; P=0.0004). 60% des tumeurs (19/33) présentaient un IS identique. L'ensemble des discordances ne portaient que sur une catégorie d'IS. Ceci montre en particulier l'intérêt d'un score immunitaire en catégories permettant de supporter des variations de densités.

Tableau 3. Concordance entre IS calculé sur pièce opératoire et IS_B associé

		IS resected tumor		
		Low	Int.	High
IS-Biopsy	Low	4	1	0
	Int.	2	7	3
	High	0	8	8

Kappa = 0.45; P = 0.0004
Int. = Intermediate

Ainsi, l'IS réalisé sur biopsie ne renseigne que sur la qualité d'infiltration immunitaire (CD3, CD8) dans la région tumorale, sans information sur la marge d'invasion. Cette information n'est pas un reflet exact de l'ensemble de la tumeur, et présente qu'un degré de concordance partiel avec l'IS de la pièce opératoire complète. Les simulations informatiques réalisées sur pièces opératoires suggèrent cependant fortement que cet échantillonnage de tumeur pourrait fournir un marqueur robuste et reproductible avec de bonnes performances pronostiques.

Résultats

1/ Détermination d'un Immunoscore biopsie (IS_B)

Actuellement, aucun biomarqueur permettant une prise en charge personnalisée des cancers du rectum localement avancés n'est utilisé en pratique clinique. Afin de répondre à cette problématique et de transposer les résultats obtenus dans le cancer du côlon grâce à l'Immunoscore établi sur la pièce opératoire, nous avons élaboré un Immunoscore (IS Biopsy, IS_B) adapté au seul tissu disponible avant tout traitement néoadjuvant : la **biopsie diagnostique**.

Les biopsies diagnostiques ont été immunomarquées en CD3 et CD8 selon les protocoles précédemment décrits (Pagès et al., 2018), les cellules marquées ont été quantifiées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Developper XD image analysis software, Definiens). Seule la zone tumorale (CT, **Figure 14**) de la biopsie diagnostique était étudiée. Les zones de dysplasie et de tissu sain sont exclus du calcul de l'IS_B.

Les densités de cellules CD3⁺ et CD8⁺ obtenues dans la tumeur ont ensuite été converties en percentiles en se référant aux densités obtenues sur l'ensemble de la cohorte analysée, en suivant la méthodologie publiée pour le côlon (Pagès et al., 2018). La moyenne des percentiles pour CD3 et CD8 (IS_B meanscore, « Mean percentile » dans la **Figure 14**) a ensuite été déterminée pour chaque patient puis catégorisée en IS_B High (>70-100%), Intermediate (>25-70%) ou Low (0-25%) (**Figure 14**).

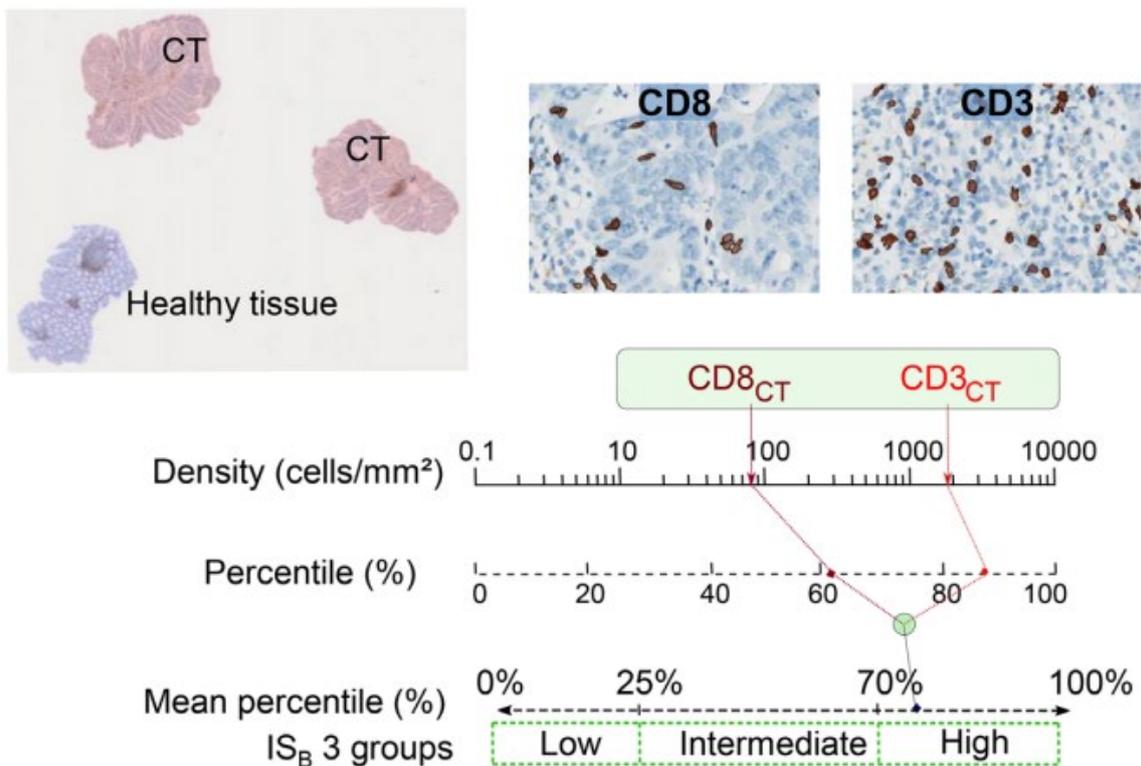


Figure 14. Méthodologie de détermination de l'IS_B

2/ IS_B et pronostic

Deux cohortes indépendantes de 131 et 118 patients traités pour un cancer du rectum par traitement néoadjuvant ont été constituées.

Dans la première cohorte monocentrique de 131 patients, une différence significative en termes de survie sans récurrence (DFS) a pu être observée entre les différentes catégories d'IS_B, P test for trend (P_{ftt}) = 0.012; $HR_{\text{High vs. Low}} = 0.21$ [0.06–0.78]).

Les patients avec un IS_B high étaient à moindre risque de rechute que les patients faiblement infiltrés au niveau de leur biopsie diagnostique initiale avec une DFS à 5 ans de 91,1% [82-100] chez les IS_B high *versus* 65,8% [49,8-86,9] chez les IS_B low.

Cette différence a également été retrouvée en termes de survie globale (OS), de délai avant la survenue d'une rechute (TTR).

Les mêmes résultats ont été observés dans la cohorte de validation de 118 patients.

3/ IS_B et réponse au traitement néoadjuvant

Le caractère prédictif de l'IS_B vis-à-vis de la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant a également été étudié. La qualité de la réponse est évaluée par différents moyens : radiologique (ycTNM) et anatomopathologique sur la pièce opératoire (Classification de Dworak, ypTNM, downstaging, score NAR)

Sur l'ensemble des patients des 2 cohortes étudiées (n=249), une forte densité en CD3 et en CD8 sur la biopsie initiale était corrélée avec un bon degré de réponse au traitement néoadjuvant. Ces mêmes résultats étaient observés pour le « meanscore » et la classification en 3 catégories d'IS_B. Aucun patient avec un IS_B fort n'était observé dans le groupe de non répondeurs (Dworak 0).

Afin d'étudier les conséquences immunitaires du traitement néoadjuvant, j'ai effectué une analyse transcriptomique (Nanostring) à partir des ARNs extraits de coupe de bloc tumoraux FFPE de pièce opératoire (n=62). Seule la région tumorale a été analysée.

Pour cette analyse un panel de 48 gènes a été utilisé. Ce panel a été sélectionné à partir des travaux réalisés au sein de notre équipe sur la valeur pronostique de gènes immunitaires exprimés dans le cancer colorectal. Il regroupe principalement des gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GNLY*, *GZMA*, *CD8*), l'activation (*ICOS*, *CD69*), la costimulation positive ou négative (*CD274*, *PDCD1*, *LAG3*, *CTLA-4*), l'orientation Th1 (*TBX21*, *STAT4*), Th17 (*IL17*), le chimiotactisme des monocytes/macrophages (*CCR2*, *CCL2*, *CCL5*) ainsi que des gènes de ménage (*ACTB*, *GUSB*, *SP2*, *VPS33B*)

Un clustering hiérarchique non-supervisé montrait 2 profils d'activation immunitaire :

- Un premier regroupant 19 patients (30,6%) qui présentaient une surexpression des gènes étudiés signant une activation immunitaire après le traitement néoadjuvant.
- Un second regroupant 43 patients (69,4%) dont le niveau d'expression des gènes étudiés était faible

La majorité des patients non répondeurs à la nRCT (Dworak 0-1) se comportaient comme les patients contrôles qui n'avaient pas reçu de traitement néoadjuvant (niveau d'expression de gènes faible).

Le statut d'activation immunitaire était positivement corrélé au degré d'infiltration initial de la tumeur évaluée sur la biopsie diagnostique (IS_B). Ainsi, parmi les patients présentant un profil immunitaire « activé » sur la pièce opératoire 42,1% des patients avec un IS_B High contre 16,1% chez les patients présentant un profil « non activé ».

La comparaison du niveau d'expression de gènes immunitaires entre les tumeurs ayant (Dworak 1-4) ou non (Dworak 0) répondu à la nRCT a révélé l'existence d'une augmentation significative ($P < 0,05$) du niveau d'expression de gènes impliqués dans la cytotoxicité (*GZMA*, *GZMH*, *GZMK*, *PRF-1*), dans la réponse Th1 (*TBX21*, *STAT4*), dans l'activation, (CD69) ainsi que des gènes codant pour les molécules de costimulation inhibitrice (*CTLA-4*, *LAG3*).

Une analyse en composantes principales (CPA) ciblée sur les gènes différentiellement exprimés entre les patients répondeurs et non-répondeurs à la nRCT permettait de distinguer 6 groupes de patients en fonction de la présence ou non d'un traitement néoadjuvant et du niveau de degré de réponse à ce traitement.

Ces données suggèrent un lien entre le degré d'infiltration initiale de la tumeur, l'activation immunitaire post-traitement au sein de la tumeur et la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant.

4/ IS_B : biomarqueur pouvant optimiser la prise en charge des patients atteints de cancer du rectum localement avancé

Afin d'étudier le potentiel clinique de l'IS_B, nous avons combiné les informations cliniques et anatomopathologiques disponibles aux différents stades de la prise en charge du patient :

Au moment du diagnostic (cTNM), après le traitement néoadjuvant (ycTNM) et après la chirurgie (ypTNM, Dworak).

Dans un modèle multivarié de Cox, l'IS_B était le paramètre prédictif le plus important en termes de survie sans récurrence (DFS) comparé aux paramètres cliniques disponibles avant la chirurgie cTNM (IS_B high vs low HR= 0,2 ; $P < 0,001$) et ycTNM (IS_B high vs low HR= 0,25 ; $P = 0,039$).

La prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant par l'imagerie n'est pas optimale, en effet seuls 25 à 50% des patients classés en réponse clinique complète ont effectivement une disparition du contingent tumoral sur la pièce opératoire. La combinaison de l'IS_B avec le degré de réponse déterminé en imagerie (ycTNM) permettait une meilleure prédiction de la réponse anatomopathologique.

Ainsi la combinaison de l'IS_B au degré de réponse établie en imagerie pourrait permettre une meilleure sélection des patients éligible à une stratégie de préservation d'organe.

5/ IS_B et stratégie de préservation d'organe (Watch and Wait)

Nous avons pu avoir accès aux biopsies diagnostiques de patients suivis par la stratégie de préservation d'organe. Ces biopsies provenaient de centres répartis dans le monde (France, Belgique, Portugal, Brésil). Au moment de ces analyses cette stratégie novatrice était à ses débuts et l'analyse de ces biopsies précieuses était l'occasion d'étudier le rôle pronostique de l'IS_B dans ce cadre de la non-résection de la tumeur.

Ainsi, les biopsies de 73 patients très bons répondeurs et suivis par surveillance rapprochée après la nRCT a été analysé.

Parmi ces patients très bons répondeurs 23 %, 51% et 26% étaient classés en IS_B high, intermediate et low respectivement. Le délai avant rechute était significativement différent entre les différences groupes d'IS_B ($P_{\text{tft}} = 0,033$, $P_{\text{high vs low}}=0,025$).

Aucune rechute n'a été observée dans ce groupe de 73 patients suivis par la stratégie de conservation d'organe présentant un IS_B high sur la biopsie diagnostique (délai de suivi 8 ans).

Conclusion

- Nous avons montré la faisabilité de l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire (CD3 et CD8) par l'IS_B au sein d'un tissu de petite taille où seule la zone tumorale pouvait être analysée.
- Nous proposons ici un nouveau biomarqueur, l'IS_B, qui pourrait permettre de :
 - prédire la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant dès le diagnostic de cancer du rectum localement avancé

- prédire le devenir en termes de survie sans récurrence et survie globale des patients traités par traitement néoadjuvant et opérés
- prédire le devenir en termes de survie sans récurrence chez les patients bons répondeurs au traitement néoadjuvant et inclus dans une stratégie de préservation d'organe
- sélectionner les patients pouvant être éligibles à cette stratégie de préservation d'organe ou nécessitant une intensification du traitement.

A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait Strategy



Carine El Sissy^{1,2}, Amos Kirilovsky^{1,2}, Marc Van den Eynde³, Ana-Maria Mușină⁴, Maria-Gabriela Anitei⁴, Alfredo Romero⁵, Florence Marliot^{1,2}, Audelaure Junca⁶, Jérôme Doyen⁷, Bernhard Mlecnik^{2,8}, Nacilla Haicheur¹, Tessa Fredriksen², Christine Lagorce^{1,2}, Anne Jouret-Mourin³, Daniel Leonard³, Frédéric Bibeau⁹, Soledad Iseas¹⁰, Enrique L. Roca¹⁰, Ana M. Cabanne¹⁰, Carlos A. Vaccaro¹¹, Juan P. Santino¹¹, Eduardo Huertas¹², David Tougeron⁶, Carlos Carvalho¹³, Nuno Figueiredo¹³, Rodrigo O. Perez¹⁴, Angelita Habr-Gama¹⁴, Viorel Scripcariu³, Jean-Pierre Gerard⁶, Jérôme Galon², Guy Zeitoun¹, and Franck Pagès^{1,2}

ABSTRACT

Purpose: No biomarker to personalize treatment in locally advanced rectal cancer (LARC) is currently available. We assessed in LARC whether a diagnostic biopsy-adapted immunoscore (IS_B) could predict response to neoadjuvant treatment (nT) and better define patients eligible to an organ preservation strategy (“Watch-and-Wait”).

Experimental Design: Biopsies from two independent cohorts ($n_1 = 131$, $n_2 = 118$) of patients with LARC treated with nT followed by radical surgery were immunostained for CD3⁺ and CD8⁺ T cells and quantified by digital pathology to determine IS_B. The expression of immune-related genes post-nT was investigated ($n = 64$ patients). Results were correlated with response to nT and disease-free survival (DFS). The IS_B prognostic performance was further assessed in a multicentric cohort ($n = 73$ patients) treated by Watch-and-Wait.

Results: IS_B positively correlated with the degree of histologic response ($P < 0.001$) and gene expression levels for Th1 orientation and cytotoxic immune response, post-nT ($P = 0.006$). IS_B high identified patients at lower risk of relapse or death compared with IS_B low [HR, 0.21; 95% confidence interval (CI), 0.06–0.78; $P = 0.009$]. Prognostic performance of IS_B for DFS was confirmed in a validation cohort. IS_B was an independent parameter, more informative than pre- ($P < 0.001$) and post-nT ($P < 0.05$) imaging to predict DFS. IS_B combined with imaging post-nT discriminated very good responders that could benefit from organ preservation strategy. In the “Watch-and-Wait” cohort ($n = 73$), no relapse was observed in patients with IS_B high (23.3%).

Conclusions: IS_B predicts response to nT and survival in patients with LARC treated by surgery. Its usefulness in the selection of patients eligible for a Watch-and-Wait strategy is strongly suggested.

Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer in the world with an increasing incidence especially in younger adults (1). In locally advanced rectal cancer (LARC), neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT) followed by radical surgery is recommended by international guidelines (2, 3). Tumor recurrence and patient's survival are strongly influenced by the quality of response to neoadjuvant treatment (nT; refs. 4–6). Recent advances in the management of patients with LARC have shown that it could be conceivable to avoid amputation of the rectum (preservative strategy; e.g., Watch-and-Wait) in patients with

clinical and imaging features compatible with a complete response to nT (7, 8). These patients experience acceptable outcomes; however, about 25% of them develop early tumor regrowth (9). There are currently no molecular markers to predict responses to nCRT and guide treatment decisions (3), such as optimization or modification of nT in nonresponding patients, and better selection of patients eligible to preservative strategy.

Tonizing radiation has the capacity to prime/reinforce an adaptive T-cell-mediated immune response, which acts in the mechanisms of local tumor regression and of distant tumor inhibition and rejection

¹Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université de Paris, Faculté de santé, Paris, France. ²Laboratory of Integrative Cancer Immunology, INSERM UMR1138, Immunology and Cancer Department, Cordeliers Research Center, Paris, France. ³Institut Roi Albert II, Department of Medical Oncology, Cliniques Universitaires St-Luc, Brussels, Belgium. ⁴University of Medicine and Pharmacy “Grigore T. Popa” Iași, Department of Surgical Oncology, Regional Institute of Oncology, Iași, Roumania. ⁵Hospital Británico de Buenos Aires, Oncología Clínica, Buenos Aires, Argentina. ⁶CHU de Poitiers, Service D'hépatogastro-entérologie et Assistance Nutritionnelle, Poitiers, France. ⁷Centre Antoine Lacassagne, Radiation Oncology, University of Côte d'Azur, Nice, France. ⁸Inovarian, Paris, France. ⁹Department of Pathology, CHU Caen, Caen, France. ¹⁰Hospital Udaondo, Oncología Clínica, Buenos Aires, Argentina. ¹¹Department of General Surgery, Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina. ¹²Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina. ¹³Digestive Department,

Champalimad Foundation, Lisbon, Portugal. ¹⁴Angelita and Joaquim Gama Institute, São Paulo, Brazil.

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

C. El Sissy and A. Kirilovsky contributed equally to this article.

Corresponding Author: Franck Pagès, Department of Immunology, Immunomonitoring Platform, Laboratory of Immunology, Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France. Phone: 331-5609-3946; E-mail: franck.pages@aphp.fr

Clin Cancer Res 2020;26:5198-207

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0337

©2020 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Biopsy-adapted immunoscore (IS_B) performed on rectal cancer biopsy samples is an adaptation of the standardized IS performed on the surgical specimen in colon cancer. First, IS_B provides a strong and independent prognostic factor for disease-free survival of patients with rectal cancer. Secondly, IS_B predicts the response to neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT). Lastly, IS_B combined with imaging post-nCRT discriminates the group of patients with a complete histologic response to nCRT (no residual tumor) that should benefit from less invasive therapeutic strategies (i.e., Watch-and-Wait or minimally invasive surgery), avoiding a disabling and useless rectal amputation surgery.

(i.e., the abscopal effect; refs. 10–12). This suggests that the quality and intensity of the natural immune reaction at tumor site before nT could influence the magnitude of response to nT and provide a predictive marker of response. Natural immune reaction at tumor site has been further associated with a favorable prognosis in various cancers (13), including colorectal cancer, treated by surgery alone (14, 15). Recent advances in digital pathology and image analysis have allowed a translation of immune assessment into a clinically relevant application (16). Using these technologies, the first standardized immune-based assay for colon cancer called “Immunoscore” (IS; i.e., the combination of CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities in the tumor and its invasive margin) has been developed. Its robustness and prognostic performance in stage I–III colon cancer have been consolidated through an international validation study (17). Thus, IS provides a reliable evaluation of the natural immune reaction at tumor site.

Preliminary studies in rectal cancer have suggested that the natural immune reaction of tumors could be evaluated on biopsies (18–20), the only sample material available before treatment. A derivation of the IS performed in initial biopsies (IS_B) before nT has the benefit of evaluating the quality of the initial immune response in the tumor and its potential influence on both the degree of response to nT and clinical outcome.

The aim of this study was to determine whether the IS_B correlates with response to nT, the *in situ* immune status after nT, and clinical outcome. We finally tested whether IS could help to better select the subgroup of patients eligible to a preservative strategy, with acceptable outcome.

Materials and Methods

Patient population

Two retrospective consecutive cohorts of patients with LARC ($n_1 = 131$, $n_2 = 118$) with available biopsies, treated by nT and radical surgery by total mesorectal excision (TME), were analyzed. Cohort 1 was a monocentric cohort, and cohort 2 was multicentric (Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S1). Inclusion period ranged from 1999 to 2016. nT and surgery criteria were defined by each institution. Overall, 64.2% of patients were male, and the median age at diagnosis was 65 years [interquartile range (IQR), 53.3–74.1]. Patients were treated by nT [short (3.7%) or long (96.3%) course of radiation; 5-fluorouracil-based chemotherapy (82%); 18% did not receive chemotherapy]. According to the clinical TNM (cTNM) classification (UICC TNM 8th edition), rectal tumors were classified as cTNM I (1.2%), II (27.3%), and III (71.5%) based on baseline staging information provided by pelvic magnetic resonance and chest/abdominal

computed tomography imaging. An additional cohort of patients ($n = 73$) with a complete/nearly complete response to nT (ycTNM 0–1), followed by a Watch-and-Wait strategy, was analyzed (Supplementary Table S2). A flow chart illustrating the studied population in each part of the investigations is provided in Supplementary Fig. S2. The median duration of follow-up for disease-free survival (DFS) of the cohort 1+2 was 45.4 months (IQR, 25.7–65.6). Duration of follow-up of each cohort for DFS, time to recurrence (TTR), and overall survival (OS) with the number of events is provided in Supplementary Table S3. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval of all the centers' Institutional Review Board committee was obtained for the study. Signed-informed consents from patients were obtained in each center.

Clinical outcomes

Patients were compared according to the degree of tumoral response to nT, using different tumor regression grade scoring systems: (i) the Dworak classification (21) defined as complete (Dworak 4), near complete (Dworak 3), moderate (Dworak 2), minimal (Dworak 1), and no regression (Dworak 0); (ii) the neoadjuvant rectal (NAR) score classification (5), calculated using the equation $[5pN-3(cT-pT) + 12]^2/9.61$, and classified as low (<8), intermediate (8–16), and high (>16); (iii) the ypTNM stage, i.e., the postsurgical pathologic T and N evaluation; and (iv) downstaging of the tumor (4), defined as complete (ypT0N0), intermediate (ypT1–2N0), or weak/absent (ypT3–4 or N+). For patients who underwent surgery, the events were local, systemic recurrences and death from the date of surgery for DFS, recurrences for TTR, and death from any cause for OS. All patients who were managed with the Watch-and-Wait strategy were considered to have clinical complete response (ycTNM0) and were offered a strict surveillance protocol.

Immunohistochemistry

Initial biopsies of all patients performed for diagnosis purpose were retrieved from all centers. Two formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue sections of 4 μ m were processed for IHC with antibodies against CD3⁺ (2GV6, 0.4 μ g/mL; Ventana) and CD8⁺ (C8/144B, 3 μ g/mL; Dako) according to the previously described protocol (17) revealed with the Ultraview Universal DAB IIIC Detection Kit (Ventana) and counterstained with Mayer's hematoxylin.

IS_B determination

Digital images of stained tissue sections were obtained with a 20 \times magnification and a resolution of 0.45 μ m/pixel (Nanozoomer HT). Delimitation of the tumoral component excluding normal tissue and low-/high-grade dysplasia-associated lesions was performed by an experienced pathologist (C. Lagorce). The mean densities of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the tumor region were determined with a dedicated IS module of the Developer XD image analysis software (Definiens; Fig. 1A). The mean and distribution of the staining intensities were monitored providing an internal staining quality control. A final quality check was performed to remove nonspecific staining detected by the software. Determination of IS_B was directly derived from the methodology used to determine the Immunoscore[®] (HaliDx, France) in the international validation cohort of IS in colon cancers which have shown a strong interobserver reproducibility (17). CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities in the tumoral region of each patient were compared with that obtained for the whole cohort of patient and converted accordingly into percentile. Then, the mean of the two percentiles (CD3 and CD8) was translated into one of the three IS_B categories (Fig. 1B): IS_B low (0%–25%), IS_B intermediate (>25%–70%),

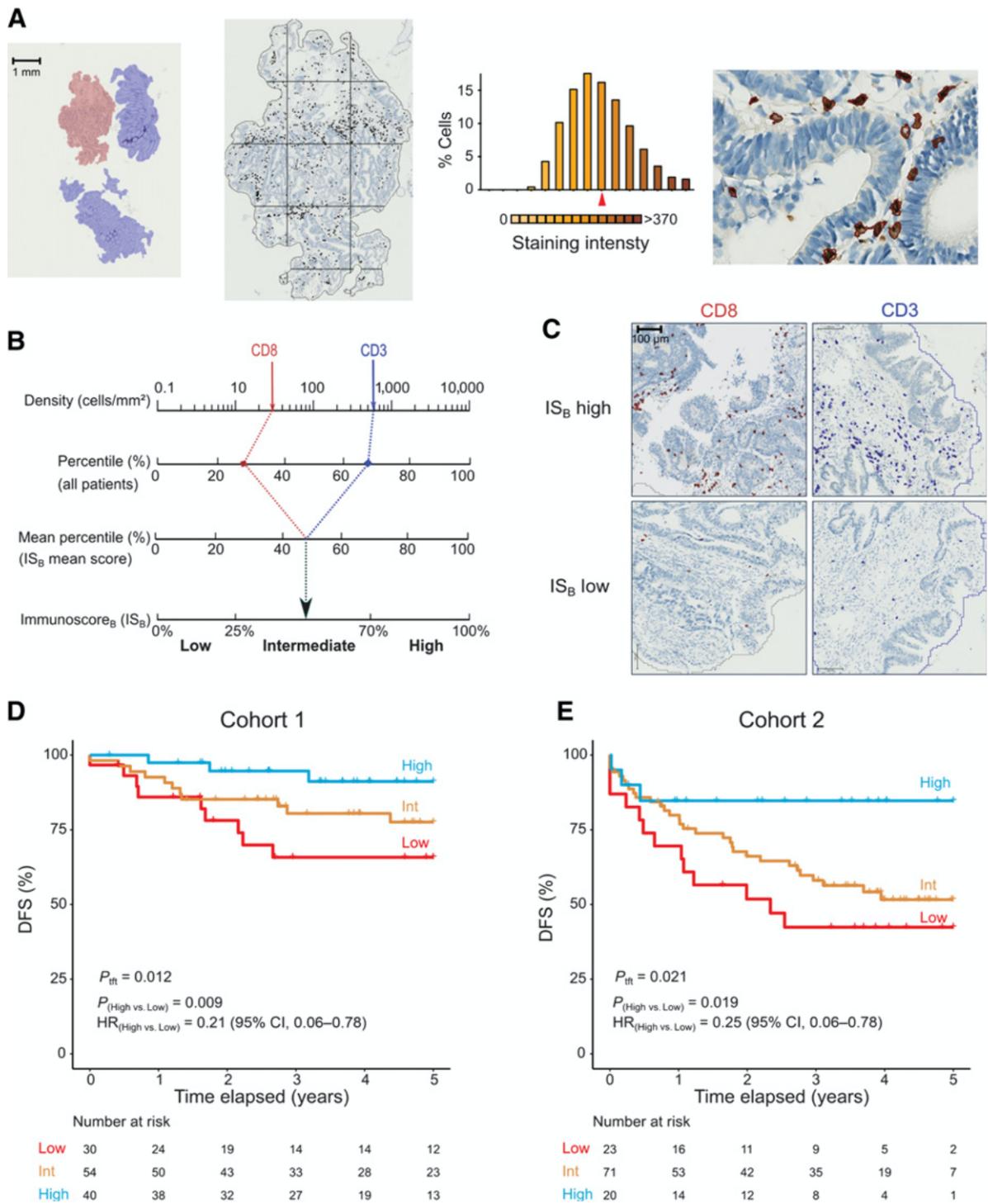


Figure 1.

A, Left: Representative image of tumor region (pink) with normal tissue or dysplasia (blue) excluded from the analysis. Left-mid: The tumor region divided into tiles for the analysis. Right-mid: Histogram of positive cells staining intensities detected by the software in a case of adequate immunostaining intensity. Red triangle defines mean case staining intensity of 220. Right: CD3⁺ T-cell (red) detection in a tile (magnification, ×200). **B**, Chart illustrating the IS_B calculation method. Densities of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the tumor region are converted into percentile values. The mean percentile of two markers is calculated to generate IS percentile value, where IS_B low, IS_B intermediate, and IS_B high subgroups are reflected by 0%–25%, >25%–70%, and >70%–100% percentile, respectively. **C**, Representative images of positive CD3⁺ and CD8⁺ T cells (cells/mm²) infiltrating the rectal tumor in patients with IS_B low and IS_B high. **D–E**, DFS according to IS_B low (red), IS_B intermediate (orange), and IS_B high (blue) in patients who met the biomarker and clinical data quality control evaluation in two independent cohorts ($n_1 = 124$ and $n_2 = 114$). P_{fit} is determined by log rank test for trend. Int, Intermediate.

and IS_B high (>70%–100%). The IS_B determination was performed blinded to the study endpoint.

RNA extraction and transcriptomic analysis by NanoString technology

Total RNA from 20- μ m FFPE tumor tissue sections from all patients for which both biopsies and the corresponding surgical specimen post-nT was available (cohorts 1 and 2; $n = 62$) and from patients with colorectal cancer not treated with nT ($n = 13$) was isolated using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion Thermo Fisher). Distribution of tumor extension T and N stages among patients with or without nT did not display any statistical difference. The quality and quantity of the isolated RNA were measured using Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies) and NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), and 100–400 ng RNA of each sample was processed using an in-house panel of 44 immune-related genes (Nanostring Technologies; Supplementary Table S4). Reporter-capture probe pairs were hybridized, and the probe/target complexes were immobilized and counted on the nCounter analyzer. Background subtraction was applied to raw data, and normalization based on the geometric mean of positive control and internal housekeeping genes (GUSB, SP2) was performed using the nSolver Analysis software, version 2.5.

Statistical analysis and data visualization

Statistical analyses and data visualizations were performed using the R software version 3.5.1 with the add-on survival, survminer, ggpubr, ggplot2, rms, and coin packages. The associations between IS_B and clinical characteristics were assessed through the χ^2 or Fisher tests of independence. Association level between CD3⁺ and CD8⁺ cell densities was measured by Pearson's correlation coefficient r and related P value. Survival univariate analyses were performed using the log-rank test and the Cox proportional hazards model. Survival curves were estimated by the Kaplan–Meier method. The log-rank test for trend from the survminer package was performed to detect ordered differences in survival curves. Multivariate survival analyses were performed with Cox proportional hazards model to test the simultaneous influence of all covariates. The proportional hazards assumption for each covariate was tested using the `cox.zph` function. The relative importance of each parameter to survival risk was assessed by the χ^2 from Harrell's rms R package. The association between IS_B and nT ordinal response level was assessed using a unilateral linear-by-linear association test. The associations between nT response levels, CD3⁺ T-cell densities, CD8⁺ T-cell densities, and gene intensities were assessed by Kendall's correlation test, T test, and Mann–Whitney U test. The Wilcoxon test adjusted to control FDR by using the Benjamini and Hochberg procedure was used to test treatment response level in transcriptional analysis. The ycTNM staging and IS_B were included in the proportional odds ordinal logistic regression model to predict good histopathologic response to nT. P values < 0.05 were considered statistically significant. Principal component analysis (PCA) was performed with PCA and `fviz_pca_ind` functions from packages FactoMineR and factoextra. Linear weighted kappa was used to measure the agreement between resected tumors and biopsy samples in IS calculation.

Results

IS_B determination on the rectal cancer diagnostic tissues

CD3⁺ lymphocytes and cytotoxic CD8⁺ cells were assessed on initial tumor biopsies performed for diagnosis purpose of LARC ($n = 322$) treated by nT. The immunostaining intensity was monitored to ensure a valid detection and counting of stained cells with the image

analysis software (Fig. 1A). Seven patients were excluded after biomarker quality control (2.8%), and 4 patients were excluded after clinical data quality control (1.2%). The median densities of CD3⁺ and CD8⁺ T cells in the tumor were 1,363 cells/mm² and 274 cells/mm², respectively (Supplementary Fig. S3A). The CD3⁺/CD8⁺ T-cell ratio was highly variable among patients, with a coefficient of determination (r^2) between both markers of 0.58 (Supplementary Fig. S3B). IS_B was derived from the CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities (Fig. 1B). CD3 and CD8 densities in the tumor were converted into percentiles referring to the densities observed in all patients. IS_B mean percentile of CD3 and CD8 was calculated for each biopsy (IS_B mean score). No statistical difference for the mean score was observed between the two cohorts [cohort 1: 51.9 \pm 29.1, cohort 2: 48.8 \pm 23.4 (mean \pm SD); $P = 0.36$]. After converting the mean score into IS_B scoring system, overall 22.7%, 52.5%, and 24.8% of patients had IS_B low, intermediate, and high, respectively. Of note, IS_B intermediate category was more represented in cohort 2 (61.9%), as compared with cohort 1 (43.5%). Representative tumor biopsies from patients with IS_B low and IS_B high are shown in Fig. 1C.

IS_B-associated prognostic value

Distribution analysis of IS_B did not display any association with age, sex, or tumor location (Supplementary Table S1). The magnitude and reproducibility of the IS_B prognostic performance were tested in two independent cohorts. In cohort 1 ($n_1 = 131$), a significant difference in DFS between patients stratified by IS_B was observed [P test for trend (P_{it}) = 0.012; HR_(High vs. Low) = 0.21; 95% confidence interval (CI), 0.06–0.78 and illustrated by Kaplan–Meier curves; Fig. 1D]. Patients with IS_B high were at low risk of relapse, with the 5-year DFS of 91.1% (95% CI, 82.0–100) versus 65.8% (95% CI, 49.8–86.9) in patients with IS_B low. These results were confirmed in second independent cohort [$n_2 = 118$; $P_{it} = 0.021$; HR_(High vs. Low) = 0.25; 95% CI, 0.07–0.86; Fig. 1E]. Identical results were obtained when removing the 3 patients with UICC-TNM stage I tumors (Supplementary Fig. S4). In pooled analysis ($n = 249$), a significant difference between patient's groups stratified by IS_B was evidenced by univariate analysis (Supplementary Table S5) illustrated by Kaplan–Meier curves for TTR ($P < 0.001$), DFS ($P < 0.005$), and OS ($P = 0.04$; Supplementary Fig. S5).

IS_B and response to neoadjuvant treatment

We investigated whether the prognostic value associated to IS_B was at least partly a consequence of a relationship between IS_B and the quality of the nT response. The quality of response to nT was assessed 6 to 8 weeks after nT by imaging (ycTNM) and microscopic examination of the resected tumor, by the Dworak classification, a tumor regression grading system, ypTNM, downstaging, and the NAR score. In our cohorts ($n = 249$ patients), high CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities were significantly associated with a good response to nT evaluated by both Dworak classification and ypTNM staging (all $P < 0.005$; Fig. 2A). The mean of CD3⁺ and CD8⁺ percentiles (IS_B mean score) were correlated with the NAR score, Dworak classification, and ypTNM staging (Fig. 2B). The IS_B level and distribution were positively correlated with tumor response to nT (Fig. 2C). IS_B high patients were not found in the nonresponder Dworak 0 group, and 52.9% of patients with undetectable tumor cells (i.e., the Dworak 4 group) were IS_B high ($P = 0.0006$). The same correlation was observed with the ypTNM, tumor downstaging, and NAR (Fig. 2C). Good responders to nT were 6 times more frequent in the IS_B high group than in the IS_B low group according to the NAR scoring system (Supplementary Fig. S6). Immune consequences of nT were then investigated on

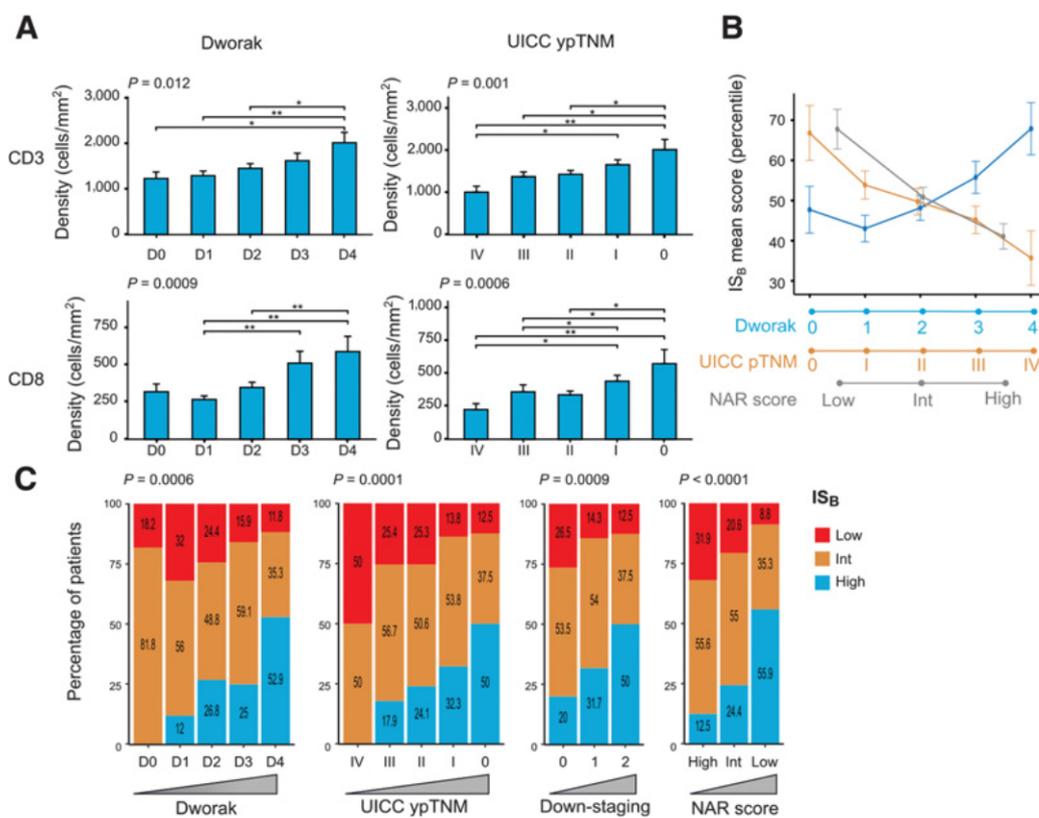


Figure 2.

A, Bar charts represent means \pm SEMs of CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities in the tumor biopsies before nT according to the subsequent response evaluated by the Dworak score and ypTNM classification (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$). P obtained for the Kendall's correlation test. **B**, Variation in mean percentile of CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities depending on the degree of tumor regression, as evaluated by the Dworak score, pTNM classification, and NAR score. **C**, The frequency of IS_B low (red), IS_B intermediate (orange), and IS_B high (blue) according to tumor regression. Significant differences for the IS_B distribution are observed with a unilateral linear-by-linear association test.

post-nT tumor samples (Dworak 0–4; $n = 62$) by analyzing 44 immune-related genes (Supplementary Table S4). Gene expression levels were highly variable among patients (Supplementary Fig. S7). Unsupervised hierarchical clustering showed that 30.6% ($n = 19$) of patients presented with signs of local immune activation after nT (Fig. 3A). The immune activation status after nT was positively correlated with the densities of CD3⁺ and CD8⁺ T cells (i.e., IS_B) before treatment (Fig. 3B; $P = 0.006$). Nonresponder tumors (Dworak 0–1) presented a similarly low level of immune-related genes expression compared with tumors not treated by nT (Fig. 3A). Patients with a partial/complete response to nT had a significantly higher expression of genes associated with adaptive immunity (*CD3D*, *CD3E*, *CD3Z*, and *CD8A*), Th1 orientation (*TBX21/Tbet* and *STAT4*), activation (*CD69*), cytotoxicity (*GZMA*, *GZMH*, *GZMK*, and *PRF1*), immune checkpoints (*CTLA-4* and *LAG3*), and chemokines (*CCL2*, *CCL5*, and *CX3CL1*), as compared with nonresponders to nT (Fig. 3C). This suggests a link between the quality of the natural adaptive cytotoxic immune response (IS_B), the presence of a post-nT immune activation, and the degree of response to nT. Gene expression data analysis through a PCA visualization further reinforced the putative link existing between the response to nT and the immune environment by showing distinct patterns of gene expression depending on the degree of response to nT (Fig. 3D). The combination of the second and third dimensions was the most accurate to discriminate responders/nonresponder patients.

IS_B, a biomarker to optimize patient care

We investigated whether the IS_B could provide valuable prognostic information when combined with clinical and pathological criteria available: (i) before nT [i.e., initial imaging, cTNM (UICC TNM 8th edition)], (ii) after nT (i.e., imaging post-nT, ycTNM), and (iii) after surgery (pathologic examination, ypTNM). In Cox multivariate analysis, IS_B was a stronger predictive marker of DFS than other clinicopathologic parameters including cTNM (IS_B high vs. IS_B low: HR, 0.2; $P < 0.001$) and ycTNM (IS_B high vs. IS_B low: HR, 0.25; $P = 0.039$). IS_B further remained a significant independent parameter associated with DFS when combined to ypTNM (Table 1). The important contribution of IS_B for the prediction of the relapse and/or death compared with other clinical parameters is illustrated in Fig. 4A. It is known that the accuracy of the complete response post-nT defined by imaging is imperfect. Only 25% to 50% of clinical complete responders have no residual tumor (i.e., complete histologic response; refs. 22–24). IS_B combined to imaging post-nT (ycTNM) increased the accuracy of prediction of histologic good responders (ypTNM 0–I) as compared with ycTNM alone (Fig. 4B). Three out of 32 patients with good response to nT (ycTNM = 0–I, $n = 32$) experienced distant relapses, and no local relapse was observed. Importantly, no relapse was observed in IS_B high patients (Fig. 4C). Thus, IS_B could help to select patients who could achieve a very favorable outcome and be eligible to a Watch-and-Wait strategy.

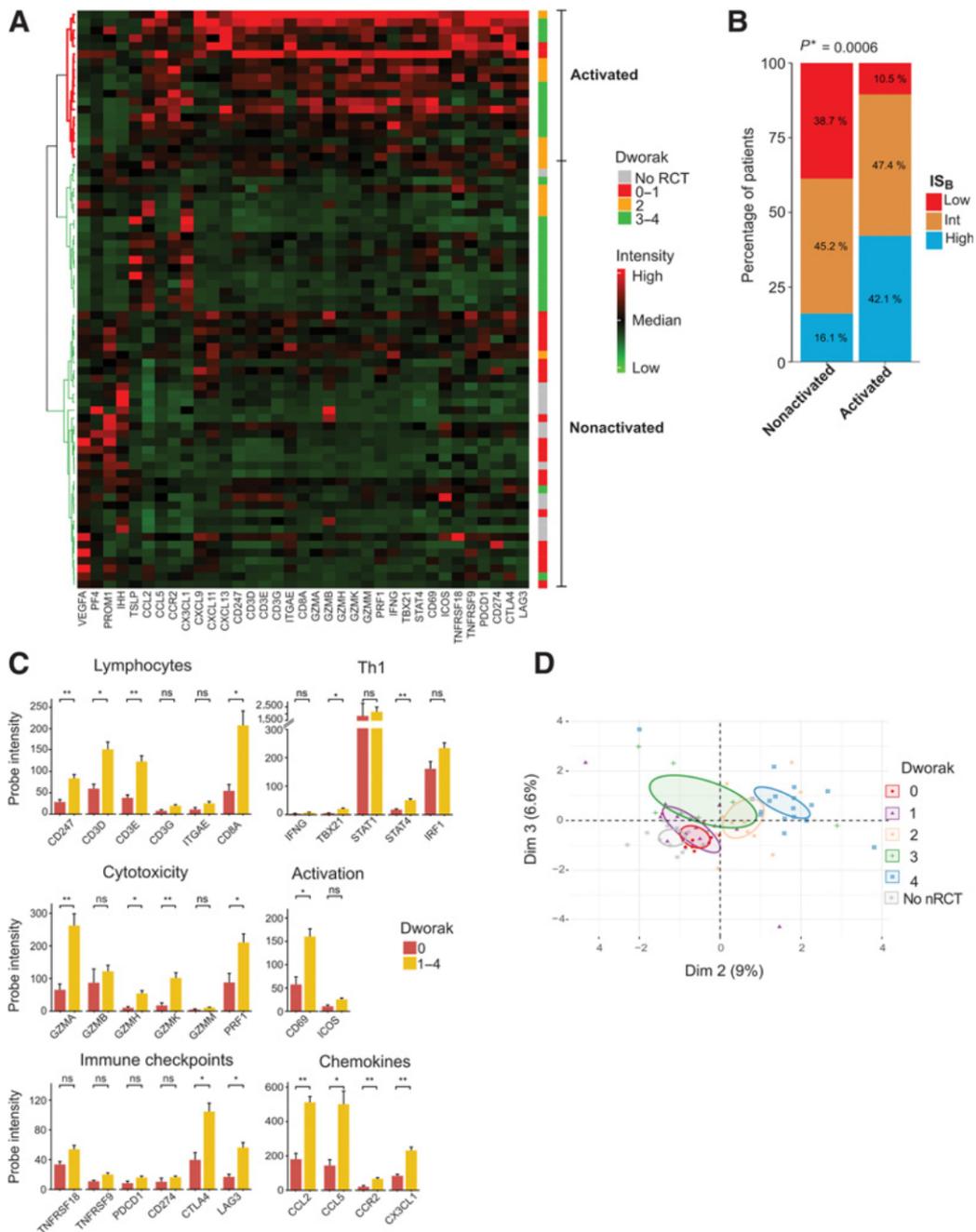


Figure 3.

A, Unsupervised hierarchical clustering showing immune-related genes in patients with rectal cancer treated by primary surgery (gray) or by nT followed by surgery (TME) and who did not experience pathologic response (red), had partial response (orange), or had complete response (green). Fold of change in gene expression is represented as a color gradient for high (red) and low (green) intensity. Only differentially expressed genes between nonresponders and partial-complete responders are shown (34/44). **B**, The frequency of IS_B low (red), IS_B intermediate (orange), and IS_B high (blue) in primary tumor biopsies performed before nT in patients with or without immune activation. Unilateral linear-by-linear association test was applied. Int, Intermediate; UICC, International Union Against Cancer. **C**, The differential immune gene expression in tumor samples from patients with no sign of response to nT (Dworak 0, red) compared with those with response (Dworak 1-4, orange). Analysis with a Wilcoxon test adjusted for multiple testing (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$). **D**, PCA view of patient similarity based on differentially expressed genes between nonresponders/responders. nT response levels are colored with confidence ellipses.

IS_B in patients managed with Watch-and-Wait strategy

In a series of patient treated by the Watch-and-Wait strategy ($n = 73$), we retrieved the initial diagnostic biopsies to evaluate the IS_B and the associated clinical outcome. Overall, 23%, 51%, and 26%

were classified as IS_B high, IS_B intermediate, and IS_B low, respectively. Time to relapse was significantly different among patients stratified for IS_B [$P_{(High vs. Low)} = 0.025$; Fig. 5A]. No evidence of relapse was noticed during the follow-up period in IS_B high patients.

Table 1. Multivariate Cox models for DFS according to IS_B combined with available clinical parameters.

Characteristics	Before neoadjuvant treatment			After neoadjuvant treatment			After surgery		
	PHA test	HR (95% CI)	P value ^a	PHA test	HR (95% CI)	P value ^a	PHA test	HR (95% CI)	P values ^a
Age									
Under vs. over 65 years	0.922	1.38 (0.85–2.24)	0.19	0.432	1.41 (0.69–2.9)	0.346	0.636	1.46 (0.86–2.48)	0.159
Tumor location									
Middle vs. inferior	0.43	1.1 (0.67–1.8)	0.72	0.688	0.9 (0.45–1.81)	0.766	0.894	0.83 (0.47–1.46)	0.527
Superior vs. inferior	0.5	0.66 (0.26–1.69)	0.39	0.583	0.3 (0.04–2.24)	0.24	0.212	0.74 (0.29–1.9)	0.529
Sex									
Male vs. female	0.06	1.54 (0.9–2.63)	0.118	0.131	1.87 (0.8–4.37)	0.148	0.033	1.38 (0.76–2.49)	0.291
Immunoscore (IS _B)									
Intermediate vs. low	0.476	0.65 (0.38–1.1)	0.111	0.906	0.76 (0.33–1.73)	0.508	0.708	0.93 (0.5–1.71)	0.807
High vs. low	0.83	0.2 (0.08–0.49)	<0.001	0.834	0.25 (0.07–0.93)	0.039	0.209	0.34 (0.13–0.89)	0.028
cTNM stage									
III vs. I–II	0.59	1.18 (0.68–2.04)	0.56	—	—	—	—	—	—
ypTNM stage									
0 vs. III	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I vs. III	—	—	—	0.916	0.62 (0.23–1.69)	0.349	—	—	—
II vs. III	—	—	—	0.257	0.48 (0.22–1.08)	0.076	—	—	—
ypTNM stage									
0 vs. III	—	—	—	—	—	—	0.208	0.14 (0.02–1.01)	0.051
I vs. III	—	—	—	—	—	—	0.071	0.2 (0.09–0.45)	<0.001
II vs. III	—	—	—	—	—	—	0.207	0.51 (0.29–0.89)	0.018

Note: Significant P values (< 0.05) with the Wald test are written in bold.

Abbreviation: PHA, proportional hazards assumption.

^aThe significance of the multivariate Cox regression model was evaluated with the Wald test.

Under the Cox proportional hazards regression model, the 5-year probability of survival without recurrence ranged from 46% to 89% according to IS_B mean score (Fig. 5B). In Cox multivariable analysis, IS_B was related to the patient's TTR, independent of age,

tumor location, and the cTNM classification (UICC TNM 8th edition; P = 0.04; Supplementary Table S6). The relative contribution of IS_B to the prediction of occurrence of disease relapse is illustrated in Fig. 5C.

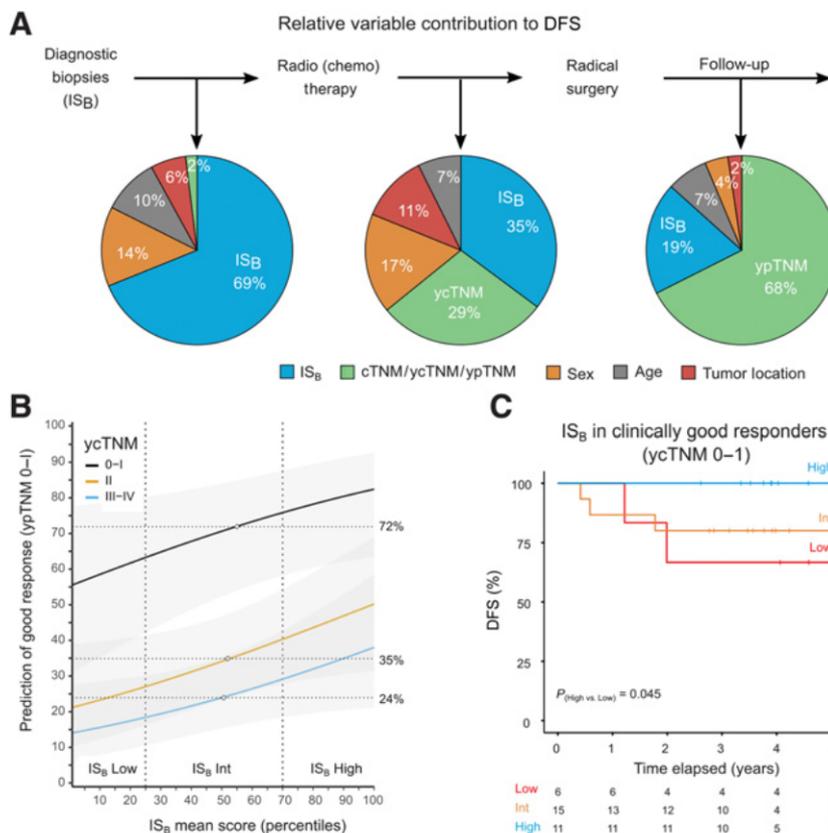


Figure 4.

A, Relative contribution of each parameter available at diagnosis to survival risk. IS_B is compared with clinicopathologic parameters including the cTNM, ycTNM, or ypTNM classifications using the χ^2 proportion test. **B**, Prediction of pathologic response (ypTNM 0–I) based on IS_B mean score and the ycTNM classification [ycTNM 0–I (black), ycTNM II (yellow), and ycTNM III–IV (blue)]. **C**, DFS scoring system in patients with good clinical response to treatment (ycTNM 0–1, n = 32). Int, Intermediate.

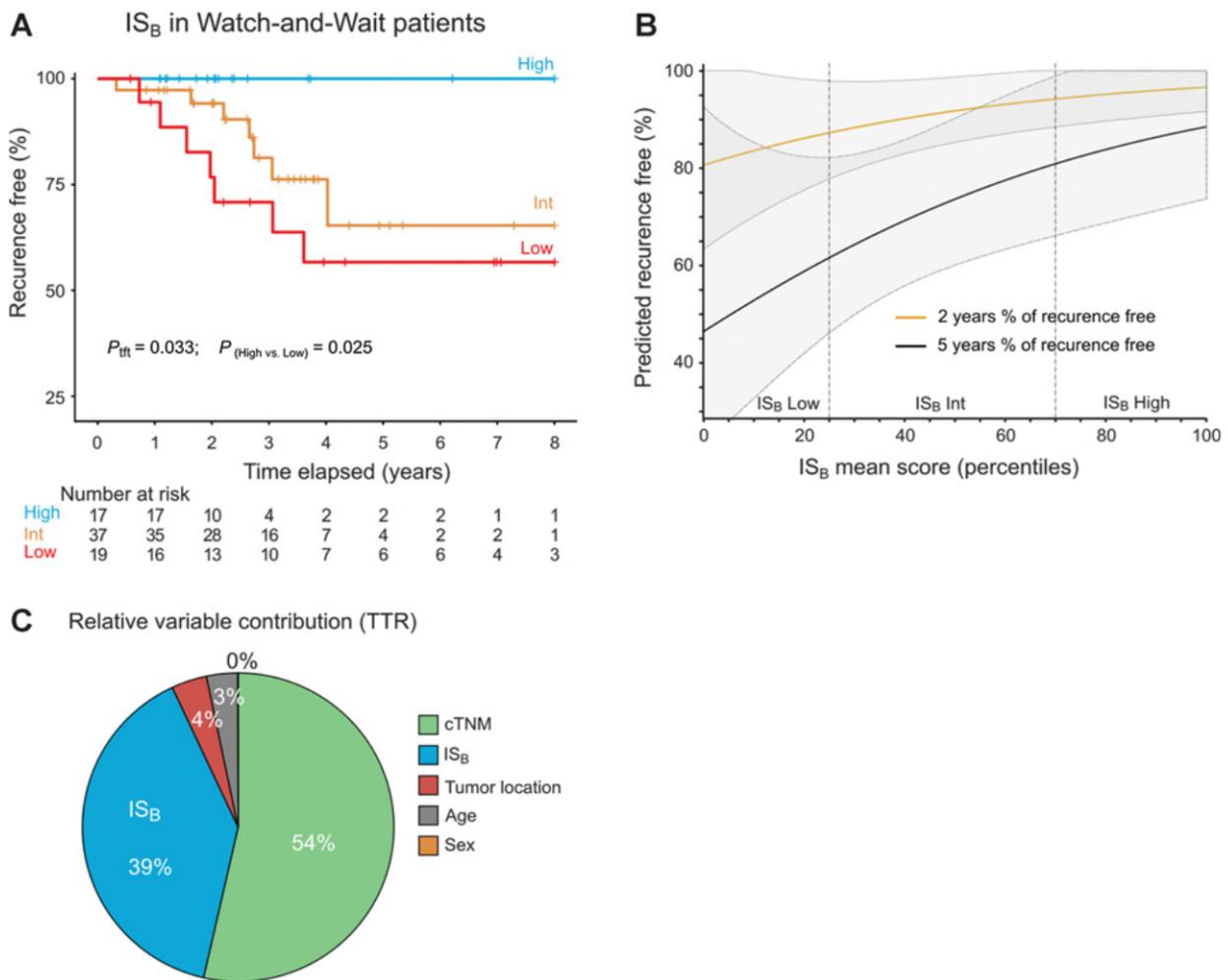


Figure 5.

A, TTR according to IS_B in patients treated by the Watch-and-Wait strategy ($n = 73$). **B**, Probability of the 2-year and 5-year recurrence-free survival according to IS_B expressed as a continuous variable (IS_B mean score, in percentiles) under the Cox proportional hazards regression model. **C**, Relative importance of each risk parameter to survival risk evaluated before nT in Watch-and-Wait patients. IS_B is compared with clinicopathologic parameters including the cTNM and ycTNM classifications using the χ^2 proportion test. Int, Intermediate.

Discussion

This work highlights the links between: (i) the quality of natural intratumor immunity evaluated by the IS_B , (ii) the intensity of *in situ* immune reaction post-nT, (iii) the extent of the tumor regression post-nT, and (iv) the clinical impact in terms of prevention of tumor recurrence and survival. From a clinical point of view, IS_B provides a reliable estimate of both the quality of response after nT and of the risk of recurrence and death in patients with LARC. IS_B combined with imaging could further identify patients with a complete clinical response who can benefit from a close surveillance strategy post-nT, thus avoiding a disabling and useless rectal amputation surgery.

IS_B can be performed on routine diagnosis biopsies without any additional medical procedure. The rigorous and standardized quantification of immune cell infiltrates was achieved as for the IS colon study (17).

In the current study, IS_B was positively and significantly correlated with tumor response to nT. This observation is consistent with our previous preliminary result (18) and with studies using an optical

semiquantitative evaluation of immune cell infiltrates (19, 20, 25). In the IS_B low group (22.7% of the cohort), only 5% of patients experienced complete response (low NAR score), suggesting that an optimization or modification of nT such as adjunctive therapies (26), immunotherapy (27), or drug repositioning may provide greater benefits for these patients in order to achieve a better response. We evidenced an association between signs of *in situ* cytotoxic adaptive immune response and inflammatory interferon type I-associated molecules production post-nT and the response to treatment. Type I IFNs play a key role in antitumoral immunity by promoting the maturation and presentation capacity of dendritic cells and their migration to lymph nodes (28). This immune state was influenced by the quality and the intensity of the natural immune response pre-existing before nT. IS_B high could not only favor nT-dependent tumor cell death, but also promote the presence of resident immune components that could be essential to avoid local recurrences in organ preservative strategies such as Watch-and-Wait. Of note, a few IS_B high patients did not achieve a good response, highlighting that treatment resistance is also guided by independent tumor-intrinsic factors (29) or

the presence of a suppressive microenvironment (30). Neoadjuvant treatment with development of clinical complete response post-nT has raised the possibility of organ-preserving strategies, as radical resection of the rectum results in functional outcomes, immediate morbidity, and even mortality rates (31). However, imaging after nCRT (ycTNM) has low accuracy in predicting pathologic complete response due to over- or under-staging (32). Importantly, no relapse was observed in good responders with IS_B high patients. In addition, IS_B increased the accuracy prediction for very good responders (ypTNM 0–I) evaluated by imaging and identified a subgroup of patients treated with an organ-preserving strategy (Watch-and-Wait) with a very favorable outcome. No biomarker is currently available to help selection of good responders eligible to the Watch-and-Wait strategy (9). These results may have significant implication in selecting potential candidates for organ preservation including patients with IS_B high and complete clinical response to nT, but also those with a delayed complete clinical response (i.e., “nearly complete responders”) that are presently classified as incomplete responders (33).

This study has some limitations. The immune densities associated with predefined cut points (i.e., 25th and 70th percentiles) are closely linked to the clinical characteristics of the studied cohort. The densities used as cut point are relevant to patients with LARC treated by nT before surgery. In addition, assessment of IS_B was performed on initial biopsies; this implies analysis of only a small fraction of the tumor (10%–15% of the surface of cut from a tumor block available after TME) and no analysis of the invasive margin absent on biopsies. In order to evaluate the correspondence of IS_B and IS in resected tumor, we analyzed 33 colon cancer biopsies and their associated resected tumor, and we found a partial correlation between these two specimens (Supplementary Table S7; kappa = 0.45, $P = 0.0004$). All discrepancies were only observed between two consecutive categories of IS. Despite this limited surface analysis and the absence of invasive margin, the prognostic value of the IS_B was retained suggesting the accuracy of the immune evaluation on initial diagnostic biopsy when the surgical piece is unavailable or is impossible to analyze due to architectural changes secondary to the nT. In addition, performing IS on postoperative specimen would not allow an assessment of its predictive value of the response to nT. Furthermore, due to the deep histologic modifications after nT (no clear delimitation of the tumor and its invasive margin), an IS on post-nT specimen is not feasible. The study was performed on patients who came from different countries and received standard-of-care treatment in real-life clinical practice. Despite the size of the specimen and the multiple types of patient care, the strong and constant prognosis value associated with IS_B highlights the robustness of the test and its generalizability. Prognostic parameters such as mismatch repair, KRAS, and BRAF status not available in our study were not included in multivariate analysis with IS scoring system. However, MSI+ cases are rare in rectal cancer (<5%; ref. 34), and we recently evidenced that IS was an independent prognostic parameter for survival when associated with MSI, KRAS, and BRAF status in colonic cancers (35). Most of the rectal cancers included in this study were adenocarcinomas. A subanalysis by histologic subtypes could not be performed due to the large multicentric character of the cohorts studied, with heterogeneous level of histopathologic description and the obvious small effect of mucinous carcinomas, signet ring cell carcinoma, or tumor budding to address their relative prognostic impact with enough power. This study emphasizes the importance of the initial diagnostic biopsies, often done in private practices, and not easily available in some cases. Patients with rectal cancer would benefit from a close partnership between private pathology practices, clinics, and teaching hospitals in order to initially assess their immune status

(IS_B). This material could become in the near future essential and be part of the personal medical file of patients with rectal cancer as it is the sole material available before any nT. IS_B may facilitate a personalized multimodal treatment of rectal cancer particularly in patients with IS_B high tumors at baseline and with signs of tumor regression by imaging. These patients should benefit the most from the conservative strategy and in turn preserve their quality of life.

In conclusion, our results indicate that IS_B could be used: (i) to predict tumor response after nT, (ii) to restage local disease after nT, and (iii) to predict clinical outcome. This method may facilitate a personalized multimodal treatment of rectal cancer particularly in patients with IS_B high tumors at baseline and with signs of tumor regression by imaging. These patients should benefit the most from the conservative strategy and in turn preserve their quality of life. IS_B is yet to be validated on larger Watch-and-Wait cohorts both retrospectively and prospectively. Such validations are planned in international collaboration studies using the International Watch-and-Wait Database and in the OPERA ongoing clinical trial (NCT02505750).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

B. Mlecnik reports patents WO2014023706A1 and WO2017194556A1 on methods and kits for screening patients with cancer, licensed and with royalties paid from HaliDX. F. Bibeau reports personal fees from Amgen; grants and personal fees from BMS; personal fees from MSD, Merck, and Bayer; and grants and personal fees from AstraZeneca outside the submitted work. D. Tougeron reports personal fees from Sanofi (board), MSD (board); personal fees and other from AMGEN (board, travel for congress), Servier (board, travel for congress); personal fees from Roche (board), BMS (board), AstraZeneca (board), and Bayer (board) outside the submitted work. R.O. Perez reports personal fees from Johnson & Johnson and personal fees from Roche outside the submitted work. J.-P. Gerard reports grants from Centre Antoine Lacassagne outside the submitted work. J. Galon reports personal fees from HaliDX (HaliDX co-founder) and personal fees from INSERM (licence) during the conduct of the study; grants from Imcheck Therapeutics, AstraZeneca, MedImmune, IOBiotech, Janssen, Perkin Elmer, Ultravac; personal fees from BMS (consulting), IOBiotech (consulting), Northwest Biotherapeutics (consulting), Gilead (consulting), Amgen (consulting), Catalym (consulting), and Sanofi (consulting) outside the submitted work; in addition, the author has a patent for biomarkers and methods for predicting survival pending, licensed, and with royalties paid from HaliDX & INSERM. F. Pagès reports grants and personal fees from BMS; grants from HaliDX; personal fees from Gilead, Merck, Roche, and Janssen outside the submitted work; in addition, the author has a patent for WO2007045996 on an *in vitro* method for the prognosis of progression of a cancer and of the outcome, and a patent for WO/2013/186374 on the quantification of immune cells in tumor tissues, both owned by HaliDX and both applications by INSERM. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

C. El Sissy: Conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, writing-original draft, writing-review and editing. A. Kirilovsky: Conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, writing-original draft, writing-review and editing. M. Van den Eynde: Resources, data curation. A.-M. Musinà: Resources, data curation. M.-G. Anitei: Resources, data curation. A. Romero: Resources, data curation, formal analysis, investigation. F. Marliot: Data curation, formal analysis. A. Junca: Resources, data curation. J. Doyen: Resources, data curation. B. Mlecnik: Formal analysis, software. N. Haicheur: Data curation, formal analysis. T. Fredriksen: Data curation, formal analysis, methodology. C. Lagorce: Data curation, supervision. A. Jouret-Mourin: Resources, data curation. D. Leonard: Resources, data curation. F. Bibeau: Resources, data curation. S. Iseas: Resources, data curation. E.L. Roca: Resources, data curation. A.M. Cabanne: Resources, data curation. C.A. Vaccaro: Resources, data curation. J.P. Santino: Resources, data curation. E. Huertas: Resources, data curation. D. Tougeron: Resources, data curation. C. Carvalho: Resources, data curation. N. Figueiredo: Resources, data curation. R.O. Perez: Resources, data curation. A. Habr-Gama: Resources, data curation. V. Scipicariu: Resources, data curation. J.-P. Gerard: Resources, data curation, writing-review and editing. J. Galon: Investigation, supervision, funding acquisition. G. Zeitoun: Conceptualization, supervision, data curation, writing-original draft, writing-review and editing.

F. Pagès: Conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition, investigation, methodology, writing-original draft, writing-review and editing.

Acknowledgments

We thank Anatomopathology Departments (Belgium, Romania, CAL Nice, Medipath Nice, CHPG Monaco) for the retrieval of tumor biopsies and collaboration. The authors would like to acknowledge Magdalena Benetkiewicz (Sc.D., her work was funded by Université de Paris) for the editorial assistance.

The work was supported by Fondation ARC: Association pour la Recherche contre le Cancer; National Institute of Health and Medical Research

(INSERM); CARPEM; AP-HP; University Paris Descartes; and INCA translationnel.

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

Received January 27, 2020; revised May 30, 2020; accepted July 7, 2020; published first July 15, 2020.

References

1. Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabasag CJ, Morrison DS, et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4:511–8.
2. Nielsen IJ, Wille-Jørgensen P. National and international guidelines for rectal cancer. *Colorectal Dis* 2014;16:854–65.
3. Glynn-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28:iv22–49.
4. Park JJ, You YN, Agarwal A, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Eng C, et al. Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:1770–6.
5. George TJ, Allegra CJ, Yothers G. Neoadjuvant rectal (NAR) score: a new surrogate endpoint in rectal cancer clinical trials. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2015;11:275–80.
6. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8688–96.
7. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Sabbaga J, Ribeiro U, Silva e Sousa AH, et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg* 2004;CXXII:309–16.
8. Habr-Gama A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. *Colorectal Dis* 2006;8:21–4.
9. van der Valk MJM, Hidding DE, Bastiaannet E, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Beets GL, Figueiredo NL, et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet North Am Ed* 2018;391:2537–45.
10. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:862–70.
11. Rodríguez-Ruiz MF, Vanpouille-Box C, Melero I, Formenti SC, Demaria S. Immunological mechanisms responsible for radiation-induced abscopal effect. *Trends Immunol* 2018;39:644–55.
12. Chajon F, Castelli J, Marsiglia H, Crevoisier RD. The synergistic effect of radiotherapy and immunotherapy: a promising but not simple partnership. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;111:124–32.
13. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306.
14. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654–66.
15. Galon J. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
16. Shinde V, Burke KE, Chakravarty A, Fleming M, McDonald AA, Berger A, et al. Applications of pathology-assisted image analysis of immunohistochemistry-based biomarkers in oncology. *Vet Pathol* 2014;51:292–303.
17. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, et al. International validation of the consensus immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet North Am Ed* 2018;391:2128–39.
18. Amtei M-G, Zeitoun G, Mlecnik B, Marliot F, Haicheur N, Toldosi A-M, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:1891–9.
19. Yasuda K, Nirei T, Sunami E, Nagawa H, Kitayama J. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiat Oncol* 2011;6:49.
20. Shinto E, Hase K, Hashiguchi Y, Sekizawa A, Ueno H, Shikina A, et al. CD8+ and FOXP3+ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2014;21:414–21.
21. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:19–23.
22. Hiotis SP, Weber SM, Cohen AM, Minsky BD, Paty PB, Guillem JG, et al. Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: an analysis of 488 patients. *J Am Coll Surg* 2002;194:131–5.
23. Rullier E, Rouanet P, Tuech J-J, Valverde A, Lelong B, Rivoire M, et al. Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet North Am Ed* 2017;390:469–79.
24. The 2017 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating group. Evaluating the incidence of pathological complete response in current international rectal cancer practice: the barriers to widespread safe deferral of surgery. *Colorectal Dis* 2018;20:58–68.
25. Matsutani S, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Nakao S, et al. Significance of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Cancer Sci* 2018;109:966–79.
26. Gash KJ, Chambers AC, Cotton DE, Williams AC, Thomas MG. Potentiating the effects of radiotherapy in rectal cancer: the role of aspirin, statins and metformin as adjuncts to therapy. *Br J Cancer* 2017;117:210–9.
27. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer* 2018;18:313–22.
28. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 2015;15:405–14.
29. Makena MR, Ranjan A, Thirumala V, Reddy AP. Cancer stem cells: road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1653:39.
30. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 2015;15:409–25.
31. Smith FM, Rao C, Oliva Perez R, Bujko K, Athanasiou T, Habr-Gama A, et al. Avoiding radical surgery improves early survival in elderly patients with rectal cancer, demonstrating complete clinical response after neoadjuvant therapy: results of a decision-analytic model. *Dis Colon Rectum* 2015;58:159–71.
32. Sclafani F, Brown G, Cunningham D, Wotherspoon A, Mendes LST, Balyasnikova S, et al. Comparison between MRI and pathology in the assessment of tumour regression grade in rectal cancer. *Br J Cancer* 2017;117:1478–85.
33. Hupkens BJP, Maas M, Martens MH, van der Sande ME, Lambregts DJM, Breukink SO, et al. Organ preservation in rectal cancer after chemoradiation: should we extend the observation period in patients with a clinical near-complete response? *Ann Surg Oncol* 2018;25:197–203.
34. Nilbert M, Planck M, Fernebro E, Borg A, Johnson A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:942–5.
35. Marliot F, Chen X, Kirilovsky A, Sbrarato T, Sissy CE, Batista L, et al. Analytical validation of the immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000272.

Clinical Cancer Research

A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait Strategy

Carine El Sissy, Amos Kirilovsky, Marc Van den Eynde, et al.

Clin Cancer Res 2020;26:5198-5207. Published OnlineFirst July 15, 2020.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-20-0337](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0337)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2020/07/15/1078-0432.CCR-20-0337.DC1>

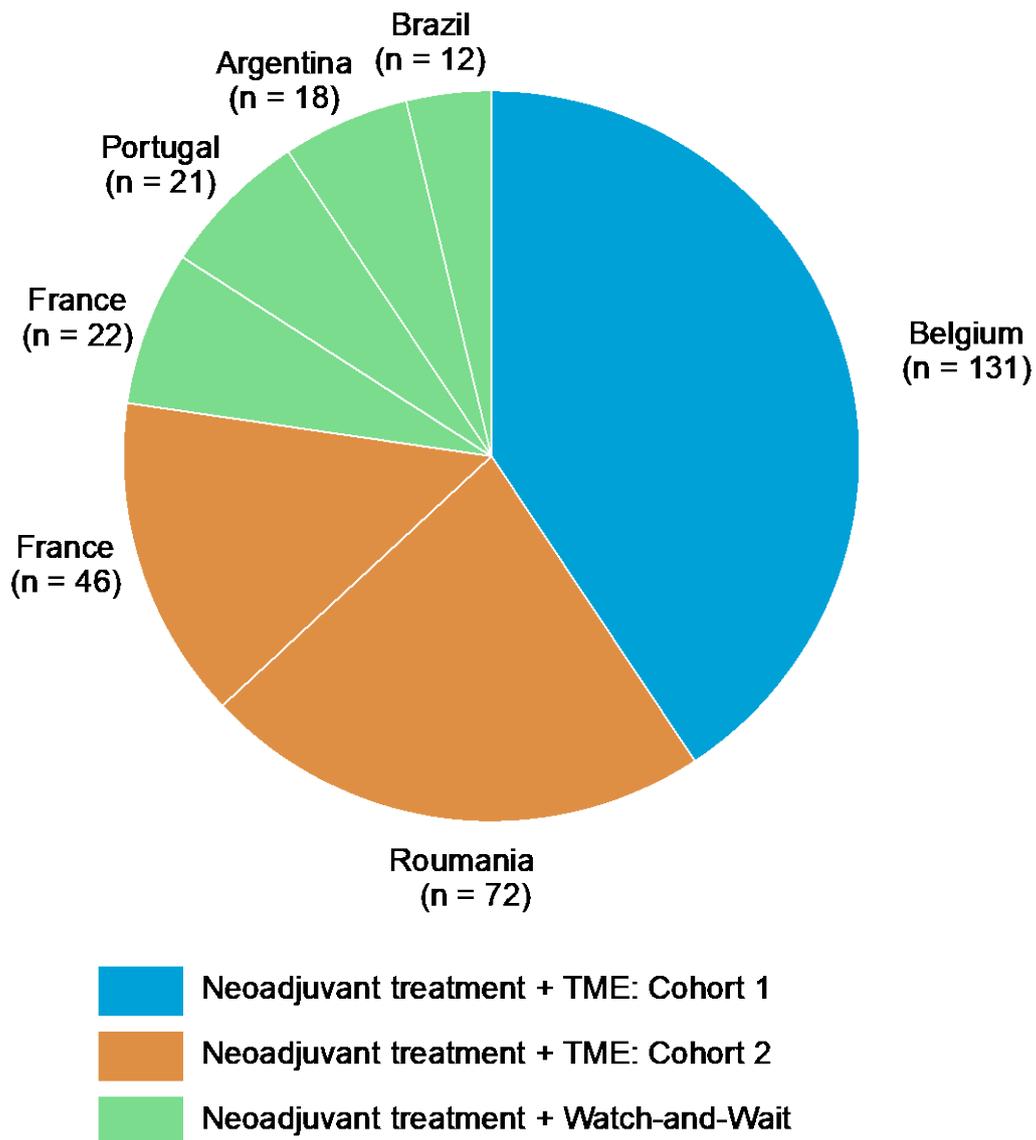
Cited articles This article cites 34 articles, 5 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/26/19/5198.full#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/26/19/5198>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

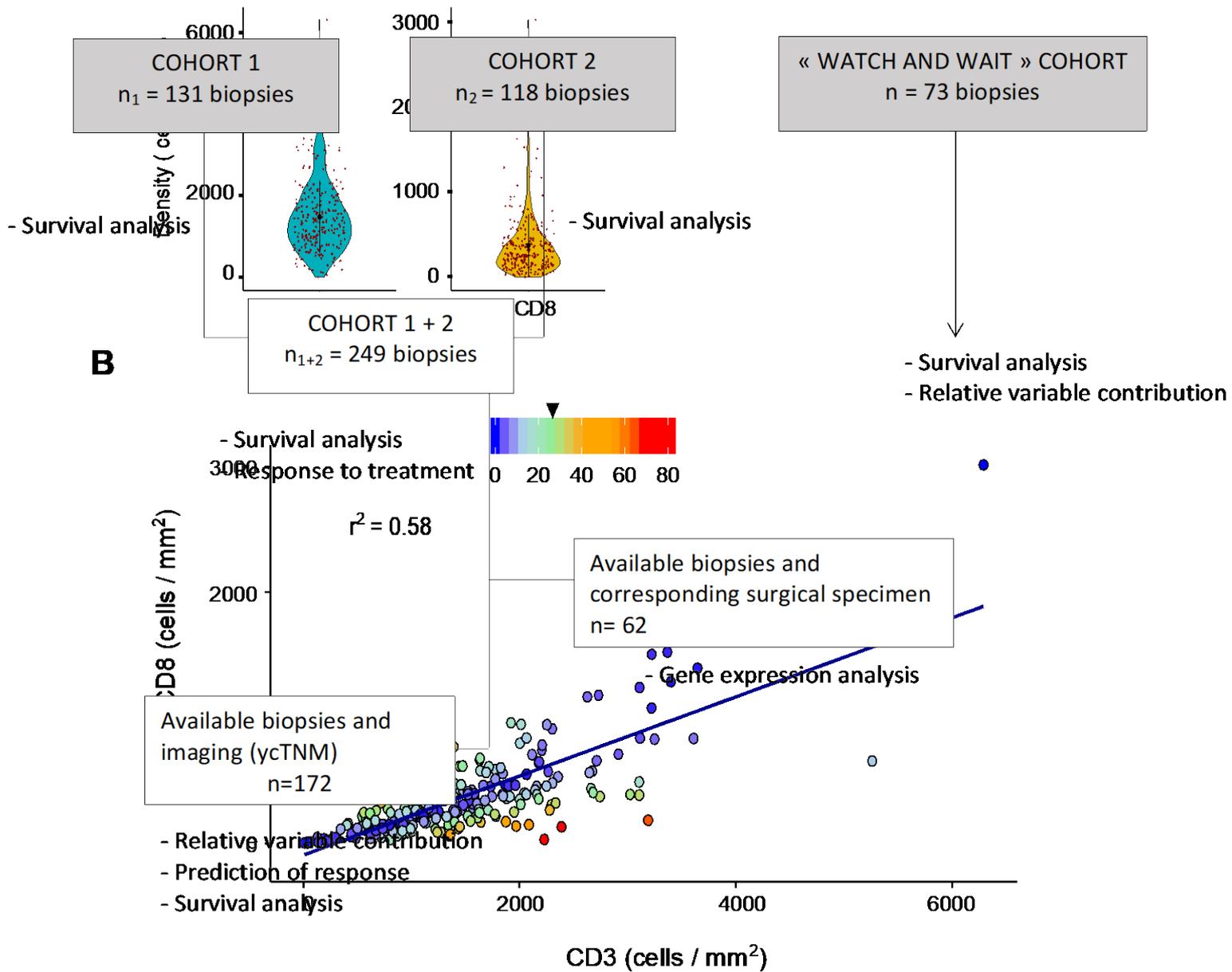
Supplementary Figure S1



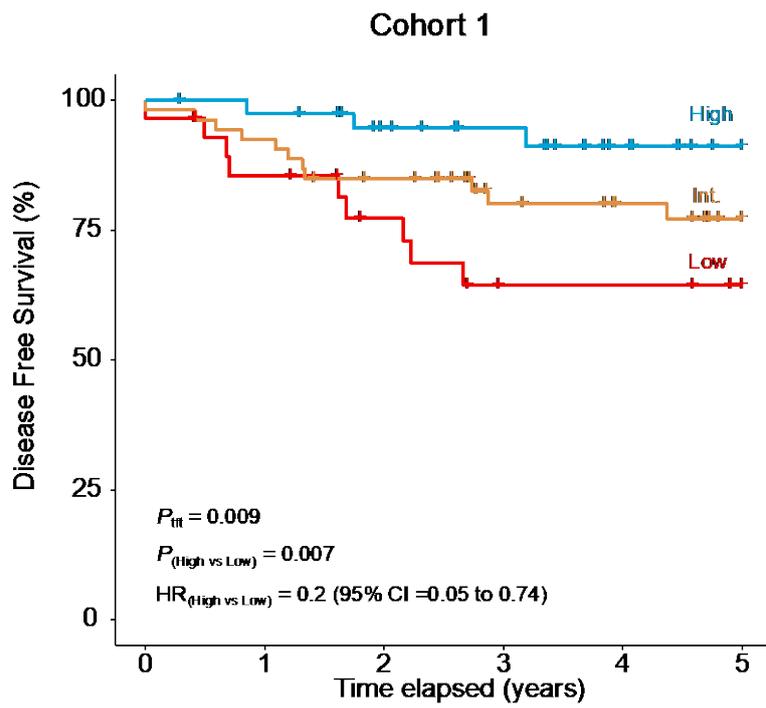
- Belgium: - Institut Roi Albert II, Department of Medical Oncology Cliniques Universitaires St-Luc, Brussels
- Roumania: - Institutul Regional de Oncologie, Department of Surgical Oncology, Iași
- France: - Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers
- Centre Antoine Lacassagne, Nice
- Portugal: - Champalimaud Clinical Centre, Lisboa
- Argentina: - Hospital Udaondo, Buenos Aires
- Hospital Italiano, Buenos Aires
- Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires
- Brazil: - Angelita and Joaquim Gama Institute, São Paulo

Supplementary Figure S3

Supplementary Figure S2: Flowchart of cohorts used in the study

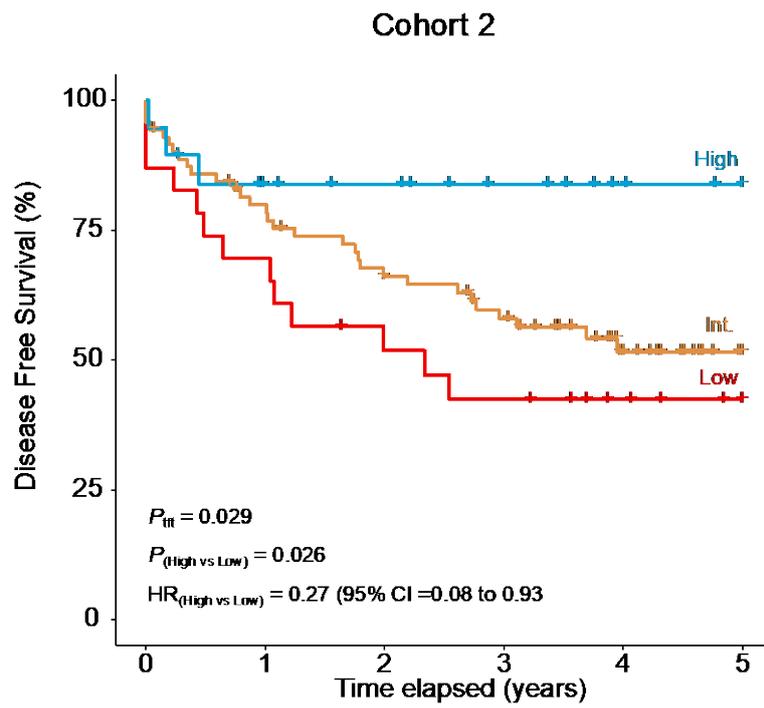


Supplementary Figure S4



Number at risk

	0	1	2	3	4	5
Low	29	23	18	13	13	11
Int.	53	49	42	32	28	23
High	40	38	32	27	19	13

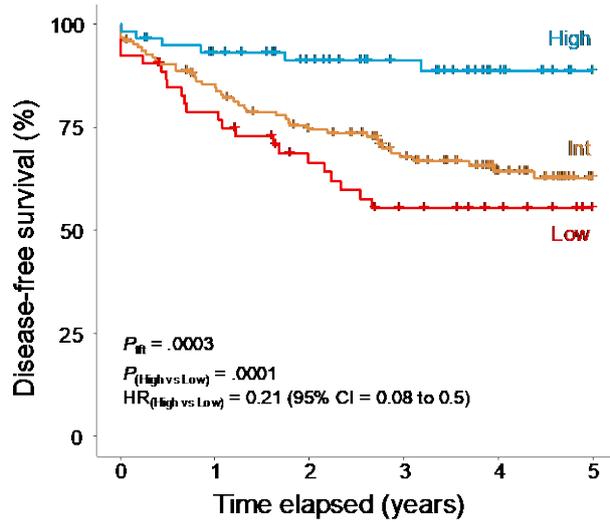


Number at risk

	0	1	2	3	4	5
Low	23	16	11	9	5	2
Int.	71	53	42	35	19	7
High	19	13	11	7	3	1

Supplementary Figure S5

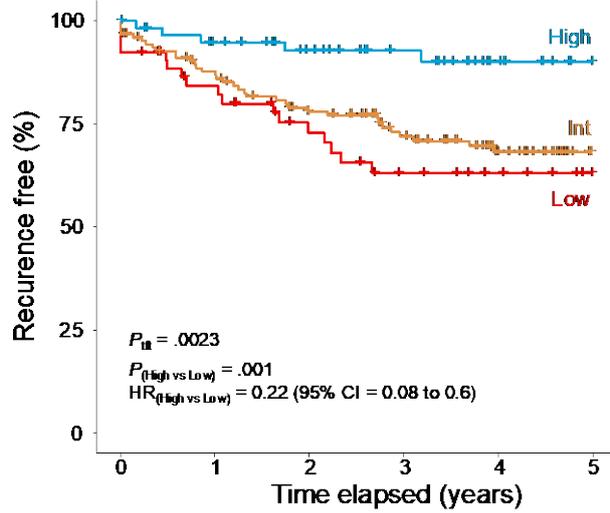
A



Number at risk

Low	53	40	30	23	19	14
Int	125	103	85	68	47	30
High	60	52	44	35	23	14

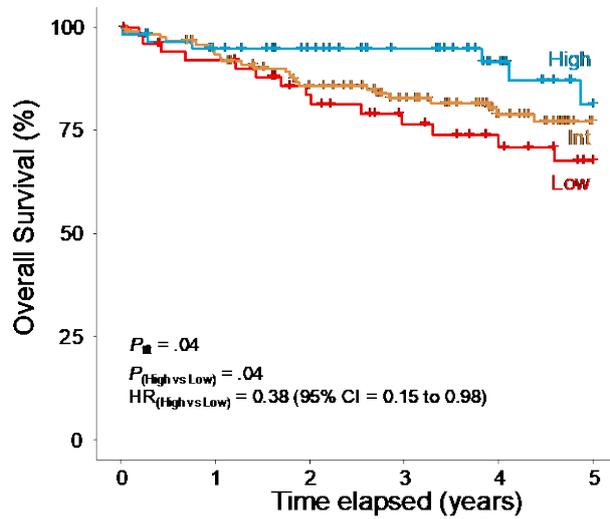
B



Number at risk

Low	53	40	30	23	19	14
Int	125	103	85	68	47	30
High	60	52	44	35	23	14

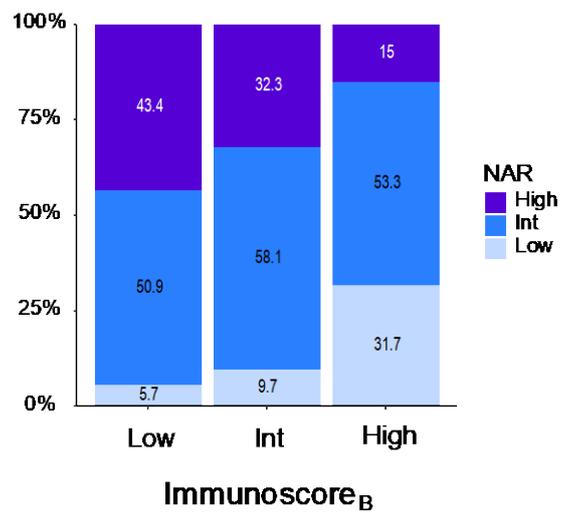
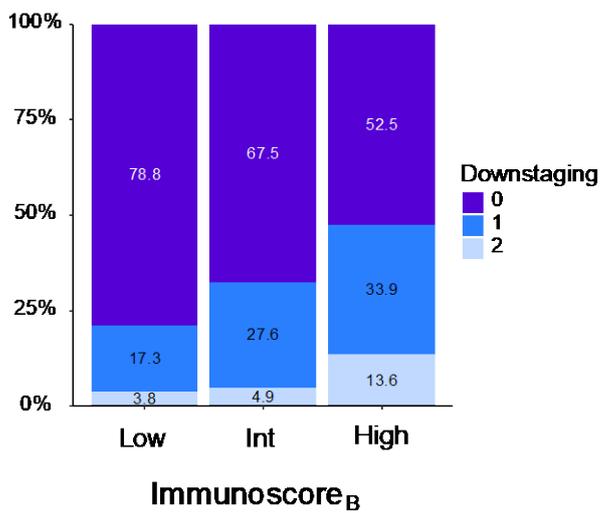
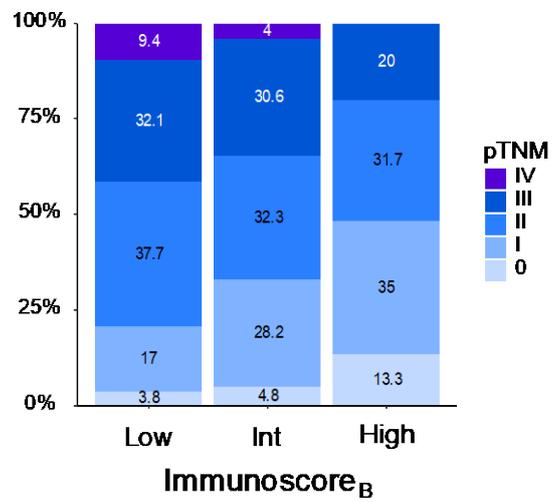
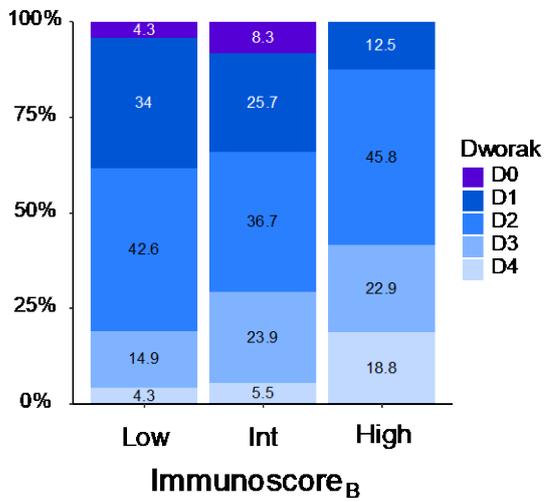
C



Number at risk

Low	53	46	38	30	24	18
Int	125	113	97	79	53	36
High	60	53	46	37	25	14

Supplementary Figure S6



Supplementary Table 1. Clinical characteristics of patients who underwent total mesorectal excision according to IS_B

Characteristics	Cohort 1			P	Cohort 2			P
	IS _B Low No. (%)	IS _B Int No. (%)	IS _B High No. (%)		IS _B Low No. (%)	IS _B Int No. (%)	IS _B High No. (%)	
No. of patients								
Age				.58*				.12*
≤ 65 years	12 (40)	24 (44.4)	21 (52.5)		15 (60)	28 (38.4)	11 (55)	
> 65 years	18 (60)	30 (55.6)	19 (47.5)		10 (40)	45 (61.6)	61.6 (9)	
Gender				.79*				.10*
Male	18 (60)	36 (66.7)	27 (67.5)		18 (72)	51 (69.9)	9 (45)	
Female	12 (40)	18 (33.3)	13 (32.5)		7 (28)	22 (30.1)	11 (55)	
Tumor location				.92*				.59*
Inferior	15 (50)	28 (51.9)	23 (57.5)		14 (56)	33 (45.8)	10 (50)	
Middle	10 (33.3)	18 (33.3)	10 (25)		10 (40)	34 (47.2)	7 (35)	
Superior	5 (16.7)	8 (14.8)	7 (17.5)		1 (4)	5 (6.9)	3 (15)	
cTNM stage				.08†				.03†
I	1 (3.3)	1 (1.9)	-		-	-	1 (5)	
II	14 (46.7)	21 (38.9)	9 (22.5)		5 (20)	9 (12.3)	7 (35)	
III	15 (50)	32 (59.3)	21 (77.5)		20 (80)	64 (87.7)	12 (60)	
ypTNM stage				.36†				.04†
0	1 (4.3)	-	3 (8.3)		-	-	-	
I	2 (8.7)	9 (22.5)	4 (11.1)		3 (16.7)	6 (12.8)	4 (57.1)	
II	15 (65.2)	18 (45)	19 (52.8)		3 (16.7)	8 (17)	1 (14.3)	
III	5 (21.7)	12 (30)	10 (27.8)		8 (44.4)	31 (66)	2 (28.6)	
IV	-	1 (2.5)	-		4 (22.2)	2 (4.3)	-	
ypTNM stage				.69†				.05†
0	2 (6.7)	5 (9.4)	5 (12.5)		-	1 (1.4)	3 (15)	
I	5 (16.7)	15 (28.3)	13 (32.5)		4 (17.4)	20 (28.2)	8 (40)	
II	11 (36.7)	17 (32.1)	14 (35)		9 (39.1)	23 (32.4)	5 (25)	
III	11 (36.7)	14 (26.4)	8 (20)		6 (26.1)	24 (33.8)	4 (20)	
IV	1 (3.3)	2 (3.8)	-		4 (17.4)	3 (4.2)	-	
Dworak classification				.36†				.05†
0	-	3 (6)	-		2 (10)	6 (10.2)	-	
1	7 (25.9)	7 (14)	4 (10.5)		9 (45)	21 (35.6)	2 (20)	
2	14 (51.9)	19 (38)	19 (50)		6 (30)	21 (35.6)	3 (30)	
3	4 (14.8)	16 (32)	10 (26.3)		3 (15)	10 (16.9)	1 (10)	
4	2 (7.4)	5 (10)	5 (13.2)		-	1 (1.7)	4 (40)	

NOTE:

* Chi square P value for independence between clinical variables and IS_B level

† Fisher's test P value for independence between clinical variables and IS_B level

Supplementary Table 2. Clinical characteristics of patients who underwent the Watch-and-Wait strategy according to IS_B.

Characteristics	Overall No. (%)	IS _B Low No. (%)	IS _B Int No. (%)	IS _B High No. (%)	<i>P</i>
No. of patients	73 (100)	19 (26)	37 (50.7)	17 (23.3)	-
Age					.28*
≤ 65 years	32 (43.8)	6 (31.6)	16 (43.2)	10 (58.8)	
> 65 years	41 (56.2)	13 (68.4)	21 (56.8)	7 (41.2)	
Gender					.32*
Male	40 (54.8)	10 (52.6)	23 (62.2)	7 (41.2)	
Female	33 (45.2)	9 (47.4)	14 (37.8)	10 (58.8)	
Tumor location					.04†
Inferior	43 (81.1)	15 (100)	20 (80)	8 (61.5)	
Middle	9 (17)	0 (0)	5 (20)	4 (30.8)	
Superior	1 (1.9)	0 (0)	0 (0)	1 (7.7)	
cTNM stage					.002†
I	9 (17.3)	2 (14.3)	7 (28)	0 (0)	
II	10 (19.2)	6 (42.9)	2 (8)	2 (15.4)	
III	33 (63.5)	6 (42.9)	16 (64)	11 (84.6)	

NOTE.

* Chi square *P* value for independence between clinical variables and IS_B level

† Fisher's test *P* value for independence between clinical variables and IS_B level

Supplementary Table S3 : Median survival [+/- IQR] and event numbers

	OS (months)	Death Nb.	TTR/DFS (months)	Relapse Nb.	Relapse or Death Nb.
All	45.4 (25.7-65.5)	55	38.5 (16.4-58)	60	79
cohort 1	55 (32.3-91.3)	22	46.4 (23.7-81.7)	23	30
cohort 2	36.9 (18.6-48.3)	33	32.5 (10.4-47.7)	37	49
W&W	37.1 (24.2-59.2)	15	31.5 (20.3-45.6)	14	22

Supplementary Table S4. Nanostring probes			
num	Genes	Accession N.	Position
1	CCL2	NM_002982.3	1-100
2	CCL5	NM_002985.2	281-380
3	CCR2	NM_001123041.2	744-843
4	CD247	NM_198053.1	1491-1590
5	CD274	NM_014143.3	50-149
6	CD3D	NM_000732.4	111-210
7	CD3E	NM_000733.2	76-175
8	CD3G	NM_000073.2	405-504
9	CD69	NM_001781.1	461-560
10	CD8A	NM_001768.5	1321-1420
11	CTLA4	NM_005214.3	406-505
12	CX3CL1	NM_002996.3	1217-1316
13	CXCL10	NM_001565.1	41-140
14	CXCL11	NM_005409.3	591-690
15	CXCL13	NM_006419.2	211-310
16	CXCL9	NM_002416.1	1976-2075
17	CXCR3	NM_001504.1	81-180
18	GNLY	NM_012483.2	881-980
19	GZMA	NM_006144.2	156-255
20	GZMB	NM_004131.3	541-640
21	GZMH	NM_033423.3	706-805
22	GZMK	NM_002104.2	701-800
23	GZMM	NM_005317.2	670-769
24	ICOS	NM_012092.2	641-740
25	IFNG	NM_000619.2	971-1070
26	IHH	NM_002181.2	1694-1793
27	IL15	NM_172174.1	1686-1785
28	IL17A	NM_002190.2	241-340
29	IRF1	NM_002198.1	511-610
30	ITGAE	NM_002208.4	904-1003
31	LAG3	NM_002286.5	1736-1835
32	LTK	NM_001135685.1	2419-2518
33	PDCD1	NM_005018.1	176-275
34	PF4	NM_002619.2	1-100
35	PRF1	NM_005041.3	2121-2220
36	REN	NM_000537.3	356-455
37	SP2	NM_003110.5	405-504
38	STAT1	NM_139266.1	456-555
39	STAT4	NM_003151.2	790-889
40	TBX21	NM_013351.1	891-990
41	TNFRSF18	NM_148901.1	303-402
42	TNFRSF9	NM_001561.4	256-355
43	TSLP	NM_033035.4	900-999
44	VEGFA	NM_001025366.1	1326-1425
45	ACTB	NM_001101.2	1011-1110
46	GUSB	NM_000181.3	1900-1999
47	PROM1	NM_006017.1	926-1025
48	VPS33B	NM_018668.3	2141-2240

Supplementary Table S5. Univariate survival analysis according to clinical factors and IS₈

Characteristics	n	Disease-free survival			Time to recurrence			Overall survival		
		HR (95% CI)	5 year % (95% CI)	P*	HR (95% CI)	5 year % (95% CI)	P*	HR (95% CI)	5 year % (95% CI)	P*
Age										
≤ 65 years	123	1 (reference)	63 (54-73)		1 (reference)	66 (7-71)		1 (reference)	77 (6-87)	
> 65 years	121	0.74 (0.47-1.18)	70 (62-80)	0.20*	0.59 (0.35-0.99)	78 (5-86)	0.05*	1.04 (0.58-1.89)	77 (6-86)	0.89*
Sex										
M		1 (reference)	62 (55-71)		1 (reference)	68 (6-76)		1 (reference)	74 (6-83)	
F		0.68 (0.40-1.14)	76 (67-86)	0.14*	0.69 (0.39-0.23)	79 (6-89)	0.21*	0.71 (0.37-1.39)	83 (6-93)	0.31*
Tumor Location										
Inferior	123	1 (reference)	66 (57-71)		1 (reference)	70 (6-79)	0.42*	1 (reference)	74 (6-84)	0.83*
Middle	89	1.16 (0.72-1.88)	63 (53-75)	0.31*	1.03 (0.6-1.75)	70 (6-81)	0.92*	0.88 (0.46-1.66)	79 (6-89)	0.69*
Superior	31	0.57 (0.2-1.44)	83 (70-98)	0.23*	0.52 (0.18-1.48)	85 (7-99)	0.21*	0.77 (0.27-2.22)	85 (8-99)	0.63*
cTNM										
I-II	69	1 (reference)	71 (61-84)		1 (reference)	72 (8-85)		1 (reference)	83 (6-94)	
III	175	1.28 (0.75-2.18)	65 (57-73)	0.37*	1.05 (0.6-1.84)	71 (6-79)	0.86*	1.85 (0.88-3.85)	75 (5-83)	0.09*
Immunoscore₈ (IS₈)										
Low	53	1 (reference)	55 (43-71)		1 (reference)	63 (11-79)		1 (reference)	68 (11-94)	
Intermediate	125	0.72 (0.43-1.21)	63 (54-73)	0.22*	0.78 (0.44-1.39)	69 (7-78)	0.40*	0.7 (0.38-1.34)	77 (5-86)	0.28*
High	60	0.21 (0.08-0.51)	89 (80-98)	0.0002*	0.22 (0.08-0.61)	90 (5-99)	0.001*	0.39 (0.15-1)	81 (10-98)	0.04*
IS₈ mean score		0.988 (0.979-0.997)	-	0.0096†	0.989 (0.979-0.999)	-	0.034†	0.993 (0.982-1.005)	-	0.239†

NOTE:
* Log rank test
† Wald's p value
HR = Hazard ratio, CI = Confidence interval
- Not applicable

Supplementary Table 6. Multivariate cox proportional hazards analysis of time to relapse combining IS_B with clinical parameters available in 52 Watch and Wait patients

	HR (95% CI)	P value*
Age		
Under vs Over 65 y	1.51 (0.26-8.83)	0.6475
cTNM stage		
III vs I-II	9.27 (0.9-95.87)	0.0617
Tumor Location		
Inferior vs Middle + Superior	1.92 (0.16-22.7)	0.6037
IS_B	0.19 (0.04-0.95)	0.0433

NOTE.

*The significance of the Cox multivariate regression model was evaluated with the Wald p value

One superior rectal tumor location was combined to 9 middle rectal tumors

All clinical parameter were available for 52 on 73 watch and wait patients

HR=Hazard ratio; CI= confidence interval

Supplementary Table S7: Concordance between Immunoscore (IS) calculated in colon biopsy samples and associated resected tumors.

		IS resected tumor		
		Low	Int.	High
IS-Biopsy	Low	4	1	0
	Int.	2	7	3
	High	0	8	8

Kappa = 0.45; $P = 0.0004$
Int. = Intermediate

Partie II. Article 2: Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to improve immune checkpoint inhibitors therapy

Nous avons dans le cadre de ma Thèse initié une collaboration avec l'équipe du Pr. Olivier Adotevi (INSERM, UMR1098, RIGHT Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon) qui avait pour objectifs :

- d'analyser les modifications du microenvironnement tumoral induites par différent type de traitement néoadjuvant (radiothérapie seule ou combinée à une chimiothérapie) chez des patients atteints de cancers de rectum.
- d'étudier dans des modèles murins syngéniques les différences entre les populations lymphocytaires ganglionnaires en fonction du statut de réponse à la radiochimiothérapie.

J'ai ainsi suivi la « formation spécifique destinée aux personnes appliquant des procédures expérimentales sur modèles rongeur », me suis entraînée à la dissection des ganglions chez la souris grâce au Dr Darraze-Jeze à la Pitié Salpêtrière. Malheureusement, à cause de la pandémie de Covid-19 et de la fermeture des laboratoires de recherche n'ayant pas comme thématique le Covid-19, je n'ai pu me rendre à Besançon que 2 fois, initier les premières expériences de mise au point (8 souris traitées) avant la fermeture des laboratoires. Seule la première partie de la collaboration a pu être menée à son terme et a fait l'objet d'une publication avec cette équipe.

Durant cette période de pandémie, j'ai changé provisoirement de thématique de recherche en m'associant aux différents projets COVID initiés par le laboratoire d'immunologie de l'HEGP en collaboration avec les services cliniques (radiologie, réanimation, médecin interne..) et le laboratoire de recherche du Pr Isabelle Cremer.

J'ai participé à cet effort collectif qui était nécessaire. Les publications issues de ces travaux ont été rajoutées en **Annexes** de ce mémoire.

RESULTATS

La combinaison de traitements en oncologie fait actuellement l'objet de nombreux essais cliniques. Ainsi, en immunothérapie anticancéreuse de nombreuses initiatives tentent de combiner différents types d'immunothérapies mais également d'y associer des traitements anti-cancéreux « classiques » (radiothérapie et chimiothérapie) afin de potentialiser leurs effets. Ainsi, l'essai de phase III, IMpassion130 publié en 2018, a montré dans les cancers du sein métastatiques triple négatifs dont la tumeur exprimait PD-L-1, que l'association atezolizumab/Nab-Paclitaxel permettait d'allonger la survie globale de 10 mois par rapport au placebo/chimiothérapie (HR 0,62, IC95%; 0.45 - 0.86) (Schmid et al., 2018).

Les différents mécanismes sous-jacents à cette synergie entre immunothérapie et radiochimiothérapie font l'objet de recherches. Dans cette publication l'équipe du Pr Olivier Adotevi a étudié dans des modèles murins syngéniques (dont 2 modèles de cancer colorectal, TC1 et MC38) les modifications immunitaires induites au sein du microenvironnement tumoral après exposition à la radiochimiothérapie ainsi que les effets de la combinaison d'un traitement par immunothérapie et radiochimiothérapie. Les principaux résultats obtenus sur les modèles murins par l'équipe du Pr Adotevi étaient :

- L'induction par la radiochimiothérapie (RCT) d'un microenvironnement tumoral proinflammatoire et d'une réponse locale de polarisation de type Th1
- L'induction par la RCT d'une expansion cellulaire T CD8⁺ spécifiques de la tumeur, ainsi qu'en cellules résidentes mémoires CD103⁺ (T_{RM})
- la combinaison simultanée de la RCT/immunothérapie (anti-CTLA4 et anti-PD-1) était plus efficace qu'un traitement par immunothérapie seule pour obtenir un effet antitumoral optimal (taille de la tumeur et survie) et pour établir une immunité protectrice durable des cellules T antitumorales.

Mon travail dans cette collaboration a consisté à étudier les modifications immunitaires induites par 2 types de traitement : la radiothérapie seule et la radiochimiothérapie. Afin de répondre à cette problématique, j'ai analysé 43 échantillons de tumeurs de rectum issues de patients ayant reçu i/ une radiothérapie néoadjuvante seule (nRT, n=13) ou ii/ de la radiochimiothérapie néoadjuvante (nRCT, n=30).

Dans un premier temps, l'ARN de 43 tumeurs de patients traités par nRT ou nRCT a été extrait à partir de bloc de tumeurs FFPE, le transcriptome a été analysé par Nanostring (panel de 48 gènes). Le panel Nanostring utilisé dans cette analyse comprenait des gènes immunitaires impliqués dans une orientation Th1 (*TBX21*, *STAT4*), dans la cytotoxicité (*GZMA*, *GZMH*, *GZMK*, *PRF-1*), l'activation T (CD69).

Trois types de profils immunitaires chez ces patients ont été observés en fonction du niveau d'expression des gènes étudiés :

- des patients ayant une signature de gènes immunitaires « hot » (n=3, 7% de la cohorte), avec un niveau d'expression des gènes étudiés élevé
- un groupe de patients « cold » (n=26, 60% de la cohorte)
- et un groupe intermédiaire « lukewarm » (n=14, 33% de la cohorte)

Tous les patients ayant un profil transcriptomique de type « hot » ou « lukewarm » appartenaient au groupe ayant reçu de la nRCT (à l'exception d'un). Les patients ayant reçu de la nRT seule appartenaient tous au profil transcriptomique « cold » (à l'exception d'un).

L'évaluation de la modulation des molécules de costimulation inhibitrice (MCI) post-traitement a été faite par immunomarquage. L'analyse de la densité des MCI (PD-1, PD-L1, LAG3, CTLA-4) a été effectuée à l'aide du logiciel d'analyse d'images Halo®. Ces analyses montraient une **augmentation significative de la densité en cellules immunitaires PD-1+, PD-L1+ ou LAG3+ entre les patients n'ayant pas reçu de traitement et les patients ayant un traitement néoadjuvant.**

Une corrélation positive entre les trois différents profils d'activation immunitaire et le degré d'infiltration en PD1, PD-L1 (cellules tumorales et cellules immunitaires), CTLA-4 et LAG3 des pièces opératoires post-traitement néoadjuvant a été retrouvée, suggérant que la **radiochimiothérapie pouvait induire un microenvironnement immunitaire tumoral plus activé comparé à de la radiothérapie seule.**

Enfin, une corrélation positive entre le type de traitement et la qualité de la réponse était observée : les patients présentant une réponse au traitement néoadjuvant avaient principalement reçu une nRCT (93,3% nRCT vs 53,9% nRT).

Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to improve immune checkpoint inhibitors therapy

Elodie Lauret Marie Joseph,¹ Amos Kirilovsky,^{2,3} Benoît Lecoester,¹ Carine El Sissy,^{2,3} Laura Boullerot,¹ Laurie Rangan,¹ Amélie Marguier,¹ Florent Tochet,⁴ Magalie Dosset,¹ Jihane Boustani,^{1,4} Patrice Ravel,⁵ Romain Boidot,⁶ Laurie Spehner,¹ Nacilla Haicheur-Adjouri,^{2,3} Florence Marliot,^{2,3} Jean-René Pallandre,¹ Francis Bonnefoy,¹ Viorel Scripcariu,⁷ Marc Van den Eynde,⁸ Emmanuel Cornillot,^{9,10} Céline Mirjolet,^{11,12} Franck Pages,^{2,3} Olivier Adotevi ^{1,13}

To cite: Lauret Marie Joseph E, Kirilovsky A, Lecoester B, *et al.* Chemoradiation triggers antitumor Th1 and tissue resident memory-polarized immune responses to improve immune checkpoint inhibitors therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021;9:e002256. doi:10.1136/jitc-2020-002256

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-002256>).

Accepted 08 June 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Professor Olivier Adotevi;
olivier.adotevi@univ-fcomte.fr

ABSTRACT

Background Multiple synergistic combination approaches with cancer drugs are developed to overcome primary resistance to immunotherapy; however, the mechanistic rationale to combine chemoradiotherapy (CRT) with immune checkpoint inhibitors remains elusive.

Methods This study described the immunological landscape of tumor microenvironment (TME) exposed to CRT. Tumor samples from patients with rectal cancer (n=43) treated with neoadjuvant CRT or radiotherapy were analyzed by nanostring and immunohistochemistry. Studies in mice were performed using three syngeneic tumors (TC1, CT26 and MC38). Tumor-bearing mice were treated either with platinum-based CRT, radiotherapy or chemotherapy. Anti-CTLA-4 and/or anti-Programmed Cell Death Receptor-1 (PD-1) therapy was used in combination with CRT. The therapy-exposed TME was screened by RNA sequencing and flow cytometry and tumor-infiltrating T lymphocyte functionality was evaluated by interferon (IFN)- γ ELISpot and intracellular cytokine staining.

Results Front-to-front comparison analysis revealed the synergistic effect of CRT to establish a highly inflamed and Th1-polarized immune signature in the TME of patients and mice. In both settings, CRT-exposed TMEs were highly enriched in newly-infiltrated tumor-specific CD8⁺ T cells as well as tissue resident memory CD103⁺CD8⁺ T cells. In mice, CD8 T cells were involved in the antitumor response mediated by CRT and were primed by CRT-activated CD103⁺ dendritic cells. In the three tumor models, we showed that concurrent combination of CRT with a dual CTLA-4 and PD-1 blockade was required to achieve an optimal antitumor effect and to establish a broad and long-lasting protective antitumor T cell immunity.

Conclusions Our results highlight the ability of CRT to stimulate strong antitumor T-cell-mediated immunity and tissue resident memory T activation in TME, to foster immune checkpoint inhibitors action. These findings have implications in clinic for the design clinical trials combining chemoradiation with immunotherapy.

BACKGROUND

As a result of broad bioactivity across a wide range of tumor types and the durability of tumor responses, immune checkpoint inhibitors (ICI) have deeply revolutionized the practice of medical oncology.^{1,2} Nevertheless, most patients still progress on these treatments, strengthening the importance of unraveling the underlying mechanisms of primary resistance to immunotherapy. A well-described marker of non-responsiveness to ICI is the absence or low abundance of lymphocytes in the tumor microenvironment (TME), the so-called cold non-inflamed tumors.³ Several other resistance mechanisms have been described, including alterations of interferon (IFN)- γ signaling, defects in antigen presentation pathways, accumulation of immunosuppressive cells as well as tumor angiogenesis.⁴⁻⁷ Hence, turning cold tumors into hot and inflamed ones is still a current challenge. One critical approach to circumvent the primary resistance to ICIs is based on their combination with cytotoxic drugs.^{8,9} Indeed, evidence support the immunological effects of conventional chemotherapies and radiotherapies, playing a key role in the priming of antitumor T-cells and in enhancing tumor cells sensitization to immune attacks.¹⁰⁻¹² Indeed, multiple combinations of ICI with chemotherapy (CT) or radiotherapy (RT) are currently used or evaluated in clinic.¹³⁻¹⁶

In this context, concurrent chemoradiotherapy (CRT) also gained significant interest as potential strategy to convert a non-inflamed TME to an inflamed one. Although, previous studies suggest that CRT

could create an appropriate immune environment for checkpoint blockade therapy action, results from clinical studies showed that this combination is still ineffective in most patients with cancer, illustrating the need to better understand the immunological effects driven by CRT.^{16–20}

To address the ability of chemoradiation (CRT) to shape the immunological landscape of TME, we compared human and mouse TME exposed either to concurrent CRT, to CT or to RT.

Transcriptomic analysis in patients with colorectal cancer revealed that neoadjuvant CRT promotes a high inflamed and Th1-polarized TME as well as upregulation of PD-L1 expression as compared with neoadjuvant RT. The magnitude of CRT-induced local immune activation positively correlates with the histological response. In mouse, we performed a head-to-head comparison of transcriptomic and immunological changes of TME exposed either to CRT or CT or RT and found that CRT effectively elicits a stronger proinflammatory and T cell mediated immune signature than each monotherapy. Finally, we demonstrated that CRT combined with a dual CTLA-4 and PD-1 blockade was more effective than a single PD-1/PD-L1 blockade to sustain the CRT-induced protective antitumor T cell immunity. These results provide a new insight on immunological effects of CRT and strengthen the rationale to its use to convert a cold TME into hot one and to alleviate primary resistance mechanisms.

METHODS

Patients

The colorectal cancer tissues obtained from surgical specimens were retrospectively collected from 55 patients diagnosed between 2000 and 2014. Patients were treated by neoadjuvant treatment (RT with 5-fluorouracil-based CT (nCRT; n=30) or without CT (nRT; n=13)) and radical surgery by total mesorectal excision. Among the patients that received nRT, 7 had long course (LC) and 6 had short course (SC) RT. All patients with nCRT received LC RT (TME). LC, that is, around 45 Gy in 25 fractions with delayed surgery and the nRT ‘short course’ that is, 25 Gy in 5 fractions with early surgery. Target volumes of RT were treated according to the International consensus guidelines on Clinical Target Volume delineation in rectal cancer.²¹ Response to neoadjuvant treatment was assessed by the Dworak tumor regression grading score²² from no regression/no response (Dworak 0) to a near tumor control/a near complete response (Dworak 3): Dworak 0 (n=8); Dworak 1 (n=14); Dworak 2 (n=13); Dworak 3 (n=8).

Mouse tumor models

C57BL/6AnCrI and BALB/cAnCrI female mice were injected subcutaneously with 2.10^5 TC1, CT26, MC38, B16F10, or B16OVA cells in 100 μ L of phosphate buffered saline (PBS 1x, Gibco, France) into the left flank. Tumor growth was monitored every 3 days with a caliper and groups were formed when tumor reached a mean

diameter of 50–60 mm². All CT procedures were conducted in the Pharmacy Department of the University Hospital of Besançon (France). Mice were administered a single dose of intraperitoneal cisplatin (5 mg/kg) and 5-fluorouracil (25 mg/kg). After 2 days, mice were anesthetized by injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and received single-fraction beam photon irradiation (8 Gy) using Clinac 2100 CD (Varian Medical System) with a maximal energy of 6 MV and in 2D with one beam. Mice from control group were injected with the solvent used to dilute the drug (the Pharmacy Department of the University Hospital of Besançon, France). Anti-mouse CTLA-4 antibody (9H10, Euromedex) and anti-PD-1 (RMP1-14, Euromedex) injections (200 μ g/mouse two times a week for 2 weeks) started 2 days prior to CT and 3 days after RT, respectively. All experimental studies were approved by the local ethics committee in accordance with the European Union’s Directive 2010/63.

Statistical analysis and data visualization

A unilateral linear-by-linear association test was applied to assess associations between PD-L1 score and patient treatment. The associations between clinicopathological parameters and cells densities or gene expression level were examined using T-test or Wilcoxon-Mann-Whitney as appropriate. Partitioning around medoids algorithm was used to cluster gene expression matrix. A logistic regression model was applied to test association between ICI PD-L1, PD1, LAG3 and CTLA4, related genes and TME inflammatory status (Hot/Cold). Correlation matrices were constructed by calculation of Pearson correlation coefficients for all marker combinations. Data visualizations and statistical analyses were achieved in R version 3.6.3 with ggpubr, ggplot2, coin, ComplexHeatmap and cluster packages. For preclinical models, the statistical analyses were performed with the Graphpad Prism 6 software (La Jolla, California, USA). Multiple groups comparison was performed using the one-way or two ways analysis of variance or Kruskal-Wallis tests and two groups comparisons were done with the Mann-Whitney test. P values lower than 0.05 were considered as statistically significant (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Mice survival was estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. The event in the mice survival test was either when the size of the tumor reached 300 mm² or the death of the mouse. The log-rank test was corrected for multiples comparison using the Bonferroni method. P values lower than 0.01 were considered as significant.

More detailed information is available in the online supplemental material section.

RESULTS

Neoadjuvant CRT is more effective than RT to trigger inflamed TME in colorectal cancer

To study the changes of adaptive T cell immunity in TME induced by CRT, we performed Nanosring-based transcriptomic analysis of tumor samples from patients

with colorectal cancer (n=43) treated either by neoadjuvant radiation (nRT) or chemoradiation (nCRT) (figure 1A). The distribution of clinical parameters (age, gender, cancer location clinical (cTNM) and pathological (pTNM) tumor classifications) was well-balanced among treatment groups (online supplemental table 1). The expression level of T-cell-related genes was highly variable. Overall, 7% (n=3) exhibited a “hot signature” with high expression of genes related to Th1 immune orientation (eg, *Tbx21*, *Stat1*, *Stat4*, *Hfl*, *Ifng*), cytotoxicity (*Gzma/b/h/k/m*, *Gnly*, *Prf1*), T-cell activation (eg, *Icos*, *Tnfrsf9*), migration (eg, *Cx3cl1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*), while 33% (n=14) and 60% (n=26) exhibited the “lukewarm” and “cold” signatures, respectively, with low expression of such genes (figure 1B). All patients except one with the lukewarm/hot signature belonged to the nCRT group. In contrast, most patients treated with nRT presented non-inflamed immune signature in the TME related to a cold tumor. Notably, we found positive correlations (all $p < 0.01$) between the immune signatures (cold, lukewarm, and hot) and the expression level of immune checkpoints such as CTLA-4, PD-L1, PD-1 and LAG3, suggesting the ability of nCRT to induce a higher inflamed TME than nRT alone (figure 1C). Accordingly, immunohistochemistry analysis showed a higher density of PD-1/PD-L1 or LAG-3 positive cells in the TME of nCRT group compared with patients who did not receive neoadjuvant treatment (figure 1D,F).

Next, we focused on PD-L1 expression (on immune cells or tumor cells). We found that most colorectal tumors treated by nCRT (82%) exhibited high expression of PD-L1 on immune cells (score 3) whereas only 33% of tumor treated by nRT highly expressed PD-L1 ($p < 0.0001$). Similar trends were observed when considering PD-L1 expression on tumor cells (figure 1D,E). These results support the ability of CRT to create a strong adaptive immune resistance phenomenon in TME.

Next, we addressed the relationship between the immune response induced by CRT and the efficacy of the treatment evaluated by histological response. To this end, we used the tumor regression grading of rectal cancer after neoadjuvant treatment (Dworak).²² Best histological responses (Dworak 2 and 3) were statistically greater ($p = 0.003$) in the nCRT group than in patients treated with nRT alone (figure 1F). Notably, high inflamed TME was significantly associated with a high rate (>60%) of Dworak 2 and 3 scores, compared with the cold TME (38%; $p = 0.02$; figure 1G), suggesting that the strong local immune activation induced by CRT may contribute to its effectiveness. Collectively, CRT appears more effective to induce a proinflammatory TME suitable for ICI action.

CRT induces high proinflammatory and T cell-mediated immune signatures in the mouse TME

To study more extensively the immunological changes of TME induced by CRT, we performed a comprehensive translational study in mouse tumor models exposed or not to CRT. These tumor models consist of the lung

epithelial carcinoma HPV positive TC1 and CT26 tumors in C57BL/6 and BALB/c mice, respectively. Tumor-bearing mice were separated into four groups: vehicle untreated (CTRL), CT, (5-fluorouracil plus cisplatin), RT (8 Gy focal radiation) and CRT group that consists to a single dose of 5-fluorouracil plus cisplatin, two radiosensitive cytotoxic drugs combined with a single fraction of 8 Gy radiation. To reflect locally-advanced cancer stages, treatments were initiated when the tumor mass reached 50–60 mm² (figure 2A). As expected, a single CRT treatment was more effective than RT or CT alone to delay tumor growth ($p < 0.05$) but failed to achieve complete remission of tumors in the majority of mice (online supplemental figure S1).

First, we performed RNA sequencing of tumor-infiltrating immune cells isolated from tumor-bearing mice 7 days after the respective treatments (figure 2A). In TC1 model, CRT selectively regulated 1344 differentially expressed genes (DEGs; n=571 (42.5%), induced; n=773 (57.5%), repressed) versus <330 DEGs (13%) regulated by CT or RT; with only 536 (22%) similarly regulated in ≥ 2 therapies (figure 2B). Notably, CRT-induced DEGs were highly enriched in inflammatory responses (eg, *Il1b*, *Cxcr3*, *Tnfrsf4*), host defense (eg, *Zbp1*, *Clec4e4*), T cell-mediated immunity (eg, *CD8a*, *Ifng*, *Prf1*, *Il12rb*), Th1 polarization (eg, *Tbx21*, *Cxcr3*, *Eomes*) and neutrophil/myeloid cells activation (online supplemental figure S2). CRT-repressed DEGs mainly included extracellular matrix organization (*Mmp3*, *Coll6a1*), or vascular development (*Angptl1*, *Angptl2*), which can be involved in tumor infiltration and invasiveness. All treatments repressed G alpha signaling and positively regulated genes involved in lipoprotein metabolism, which is known to be potentially affected by RT or CT.²³

To determine the immune cell composition in TME, we used PanglaoDB database.²⁴ The correlation matrix analysis between 1258 highly variable genes within according to GSEA revealed the existence of 27 cell subtypes belonging to myeloid and lymphoid lineages. These cells were mainly distributed in three clusters (clusters 5, 7 and 8). Cluster 5 is a group of genes mainly associated with B-cells and plasma cells. Cluster 7 is related to macrophages, monocytes and natural killer (NK)-specific genes and the cluster 8 was associated with different T cell subsets (online supplemental figure S2). Unsupervised clustering analysis showed that CRT triggered stronger expression of genes associated with T-cell activation (eg, *Cd28*, *Lck*, *Zap70*, *Egr2*), exhaustion (eg, *Ctla4*, *Havcr2*, *Pdcd1*, *Lag3*, *Tigit*), memory (eg, *Cd44*, *Id2*, *Klrg*, *Prdm1*), and function (eg, *Ifng*, *Tnf*, *Prf1*, *Gzma/b*, *Fas*) than RT and CT (decrease in the range: CRT>RT>CT) (figure 2C,D). Similar results were observed with transcriptomic data from CT26 tumor model in BALB/c mice (not shown). To estimate the abundance of immune cells, we used Microenvironment Cell Populations-counter (MCP-counter) method based on a set of mouse/human orthologous genes.²⁵ As shown in figure 2E, CRT-treated tumors had an enrichment of T-cells, NK cells and monocytes, but also

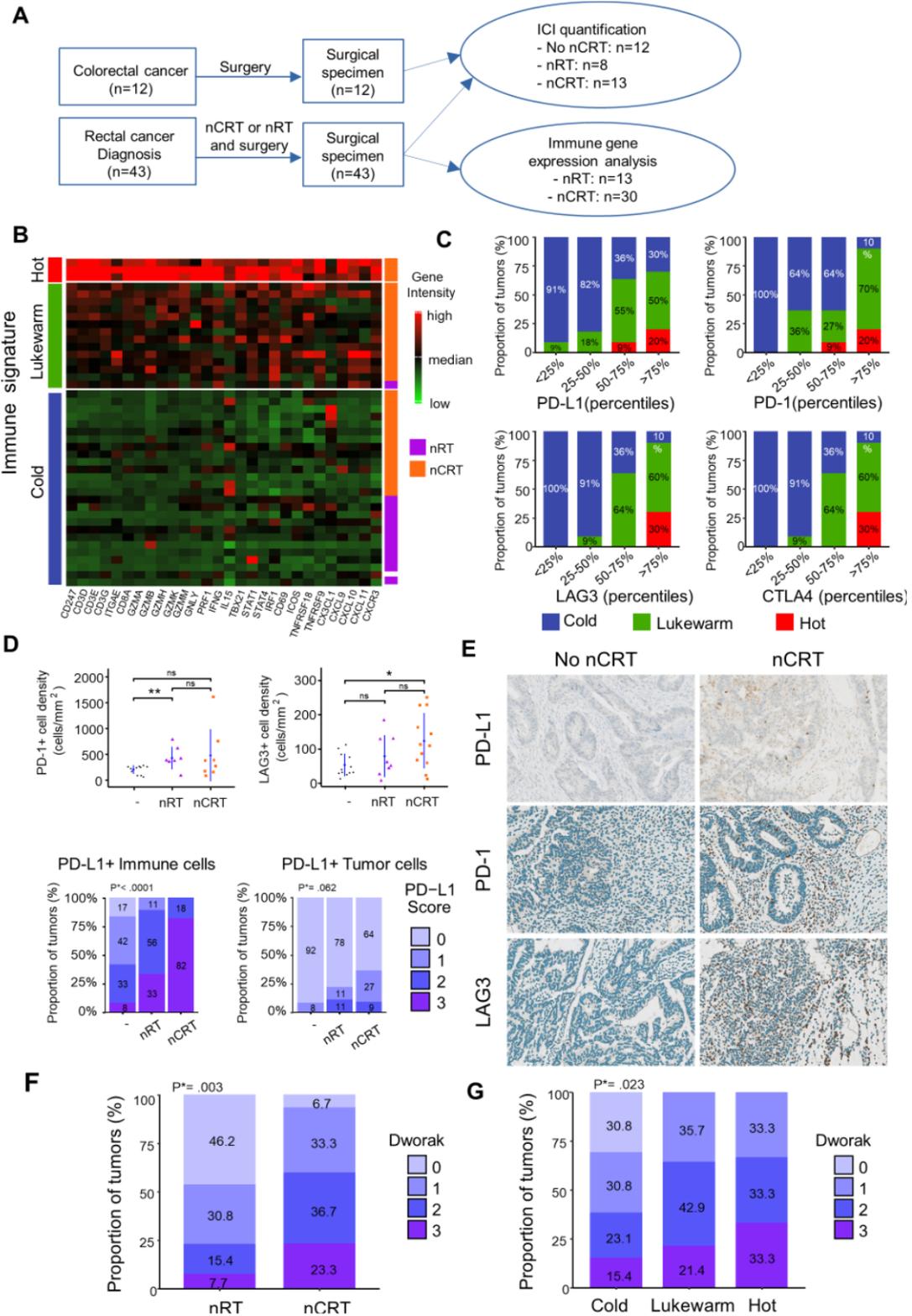


Figure 1 Tumor-associated immune signatures of human rectal cancer treated by neoadjuvant chemoradiation (nCRT) versus neoadjuvant radiation (nRT). (A) Flow chart of experimental design. (B) T cells related gene expression heatmap clustered by partitioning around medoids algorithm in patients with rectal cancer treated by nRT or nCRT. Low and high expression of genes is represented with a color gradient from red to green. (C) Percentage of hot (red), lukewarm (green) and cold (blue) tumors in ICI gene intensities categorized in quartiles. (D) Mean±SEM of PD1+ and LAG3+ cell densities in patients not treated, treated with neoadjuvant RT or CRT treatment (Upper part). Proportion of PD-L1 score level quantified in immune or tumor cells in patients not treated, with neoadjuvant RT or CRT treatment. Φ PD-L1 score in immune cells: 0:<1%, 1: 1%–5%, 2: 5%–10%, 3:>10%. PD-L1 score in tumors cells: 0:<1%, 1: 1%–5%, 2: 5%–50%, 3:>50 (lower part). (E) Examples of immunostained for PD-L1, PD-1 and LAG3 rectal tumors treated or not by nCRT. (F) Boxplots of histopathological responses to nCRT (Dworak 0 to 3) in patients treated with nRT or nCRT. (G) Boxplots of histopathological responses to nCRT in cold, lukewarm, and hot tumors. Wilcoxon test p values *<0.05 and **p<0.01. ICI, immune check point inhibitors. P^* =Unilateral linear-by-linear association test.

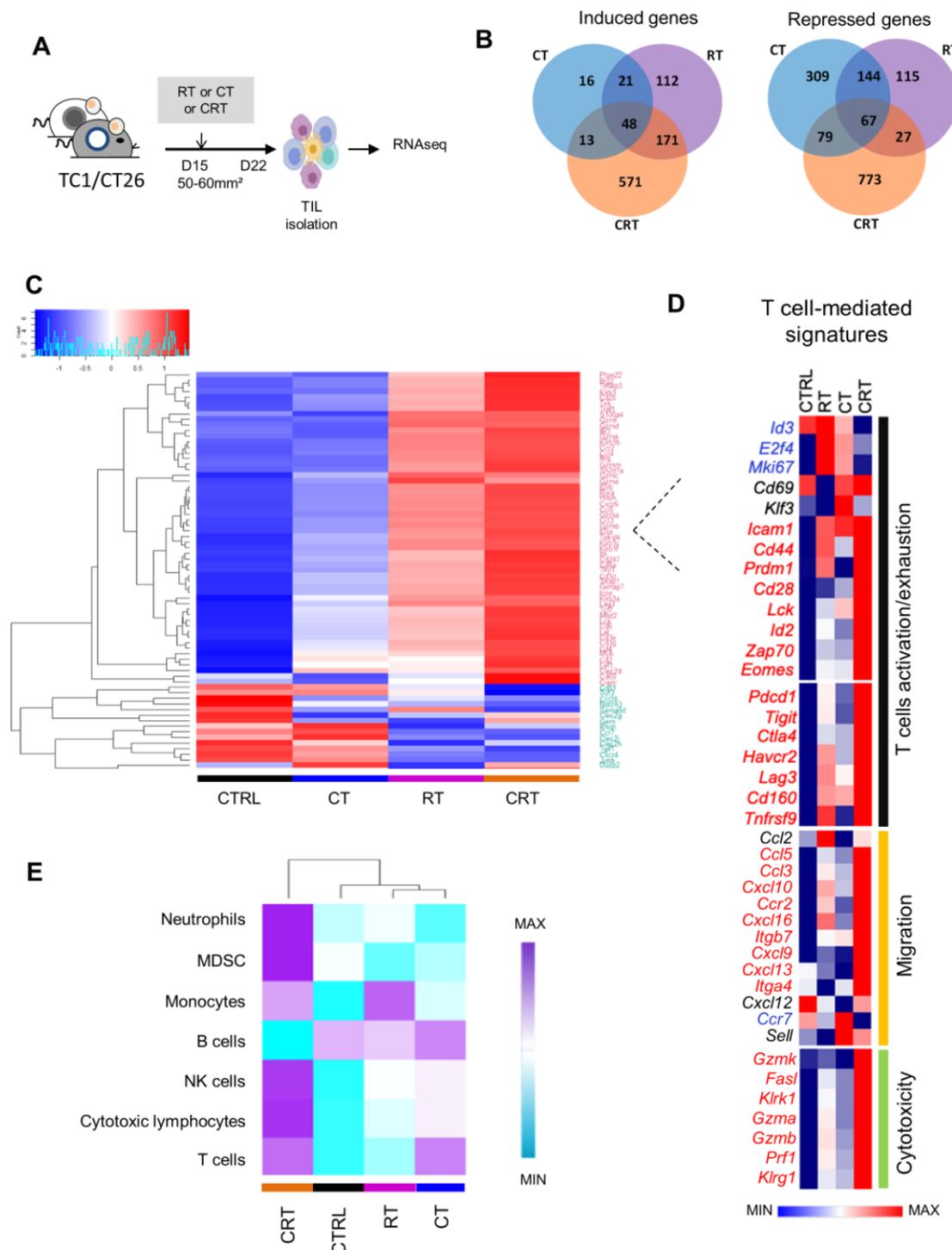


Figure 2 Comparison of transcriptomic immune signatures of mouse tumor microenvironment exposed to chemoradiation (CRT) or radiotherapy (RT) or chemotherapy (CT). (A) C57BL/6NCrI, and BALB/cAnCrI mice were injected subcutaneously with 2.10^5 TC1-HPV16⁺ and CT26 colon tumor cells, respectively. Mice were treated with CT, RT, or CRT when the tumors reached 50–60 mm² (n=10 mice/treatment group, 3 experiments). (B) Number of differentially expressed genes (DEGs) regulated in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from each treatment group. TILs were harvested 7 days after CRT. The different treatments regulated a total of 2466 DEGs (a log₂-fold change (FC) in expression with treated mice versus control (CTRL) ≥ 3 or ≤ -3); 1344 (55%), 552 (22%), and 536 (22%) were regulated following CRT, RT or CT, and ≥ 2 treatments, respectively. (C) Heatmap showing log₁₀ normalized Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads (FPKM) of DEGs related to T-cell expressed in TILs from CTRL, RT, CT and CRT-treated TC1-bearing mice (n=6 mice/treatment group). Gene set enrichment analysis was performed using the PanglaoDB gene specific genes sets. Twenty-seven gene sets with more than 10 genes in a cluster and presenting a corrected p-value below 0.01 were selected. (D) Heatmap depicts log₂ normalized FPKM of DEGs related to T cells-related exhaustion, activation, migration and cytotoxicity signature expressed in TILs from CTRL, RT, CT and CRT mice (pool of 6 mice/group). (E) The absolute abundance of immune cell populations quantified by Microenvironment Cell Populations counter R package in TC1 tumor-bearing mice (CTRL (untreated mice), CRT, RT, CT); a pool of TILs from at least 6 mice/condition).

myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and neutrophil markers. In contrast, B cell markers were downregulated after CRT as compared with CT or RT, suggesting a shift towards a strong T cell-mediated immunity after CRT.

The antitumor effect of CRT requires early activation of effector T cells in the TME

To confirm transcriptomic data, the immune cell infiltrates isolated from tumor-bearing mice were analyzed *ex vivo* by flow cytometry after the respective treatments (figure 3A). Compared with non-CRT-exposed tumors, CRT improved the accumulation of CD4⁺ and CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) within the TME both in TC1 and CT26 tumors (figure 3B,C). To track tumor-reactive CD8⁺ TILs, we performed E7₁₉₋₃₇-K^b dextramer stainings in HPV-16+TC1 model. We detected a 2–3-fold increase in the percentage of E7-specific CD8⁺TILs in CRT-treated mice compared with the CT and RT groups (30% vs 10%–15%) (figure 3D). Kinetic analysis showed that the E7-specific CD8⁺ TILs expansion reached its peak on day 7 after CRT and then returned to a basal level on days 15–21, corresponding to the contraction phase of a T-cell response (figure 3E). The high expansion of CD8⁺ TILs activated by CRT positively correlated with the increased expression of *Cxcl9* and *Cxcl10* and *Cxcl16* transcripts, key chemokines ensuring effector T cells migration towards the tumor (figure 2D). Furthermore, we found that CD8⁺ TILs from CRT-treated mice produced higher level of effector cytokines such as, IFN- γ , TNF- α , and granzyme B (GzmB) as compared with each monotherapy (figure 3F). Similar observations were made in CT26 colorectal tumor model following CRT, suggesting the potent capacity of CRT to promote local activation of antitumor T cell immunity (online supplemental figure S3).

To determine whether the efficacy of CRT relies on effector T-cell, tumor-bearing mice were depleted in CD8 or CD4 T-cells before or after CRT. In contrast to T cell depletion prior treatment that did not impair CRT efficacy, we showed that the efficiency of CRT significantly decreased when T-cells were depleted from day 7, at the peak of T cell infiltration; this was also the case in CT26 model (figure 3G,H, and online supplemental figure S3). Furthermore, the efficacy of CRT was significantly impaired in IFN- γ knockout mice as compared with wild type mice (figure 4I).

To understand how this *in situ* T cell activation occurred, we focused our attention on CD103⁺ dendritic cells (DCs). CD103⁺ DCs are subset of cross-presenting DCs that are critical for antitumor T-cell stimulation.^{26,27} We showed that CRT triggered strong CD103⁺ expression as well as costimulation receptors such as CD40, CD80 on DC isolated from tumor draining lymph nodes (TDLN), in accordance with the transcriptomic signatures found in online supplemental figure S4. This suggests that DCs could be involved in antitumor CD8⁺T-cells priming after CRT. To test this assumption, we isolated CD11c⁺ DCs from TDLN of 3 days after CRT or from untreated

B16-OVA-bearing mice. The DC were co-cultured in presence of anti-OVA T-cells from OTI or OTII mice and the specific production of IFN- γ was assessed by the ELISpot assay (online supplemental figure S4). In contrast to DCs isolated from untreated mice, those from CRT-treated mice triggered strong IFN- γ production by naïve OTI and OTII T-cells (online supplemental figure S4). Thus, CRT improved CD103⁺ DC activation, cross-presentation and the priming of antitumor T cells responses.

Collectively, CRT synergistically promotes robust CD8 T-cell expansion and activation in the TME and requires an active IFN- γ pathway *in vivo*.

Induction of intratumoral CD103⁺ tissue resident memory CD8⁺ T cells expansion after CRT

Tissue resident memory T lymphocytes (T_{RM}) are a subpopulation of memory T cells, which ensure immune surveillance in non-lymphoid tissues. Increased T_{RM} infiltration in TME is associated to a better prognosis in several cancers.^{28,29} Furthermore, recent findings reported that the presence of T_{RM} in TME is associated to response to anti-PD-1/PD-L1 therapy.^{28,30} Thus, we wondered if the local inflammation promoted by CRT could also trigger T_{RM} activation (figure 4A).

As shown in TC1-bearing mice, the key genes related to T_{RM} signature such as retention and adhesion molecules *ITGAe* (CD103), *ITGA4* (CD49a), *RGS1* and *RGS-2*, immune checkpoints (eg, *CTLA4*, *HAVCR2*, *Pdcd1*) as well as transcription factors associated with T_{RM} (eg, *Notch-RBPJ*, *Runx3*) were highly upregulated after CRT as compared with RT and CT (figure 4B). Next, T_{RM} monitoring within TME by flow cytometry at day 7 post therapy showed that the rate of CD103⁺CD49a⁺CD8⁺T_{RM} was twofold to threefold increased after CRT as compared with RT, CT and untreated TC1-bearing mice thus, supporting the transcriptomic data (figure 4C,D). Interestingly, around 50% of tumor-specific CD8⁺ TILs displayed CD103⁺CD49a⁺CD8⁺T_{RM} phenotype in the CRT-treated group (figure 4E). Kinetic analysis revealed that a substantial proportion of E7-specific CD8⁺ T_{RM} was still detected 3 weeks after CRT and RT but not in CT-treated and untreated mice (figure 4F). Next, we investigated the functionality of the tumor-specific CD8⁺T_{RM} and found that the frequencies of IFN- γ and TNF- α producing CD8⁺ T_{RM} in response to E7₁₉₋₃₇ peptide was higher within TILs from CRT-treated mice than in control groups (figure 4G). Of note, no obvious changes of CD103⁺CD49a⁺CD8⁺T_{RM} were detected in the TDLN or in the spleen from tumor-bearing following CRT (not shown). In addition, the ability of CRT to activate tumor-specific CD103⁺CD49a⁺CD8⁺T_{RM} was also confirmed in CT26 tumor-bearing mice by tracking AH1 as model of tumor-associated antigen (figure 4H–J).

In patients with rectal cancer (online supplemental figure S5), we also found that the transcripts of T_{RM} related genes, such as (*ITGAE*) CD103 and (*ITGB4*) CD69, together with CD8 gene were simultaneously upregulated in the TME of patients treated by nCRT as compared with nRT-treated patient. Furthermore, in CRT-exposed

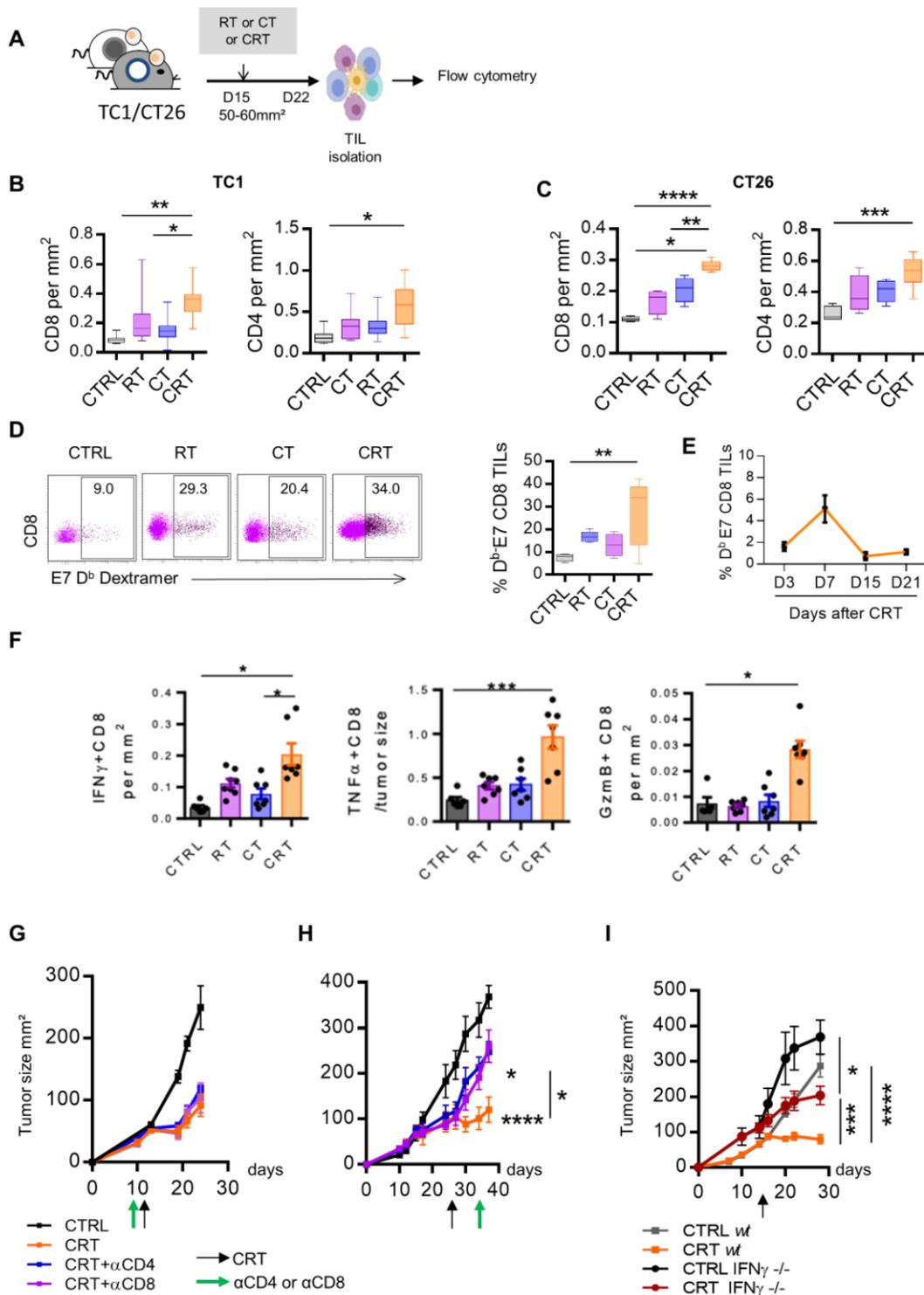


Figure 3 Antitumor effect of chemoradiotherapy (CRT) requires newly T cells infiltration in tumor microenvironment (TME) and active interferon (IFN)- γ pathway. (A) C57BL/6NCrI, and BALB/cAnCrI mice were injected subcutaneously with 2.10^5 TC1-HPV16⁺ and CT26 colon tumor cells, respectively. Mice were treated with chemotherapy (CT), radiotherapy (RT), or CRT when the tumors reached 50–60 mm² (n=10 mice/treatment group, 3 experiments). (B, C) Percentages of CD8⁺ or CD4⁺ TILs and tumor size ratio at day 7 post treatment in TC1 (B) and CT26 (C) tumor-bearing mice. (D) Representative dot plot graphs (left) and percentages of E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs (right) from the CTRL, RT, CT, or CRT-treated mice. (E) Kinetic of E7₄₉₋₅₇ specific CD8 TILs infiltration at days 3, 7, 15, and 21 post CRT. (F) Scatter plots showing percentage of IFN- γ and granzyme B (GzmB) production assessed by intracellular cytokine staining after 6 hours of stimulation with E7₄₉₋₅₇ peptide in TC1-bearing mice. (G) Tumor growth of TC1 mice receiving three injections of anti-CD4⁺ or CD8⁺ antibodies concurrently to CRT regimen. Data are representative of three experiments and expressed as means \pm SEM; n=6–7 mice/treatment group (H) Tumor growth of TC1 mice receiving three injections of anti-CD4⁺ or CD8⁺ antibodies 7 days post CRT. (I) IFN- γ ^{-/-} C57BL/6 or C57BL/6NCrI mice were injected subcutaneously with 2.10^5 TC1 tumor cells and were treated with CRT when tumors reached 50–60 mm². Tumor growth of treated mice is shown. Data are representative of three experiments and expressed as means \pm SEM; n=6–7 mice/treatment group. The one-way analysis of variance and Kruskal-Wallis tests were used; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

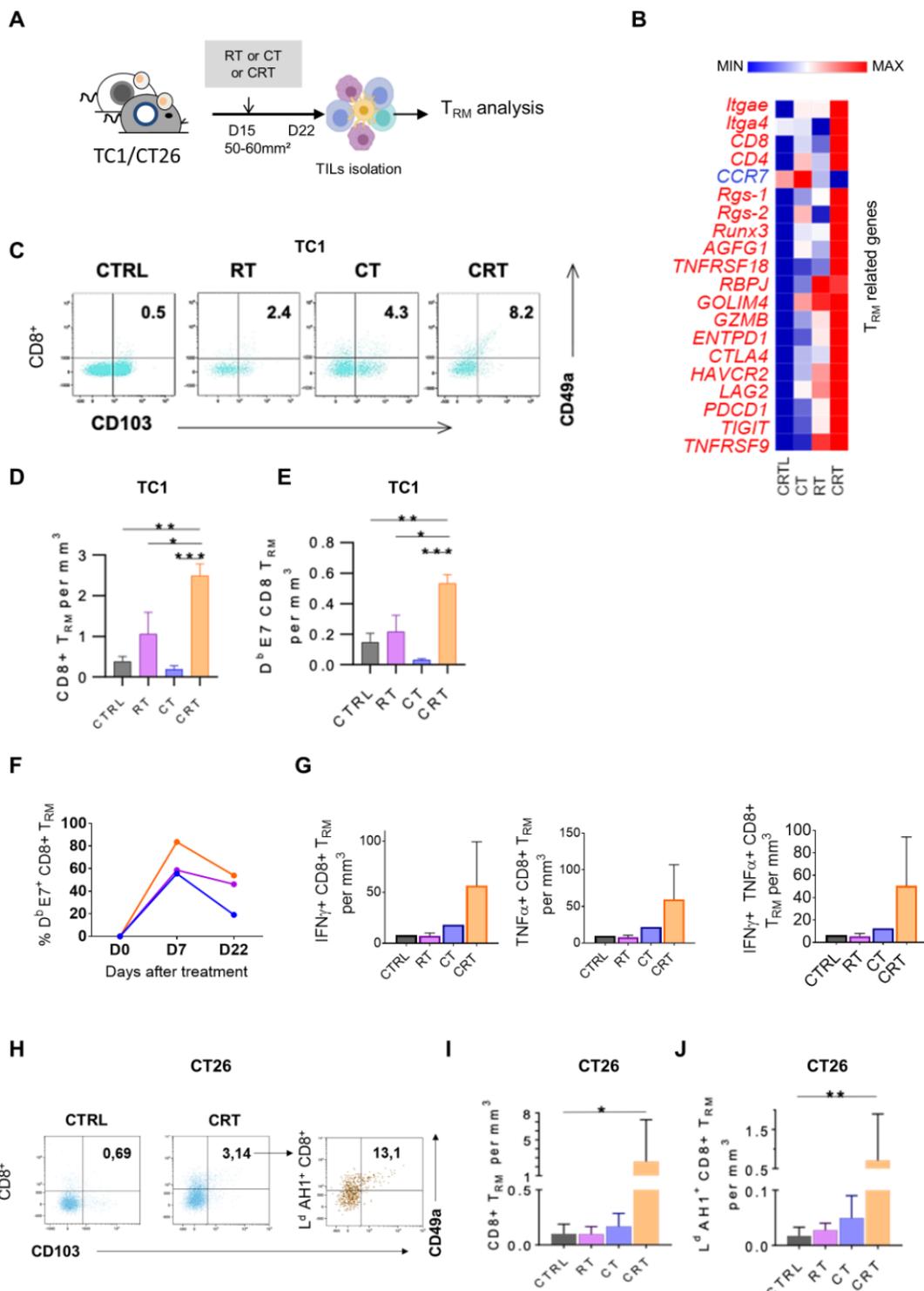


Figure 4 Concurrent chemoradiotherapy (CRT) promotes a synergistic expansion of intratumoral CD103⁺CD49a⁺T_{RM} cells. (A) C57BL/6NCrI, and BALB/cAnCrI mice were injected subcutaneously with 2.10⁵ TC1-HPV16⁺ and CT26 colon tumor cells, respectively. Mice were treated with chemotherapy (CT), radiotherapy (RT), or CRT when the tumors reached 50–60 mm² (n=10 mice/treatment group, 3 experiments). (B) Heatmap depicts log₂ normalized Fragments Per Kilobase of transcripts per Million mapped reads (FPKM) of differentially expressed genes (DEGs) related to T_{RM} signature expressed in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from CTRL, RT, CT and RTCT mice (pool of 6 mice/group). (C) Representative dot plots of T_{RM} markers expression in CD8⁺ 7 days post therapy in TC1 tumor-bearing mice. (D, E) Histograms show CD8 + T_{RM}/Tumor size ratio (D) and E7-specific-CD8 + T_{RM}/Tumor size ratio (E) 7 days post therapy in TC1-bearing mice. (F) Kinetics of the percentage of TRM in the CD8 population after treatment. (n=3 pooled mice). (G) Estimated functional infiltrate after 1 day of stimulation with E7₄₉₋₅₇ peptides. Histograms show the percentages of IFN γ ⁺ (left), TNF α ⁺ (middle) and GZMB⁺ (right) CD8 T_{RM} infiltrating the tumor. (H) Representative flow cytometry dot plots of T_{RM} markers expression on total CD8 T cells (left) and AH1₆₋₁₄ specific CD8 T cells 7 days post therapy in CT26 tumor-bearing mice treated or not by CRT. (I) Histograms show CD8 + T_{RM}/Tumor size ratio and AH1₆₋₁₄ specific T_{RM}/Tumor size ratio (J). Data are representative of three experiments. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, CTRL=untreated mice.

tumors, a strong positive correlation was found between T_{RM} markers, CD8 T cells, PD-1 and LAG-3. The strength of the T_{RM} signature and the expression of PD-1 and LAG-3 was significantly higher (around two times) in patients presenting the best histological response after neoadjuvant therapy (Dworak >2). This effect was especially observed in nCRT-exposed tumors as compared with colorectal patients treated with nRT alone (online supplemental figure S5).

Thus, our results demonstrate the ability of CRT to expand functional tumor reactive $CD103^+$ T_{RM} in the TME.

CRT induces adaptive immune resistance and regulatory T cells expansion in mouse TME

Transcriptomic data from both patients with colorectal cancer and mouse TME indicates that CRT synergistically promotes the upregulation of genes related to immune checkpoint ligand/receptors. To confirm this statement, the expression of immune checkpoint exhaustion receptors was assessed by flow cytometry from TILs isolated after CRT or monotherapy.

We detected high percentages of exhausted phenotype PD1⁺TIM-3⁺CD8⁺ TILs in CRT-treated mice as compared with the control groups (figure 5A,B). Similar phenotypic features were observed when focusing on tumor-specific CD8⁺ TILs. Indeed, a higher rate (>65%) of E7-specific CD8⁺ TILs displayed exhausted phenotype by coexpressing PD-1 and TIM-3 after CRT, as compared with RT and CT (50% and 30%, respectively) (figure 5C,D). The kinetic analysis showed that PD1⁺TIM-3⁻ anti-E7 CD8⁺ TILs reached a peak on day 7 and decreased 3 weeks later during the contraction phase of T cell response (figure 5E).

In parallel, we assessed the kinetic of PD-L1 expression in the TME by flow cytometry and found overexpression of PD-L1 in TC1 tumor tissues exposed to CRT. The induction of PD-L1 expression on TC1 cells started at 3 days after CRT, reached a peak at day 7 and decreased to a basal expression, similar to the kinetic of exhausted phenotype CD8⁺ TILs expansion (figure 5F). Similar expansion of exhausted phenotype CD8⁺TILs together with PD-L1 was also found in CT26-bearing mice (online supplemental figure S6). Moreover, transcriptomic data showed that expression of galectin 9, the ligand of TIM-3, was positively correlated with TIM-3⁺ CD8⁺TILs expansion (data not shown). All above suggest that CRT triggers strong adaptive immune resistance phenomenon in the TME.⁶

Previous evidence support the ability of RT to promote suppressive cells such as regulatory T cells in the TME which limit antitumor immunity.^{31–33} Here, we found that as RT, CRT induced high expansion of regulatory T-cells (Tregs) in the TME (figure 5G,H). By using DREG mice, we demonstrated that in vivo depletion of Foxp3⁺Tregs with diphtheria toxin (DTX) significantly increased CRT effectiveness (figure 5I–K). Furthermore, DTX treatment combined with CRT induced a high expansion of

functional E7-specific CD8⁺TILs (figure 5L,M). Thus, CRT induces immune suppressive Treg in the TME.

Immune checkpoints blockade sustains the CRT-induced adaptive antitumor T-cell immunity

All the above data suggest that CRT represents a potent approach to convert a cold TME toward a hot one suitable for ICI activity.

To this purpose, we first investigated the efficacy of CRT combined with a single agent anti-PD-1 or anti-CTLA-4 in HPV 16+TC1 tumor model. We found that these combinations, mainly with anti-CTLA-4 appeared more effective for delaying tumor growth and to increase mice survival compared with ICI alone or CRT (online supplemental figure 7). However, this approach failed to cure tumor in most mice, suggesting that this was not an optimal regimen.

Previous reports showed that concurrent blockade of PD-1 and CTLA-4 pathways may have complementary functions, leading to better tumor control.³⁴

Thus, we sought out to evaluate the dual blockade of CTLA-4 and PD-1 pathways combined with CRT in order to sustain CRT-induced antitumor T cells.

To this end, TC1-bearing mice were treated with CT or RT, or CRT combined with dual anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapy (anti-CTLA-4/PD-1) and the control groups received the dual immunotherapy alone or the cytotoxic therapies (CRT, RT or CT) (figure 6A). The results showed a strong antitumor effect of the CRT plus anti-CTLA-4/PD-1 combination therapy. Indeed, more than 80% of mice treated with this combination achieved complete tumor response and experienced significant improvement of survival as compared with the control groups (figure 6B,C). Of note, the bitherapy anti-CTLA-4/PD-1 was inefficient to eradicate TC1 tumor reinforcing the capacity of CRT to sensitize this tumor to ICI. We observed several weeks after therapy, the occurrence of vitiligo in mice cured after the CRT plus anti-CTLA-4/PD-1 combo (figure 6D). This skin immune-related side effect occurs in patients with cancer during immune checkpoint therapy and is commonly associated with therapy effectiveness.³⁵

To ensure that this combination strategy results to the establishment of a long-lasting protective antitumor immunity, we performed tumor rechallenge experiments (figure 6E). Indeed, all mice cured (>100 days after the combo CRT plus anti-CTLA-4/PD-1) rejected a second TC1 tumor graft, contrary to untreated control mice (figure 6F). Unexpectedly, these mice were also preserved from primary challenge with B16F10 melanoma, suggesting the establishment of a large diversity of tumor antigen specific T-cell responses (figure 6F). Accordingly, spleen T-cells from cured mice produced high amount of IFN- γ against a broad range of epitopes derived from E7 antigen expressed by TC1 cells as well as against MHC class I and II-restricted epitopes derived from mouse telomerase, as shared tumor-associated antigen (figure 6G,H). These results suggest that an

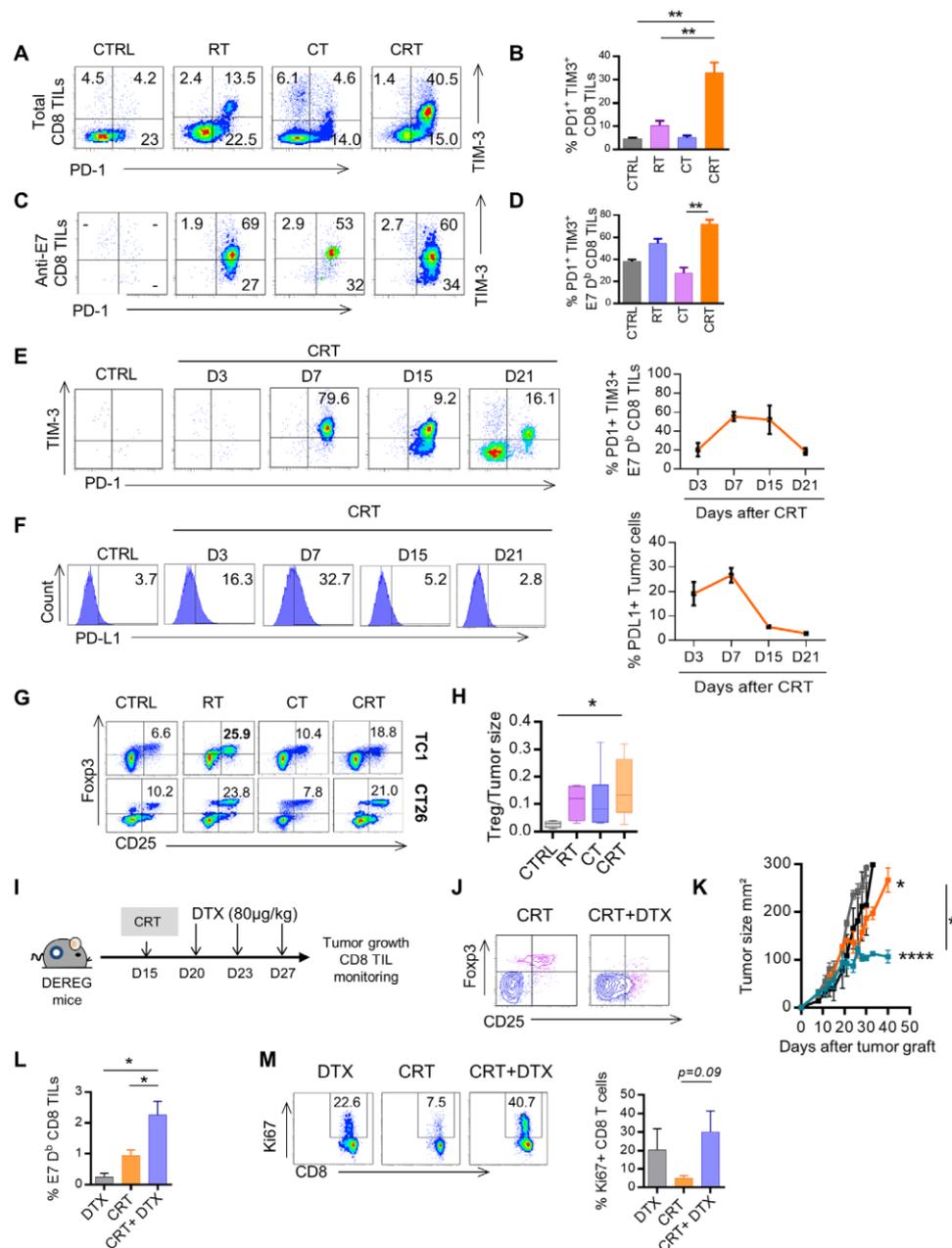


Figure 5 Triggering of adaptive immune resistance and functional T_{regs} after chemoradiation (CRT). (A) Representative flow cytometry dot plots of PD1 and TIM3 expression on total CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocyte (TILs) and on E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs in CTRL, radiotherapy (RT), chemotherapy (CT) and CRT-treated mice 7 days post treatment. (B) Histograms showing percentages of the PD1 and TIM3 coexpressing CD8⁺ TILs (data expressed as means±SEM). (C) Representative flow cytometry dot plot graphs of PD1 and TIM3 expression on E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs in CTRL, RT, CT and CRT-treated mice 7 days post treatment. (D) Histograms showing percentages of the PD1 and TIM3 coexpressing E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs (data expressed as means±SEM). (E) Flow cytometry dot plot graphs of PD1 and TIM3 coexpression on E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs assessed at days 3, 7, 15, and 21 post CRT (left) and percentages associated (right) from TC1. (F) Flow cytometry dot plot graphs of PD-L1 expression (left) and percentages associated (right) in TC1 model. (G) Representative flow cytometry dot plot graphs of TC1 (top) and CT26 (bottom)-infiltrating CD25^{high} CD4⁺ Fopx3⁺ Treg cells and the percentages/tumor size ratio according to the CTRL, RT, CT and CRT groups (left). (H) Percentages/tumor size ratio of CD25^{high} CD4⁺ Fopx3⁺ Treg cells in TC1-bearing mice. Data are representative of 2–3 experiments in each tumor model and are expressed as means±SEM; n=5–6 mice/treatment group. The Kruskal-Wallis test were used; **p<0.01. (I–M) Depletion of Regulatory T cell (DEREG) mice (n=5/treatment group) were injected with 2.10⁵ TC1 cells and were treated or not treated with CRT. Treg cells were conditionally depleted using diphtheria toxin (DTX). (I) Schedule of DTX injections is shown. (J) Representative flow cytometry dot plot graphs of Treg cells in mice treated with CRT with or without DTX. (K) Scatter plots showing tumor growth in DEREG mice treated with CRT with or without DTX. Data are representative of two independent experiments; n=5–6 mice/treatment group. (L) Representative dot plot graphs of E7₄₉₋₅₇ specific CD8⁺ TILs (top) from the DTX, CRT, and CRT plus DTX-treated mice (left) and associated percentages (right). (M) Representative flow cytometry dot plot graphs showing of Ki67 expression on CD8⁺ TILs (left) and associated percentages (right). Data are representative of two independent experiments and are expressed as means±SEM; n=5–6 mice/treatment group. The one-way analysis of variance and Kruskal-Wallis tests were used; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

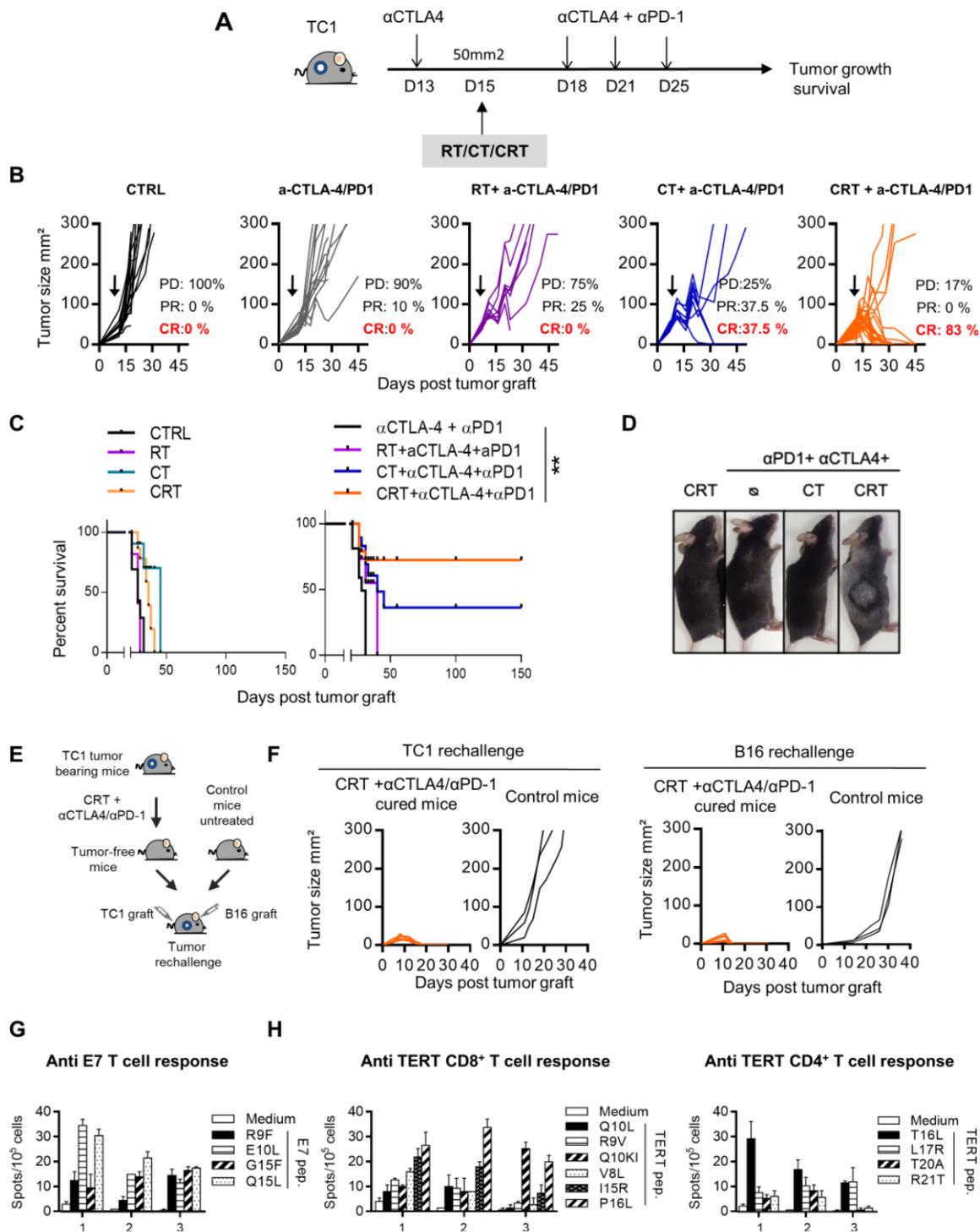


Figure 6 Effect of single or dual immune checkpoint blockade combined with concurrent chemoradiotherapy (CRT) in TC1-bearing mice. (A) TC1 tumor-bearing mice received a single injection of anti-CTLA-4 (200 μ g ip) 2 days before CRT followed by three injections of anti-PD-1 and CTLA-4 antibodies (200 μ g ip each) 3 days post CRT. (B) Tumor growth of CTRL, chemotherapy (CT), radiotherapy (RT) and CRT-treated mice with or without anti-CTLA-4/PD-1 therapy. Tumor responses (progressive disease (PD), partial response (PR), complete response (CR)) are indicated. (C) Survival curves of TC1 tumor-bearing mice. (D) Representative images of mice with vitiligo undergoing treatment ($n=8-12$ mice/treatment group). Data are representative of two experiments. (E) Tumor-free mice that were treated with CRT+anti-CTLA-4/PD-1 were re-challenged with TC1 and B16 tumor cells 100 days after CRT. (F) Tumor growth curve of untreated or CRT+ anti-CTLA-4/PD-1-treated cured mice rechallenged with TC1 (left) and B16 (right) tumor cells 100 days post CRT. (G) Splenocytes from TC1 tumor-cured mice previously treated with CRT+anti-CTLA-4/PD-1 were assessed ex vivo for specific interferon (IFN)- γ production in presence of E7 by IFN- γ ELISpot assay. Functional analysis of anti-E7 CD8 $^+$ T cell responses are shown. Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean \pm SEM. (H) Splenocytes from CRT+anti-CTLA-4/PD-1-treated cured mice were assessed ex vivo for specific IFN- γ production in presence of telomerase by IFN- γ ELISpot assay. Functional analysis of CD8 $^+$ telomerase-derived peptides T-cell responses (left) and CD4 $^+$ telomerase-derived peptides T-cell responses (right) are shown. Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean \pm SEM.

epitope spreading phenomenon may also contribute to the efficacy of the CRT combined with anti-CTLA-4/PD-1 bitherapy.

In the CT26 model, which mimic microsatellite stable (MSS) colorectal cancer, we also found that CRT was able to sensitize this tumor to the dual anti-CTLA-4/PD-1 blockade in BALB/c mice. Notably, more than 75% of CT26 tumor-bearing mice treated with the combo CRT+anti-CTLA-4/PD-1 displayed complete tumor regression as compared with CRT combined with a single ICI (figure 7A).

Finally, we tested this combination approach in MC38 tumor, a second model of colorectal cancer, syngeneic in C57BL/6 mice. This tumor has additional advantage of being a microsatellite instable (MSI) CRC model known to be more sensitive to checkpoint inhibitors.³⁶ Although tumor control was observed in all mice treated with anti-CTLA-4/PD-1, complete remissions were only achieved in MC38 tumor-bearing mice treated with the combo CRT+anti-CTLA-4/PD1 (60%) (figure 7B,C). Although the cured mice failed to reject primary TC1 graft (figure 7D,E), the growth of this tumor appeared to be slower in cured mice than in untreated control mice (figure 7E,F). In contrast, cured-mice successfully rejected a second challenge with MC38 cells and also exhibited functional CD8 T cells directed against A9M peptide, a neoepitope expressed by MC38 cells, thus demonstrating that the immune protection triggered by CRT was tumor specific (figure 7G,H).

Collectively, our results strongly support the capacity of CRT to establish a highly inflamed TME, suitable for ICI effectiveness.

DISCUSSION/CONCLUSION

Many synergistic combinational therapies have been designed to improve the success of current ICI.³⁷ Among them, the combination of ICI with conventional cytotoxic therapies is currently used or evaluated in routine clinical practice in many solid tumors.^{2,8,9} In this context, concurrent CRT also gained significant interest in the clinic as combinatorial strategy with ICI. CRT represents a standard curative treatment for several locally advanced cancers.³⁸ The addition of CT to radiation synergistically improves locoregional control through the induction of irreversible DNA damages.³⁸

In this study, we performed an in-depth understanding of the immunological effects of CRT on TME. Our results demonstrated the potent ability of CRT to convert a poorly immunogenic TME into a highly inflamed one.

The findings in patients with colorectal cancer demonstrated that a neoadjuvant CRT (nCRT) creates a higher inflamed TME than nRT. The TME from most patients treated by nCRT displayed a transcriptomic signature related to activated and memory Th1 polarization as compared with the group treated by nRT alone. Although this cohort is limited, our results described a positive correlation between the inflamed signature induced by

nCRT and the histological response.²² Indeed, more than 65% of best histological response (Dworak ≥ 2) occurred in patients exhibiting a hot/lukewarm TME after neoadjuvant therapy. The majority of high-inflamed tumors were observed after nCRT, suggesting that nCRT synergistically exert an immune activation in the TME. The TME of patients with rectal cancer exposed to nCRT was more enriched in PD-L1 expressing cells than those treated by nRT alone. Indeed, more than 80% of tumor from patients treated by nCRT exhibited a high score of PD-L1 expression. Many evidences support that the level of PD-L1 expression in TME is correlated to the efficacy of ICIs and thus, PD-L1 status became a standard predictive biomarker for anti-PD-1/PD-L1 therapy decision in some cancers.³⁹ Of note, less than 10% of tumors untreated by a neoadjuvant therapy (surgery exclusive) exhibited a high score of PD-L1 expression. The difference of in-situ immune reaction between nCRT and nRT may be related to a synergistic immune effect. Indeed, like RT, capecitabine also displays immune stimulatory effects which justified its combination with immunotherapy.^{40–42} However, we cannot exclude that the difference of in-situ immune levels between nRT and nCRT tumors may be explained by tumoral-associated features such as mismatch repair, KRAS, BRAF mutational status and differentiation grade, rather than treatments received. Nevertheless, as treatment regimens are not associated to these features, the probability of unbalanced frequencies is decreased in treatment groups and so these parameters should not interfere with observed differences. The treatment duration does not seem to have major impact on immune microenvironment as all patients with nRT that had LC or SC RT exhibited a cold homogeneous immune signature except one patient with LC in Nanostring-based transcriptomic analysis. Thus, these results suggest that the immune activation triggered by nCRT could create a more suitable TME for ICI action rather than nRT.

To study more precisely the immunological changes induced by CRT in the TME, we performed a high throughput translational study in mouse tumor models exposed to RT, CT or CRT.

The study was conducted in C57BL/6 mice using HPV16 E7 +TC1 tumor and in BALB/c mice with CT26, a syngeneic model of colon cancer. These malignancies are typically treated by platinum-based CRT in clinical settings. Thus, cisplatin and 5-fluorouracil, two common radio-sensitizing cytotoxic drugs for human cancers, followed by RT at focal 8 Gy were administered to tumor-bearing mice.^{43,44}

Like in patients with colorectal cancer, transcriptomic data from TILs isolated in CT26 and TC1 tumors showed that inflammatory responses, cellular-mediated immunity and the INF- γ signaling pathway were synergistically enriched in CRT-exposed TME. Kinetic analysis of T-cells from CRT-exposed TME indicates that CRT promotes a massive and early expansion of CD8⁺ T-cells within the tumor during the first 7 days, followed by a contraction phase at days 15–21. The importance of newly T-cell

Figure 7

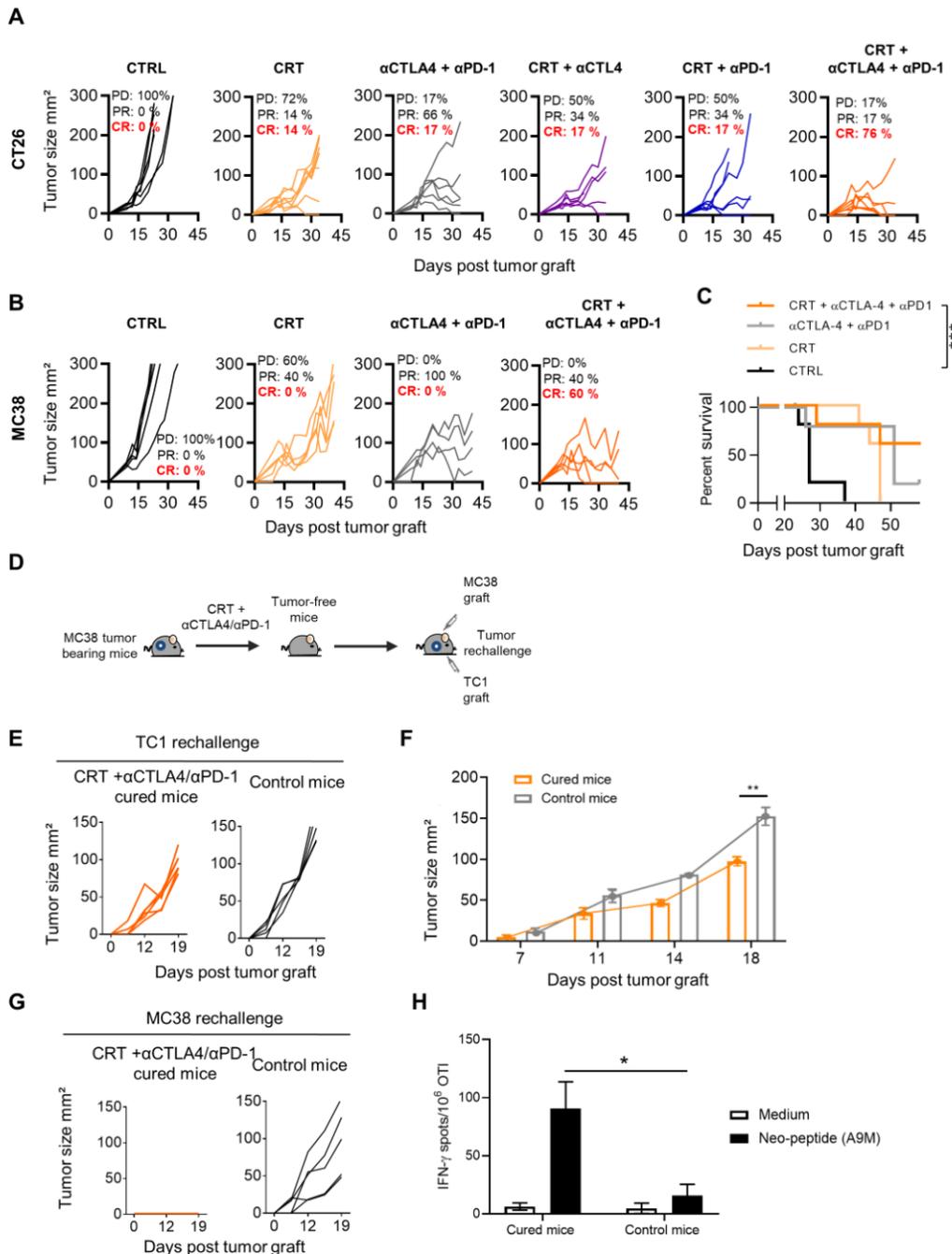


Figure 7 Effect of single or dual immune checkpoint blockade combined with chemoradiotherapy (CRT) in CT26 and MC38 tumor-bearing mice. (A) CT26 tumor-bearing mice received or not a single injection of anti-CTLA-4 (200 µg ip) 2 days before CRT followed by three injections of anti-PD-1 and/or CTLA-4 antibodies (200 µg ip each) 3 days post CRT. Tumor growth of CTRL and CRT-treated mice with or without anti-CTLA-4/PD-1 therapy. Tumor responses (progressive disease (PD), partial response (PR), complete response (CR)) are indicated. (B) MC38 tumor-bearing mice received or not a single injection of anti-CTLA-4 (200 µg ip) 2 days before CRT followed by three injections of anti-PD-1 and/or CTLA-4 antibodies (200 µg ip each) 3 days post CRT. Tumor growth of CTRL and CRT-treated mice with or without anti-CTLA-4/PD-1 therapy. Tumor responses (progressive disease (PD), partial response (PR), complete response (CR)) are indicated. (C) Survival curves of MC38 tumor-bearing mice. Data are representative of two experiments with 6–8 mice/group, the Bonferroni method was used. *** $p < 0.001$. (D) MC38 tumor-free mice that were treated with CRT+anti-CTLA-4/PD-1 were rechallenged with TC1 tumor cells. Experimental scheme is depicted. (E) Tumor growth curve of TC1 tumors engrafted to untreated or MC38 tumor-free mice previously treated by CRT+anti-CTLA-4/PD-1. (F) Kinetic of TC1 tumor growth in CTRL and MC38 tumor-free mice previously treated with CRT+anti-CTLA-4/PD-1. (G) Tumor growth curve of MC38 tumors engrafted to untreated or MC38 tumor-cured mice previously treated by CRT+anti-CTLA-4/PD-1. (H) Splenocytes from MC38-cured mice previously treated by CRT+anti-CTLA-4/PD-1 were assessed ex vivo for specific interferon (IFN)- γ production in presence of the A9M neopeptide by IFN- γ ELISpot assay. Functional analysis of anti-A9M CD8⁺ T cell responses are shown. Data are representative of one independent experiment and are expressed as mean \pm SEM. Kruskal-Wallis test was used; * $p < 0.05$.

migration was supported by results showing that T-cells depletion during the expansion phase (day 7) abrogated the ability of CRT to delay tumor growth in contrast to T cell depletion performed prior CRT. These findings are in line with report by Shinto and colleagues showing increased CD8⁺ T-cell infiltration in tumor biopsies from patients with rectal cancer treated by CRT.¹⁸ Furthermore, our recent findings in patients with rectal cancer showed a positive association between the signs of local cytotoxic immune activation and the production type-I interferon-associated molecules and the response to neoadjuvant CRT.⁴⁵ These results highlight that the effectiveness of CRT relies on its capacity to foster early expansion of functional tumor-reactive CD8⁺ T cells in the TME.

Another important result of this study both in human and mouse concerns the potent capacity of CRT to trigger tumor-specific CD103⁺ tissue resident memory CD8⁺ T cells expansion and activation in the TME both in TCl and CT26 models.

T_{RM} are usually confined within non-lymphoid tissues, and rapidly display effector functions on antigen stimulation. Intratumoral T_{RM} cells have been detected in several solid tumors and are thought to play a critical role in cancer immunosurveillance as well as in immunotherapy.^{28 30 46} We found that genes encoding Notch and Runx3 transcription factors, two master regulators involved in CD8⁺T_{RM} cells induction and maintenance^{30 47} were highly upregulated and positively correlated to T_{RM} signature after CRT. This capacity of CRT to promote strong T_{RM} stimulation may explain the positive correlation observed between the magnitude of T_{RM} signature and the best histological response after nCRT in the rectal cancer cohort. Recent studies in mice suggested that irradiated intratumoral T_{RM} cells, which are more radio-resistant than circulating T cells mediate tumor control in the absence newly-infiltrating T cells.⁴⁸ Although the dependence of CRT on intratumoral T_{RM} activation was not formally demonstrated in this study, our results indicate that both de novo effector T cells infiltration and T_{RM} cells expansion can mediate tumor control after CRT.

Searching for the mechanism underlying the in situ T cell priming mediated by CRT, we demonstrated that fully activated CD103⁺ DCs from TDLN are involved in the robust antitumor T cell activation observed after CRT. This observation suggests that these CD103⁺ DCs migrate through TDLN to stimulate T cells and also able to prime CD103⁺ T_{RM} cells in situ.^{26 49} This observation is also in line with previous data suggesting that avoiding irradiation of tumor-draining lymph nodes (TDLN) supports immune activation.⁵⁰ Indeed, in this study, tumors were engrafted in the abdominal flank for technical convenience, thus allowing the radiation field to be selectively delivered to the tumor. Accordingly, we observed that DCs from TDLN of mice treated with RT alone were able to effectively stimulate naïve T cells, such as DCs from CRT exposed tumors (not shown). Further investigations with orthotopic models or using genetically

engineered mouse models would be needed to properly mimic human cancer settings.

Although we found that CRT triggers adaptive immune activation in the TME, this does not really translate into inhibition of tumor growth. Hence, the rate of complete and durable responses observed in our mouse tumor models did not exceed 15%. This raises the question of why the antitumor immunity primed by CRT is not sufficient to eradicate tumor in most mice. One explanation relies in the ambivalent effect of RT capable to promote immune suppressive cells such as Tregs and MDSCs.^{32 51} Here, the suppressive side effects observed after CRT were inherent to radiation and not to CT (cisplatin and 5 fluorouracil), which did not induce Tregs expansion but can deplete MDSC in vivo.¹⁰ In line with this, we demonstrated that temporal depletion of Tregs increased CRT-induced antitumor CD8⁺ TILs and in turn, improved the efficiency of CRT.

Because the induction of T-cell exhaustion has been involved in acquired resistance to CT or RT,^{52–54} we hypothesized that this phenomenon could be synergistically activated by CRT. Consistently, our data revealed overexpression of immune checkpoints (PD-1, TIM-3) on TILs expanded after CRT. Furthermore, the respective ligands of these receptors, especially PD-L1 was found to be upregulated early after CRT and its expression on tumor cells positively correlated with the dynamic PD-1⁺CD8⁺TILs, suggesting an adaptive IFN- γ -mediated immune resistance in the TME.⁵⁵ The adaptive resistance phenomenon was also found in the TME of rectal patients treated with nCRT.

All above indicates that platinum-based CRT establishes a highly inflamed TME, enriched in TILs and T_{RM} cells, PD-L1 and IFN- γ signaling, factors required for the successful responsiveness to ICI.^{4 12} Then, we evaluated concurrent combination of CRT with ICI in HPV16 E7 +TCl tumor as a model of head and neck cancers known to be sensitive to immunotherapy and in CT26, a microsatellite stable phenotype (MSS) colon cancer which is less sensitive to ICI. Results from these two models show that CRT sensitized TCl and CT26 to PD-1 or CTLA-4 blockade therapy. However, this combination strategy was not able to induce complete tumor eradication in most mice. In contrast, our results reveal that combining CRT with dual CTLA-4 and PD-1 blockade induced drastic tumor eradication in both in TCl and CT26 model. In these two tumor models, around 75% of tumor-bearing mice achieved complete tumor regression as compared with 17% and 10% when CRT was combined with a single ICI in CT26 and TCl models, respectively. These results suggest that both CTLA-4 and PD-1 inhibition is required for optimal sustaining of CRT-induced adaptive antitumor T-cell immunity. This is supported by the ability of the combinational therapy to promote robust and long-lasting antitumor T cell immunity that confer resistance against a second tumor challenge. Previous reports indicated that concurrent blockade of the PD-1/PD-L1 and CTLA-4 pathways may have complementary cellular

mechanisms distinct from monotherapy, leading to better tumor control.^{36,56} For example, highly exhausted-phenotype CD8⁺T cells were expanded following anti-PD-1 monotherapy but not after anti-CTLA-4/PD-1 bitherapy.⁵⁷ Since CTLA-4 is highly expressed on Tregs, the anti-CTLA-4 could also contribute to inhibit suppressive Tregs cells induced after CRT.^{56,58}

Interestingly, we confirmed these results in a third model of MC38 tumor used as MSI phenotype which represents a prototype of immune-sensitive tumor. In MC38 model, the heat promoting effect of CRT also resulted in a better efficiency compared with anti-CTLA-4/PD-1 bitherapy. Nevertheless, combining with CT or RT alone would probably do the same. The CRT regimen used here represents a limit of this study since a single fraction of 8 Gy does not reflect the current protocol used in the clinic. However, previous studies showed that the delivery of 8 Gy per fraction induced CD8⁺T cells recruitment in the tumor.⁴⁴ Thus, we choose this dose for the present study. Moreover, it has recently been reported that various fractionation RT dose and schemes differentially modulate the immune response in TME and thus, tumor control when associated with ICI.^{59,60} Hence, the immune responses mediated by a fractionated radiation protocol in combination with more relevant chemotherapies also deserve further investigations.

Multiple combinations of concurrent/sequential CRT plus ICI are currently evaluated in clinic or used as standard of care in some indications.^{2,15,16} Although the safety profile of these combinational therapies does not seem to limit their development, the optimal timing to introduce ICI therapy is still questioned.

In conclusion, this study deeply dissects CRT-mediated immune mechanisms and demonstrates the ability of CRT to synergistically promote an inflamed TME, robust adaptive antitumor T-cell immunity, two features that are suitable for ICIs action. Our results strengthen the rationale to concurrently combine CRT to ICI for optimal antitumor response.

Author affiliations

¹INSERM, UMR1098, RIGHT, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

²Immunology and Cancer Department, Laboratory of Integrative Cancer Immunology, Cordeliers Research Center, INSERM UMR1138, Paris, France

³Faculté de Santé, Université de Paris, Paris, France

⁴Department of Radiation Oncology, CHU Besançon, Besançon, France

⁵Equipe Bioinformatique et Biologie des Systèmes du Cancer, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier—INSERM U1194, Montpellier, France

⁶Department of Biology and Pathology of Tumors, Georges-François Leclerc Cancer Center, Dijon, France

⁷Department of Surgical Oncology, Regional Institute of Oncology Iasi, Iasi, Romania

⁸Cliniques universitaires Saint-Luc Institut Roi Albert II, Bruxelles, Belgium

⁹Cancer Bioinformatics and Systems Biology, IRCM, Montpellier, France

¹⁰Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, Montpellier, France

¹¹Department of Radiation Oncology, Georges-François Leclerc Cancer Center, Dijon, France

¹²INSERM UMR 1231, Dijon, France

¹³Department of Medical Oncology, CHU Besançon, Besançon, France

Twitter Romain Boidot @boidot_romain

Acknowledgements We thank all the patients for their contributions, all medical doctors, nurses and technicians from the Departments of Radiotherapy of the University Hospital of Besançon, especially Caroline Bonin and Tony Lim and the European Georges Pompidou Hospital (Paris) for their support to collect the data. We also thank the animal technicians for their technical support. We thank Pr. Carpentier for kindly providing us the A9M neopeptide. This work was supported by grants from the Fonds de Dotation de Recherche en Santé Respiratoire, La Ligue Contre le Cancer, and Conseil Régional Bourgogne Franche Comté.

Contributors Conceptualization: OA. Cytotoxic drugs preparation and radiation procedures in mice: CB, CL, SP, TL, MK, EM, SS, CM and FT. Preclinical tumor models: ELMJ, LR, MD, LB, MA JRP, FB, and JB. Transcriptomics techniques and data analysis in mice: RB, PR, MD, ELMJ, AK, CE, and EC. Immunological study and data analysis in mice: ELMJ, LR, LB, AM, MD, LS, JB, FB, and JRP. Patients enrolment: SS, XS, EM, JB, GP, and MV. Transcriptomics analysis, immunohistochemistry, and immune monitoring in patients with cancer: AK, FP, CE, CL, EG, AR, and LB. Writing with input from all authors: ELMJ, MD, CE, AK, FP, and OA. Supervision: OA. Funding acquisition: OA.

Funding This work was supported by grants from Fonds de Dotation de Recherche en Santé Respiratoire, La Ligue Contre le Cancer and the Conseil Régional de Bourgogne Franche Comté.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval of all centers' Institutional Review committee was obtained for the study and patients signed informed consents. All experimental studies were approved by the local ethics committee in accordance with the European Union's Directive 2010/63.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement Data are available upon reasonable request. RNAseq data from mouse tumor exposed to chemoradiotherapy is available in a public two years following the publication.

Supplemental material This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iD

Olivier Adotevi <http://orcid.org/0000-0002-7742-136X>

REFERENCES

- Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018;359:1350–5.
- Sharma P, Siddiqui BA, Anandhan S, *et al*. The next decade of immune checkpoint therapy. *Cancer Discov* 2021;11:838–57.
- Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017;541:321–30.
- Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer* 2017;117:1–7.
- Kalbasi A, Ribas A. Tumour-Intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol* 2020;20:25–39.
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, *et al*. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 2017;168:707–23.
- Ochoa de Olza M, Navarro Rodrigo B, Zimmermann S, *et al*. Turning up the heat on non-immunoreactive tumours: opportunities for clinical development. *Lancet Oncol* 2020;21:e419–30.
- Sanmamed MF, Chen L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization. *Cell* 2018;175:313–26.

- 9 Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015;161:205–14.
- 10 Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015;28:690–714.
- 11 Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological mechanisms underneath the efficacy of cancer therapy. *Cancer Immunol Res* 2016;4:895–902.
- 12 Rosenbaum SR, Wilski NA, Aplin AE. Fueling the fire: inflammatory forms of cell death and implications for cancer immunotherapy. *Cancer Discov* 2021;11:266–81.
- 13 Rivera Vargas T, Apetoh L. Can immunogenic chemotherapies relieve cancer cell resistance to immune checkpoint inhibitors? *Front Immunol* 2019;10:1181.
- 14 Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging concepts for immune checkpoint blockade-based combination therapies. *Cancer Cell* 2018;33:581–98.
- 15 Jabbour SK, Berman AT, Decker RH, et al. Phase 1 trial of pembrolizumab administered concurrently with chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer: a nonrandomized controlled trial. *JAMA Oncol* 2020;6:848–55.
- 16 Bando H, Kotani D, Tsushima T, et al. TENERGY: multicenter phase II study of Atezolizumab monotherapy following definitive chemoradiotherapy with 5-FU plus cisplatin in patients with unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2020;20:336.
- 17 Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med* 2018;379:2342–50.
- 18 Shinto E, Hase K, Hashiguchi Y, et al. CD8+ and FOXP3+ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2014;21 Suppl 3:S414–21.
- 19 Kroon P, Frijlink E, Iglesias-Guimaraes V, et al. Radiotherapy and cisplatin increase immunotherapy efficacy by enabling local and systemic intratumoral T-cell activity. *Cancer Immunol Res* 2019;7:670–82.
- 20 Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III Non-Small-Cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2017;377:1919–29.
- 21 Valentini V, Gambacorta MA, Barbaro B, et al. International consensus guidelines on clinical target volume delineation in rectal cancer. *Radiother Oncol* 2016;120:195–201.
- 22 Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:19–23.
- 23 Gao F, Liu C, Guo J, et al. Radiation-driven lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Sci Rep* 2015;5:9613.
- 24 Franzén O, Gan L-M, Björkegren JLM. PanglaoDB: a web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. *Database* 2019;2019. doi:10.1093/database/baz046. [Epub ahead of print: 01 01 2019].
- 25 Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol* 2016;17:218.
- 26 Spranger S, Dai D, Horton B, et al. Tumor-Residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy. *Cancer Cell* 2017;31:711–23.
- 27 Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008;322:1097–100.
- 28 Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother Cancer* 2018;6:87.
- 29 Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident memory T cells. *Immunity* 2014;41:886–97.
- 30 Blanc C, Hans S, Tran T, et al. Targeting resident memory T cells for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:9.
- 31 Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:256–65.
- 32 Vanpouille-Box C, Diamond JM, Pilonis KA, et al. TGFβ is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity. *Cancer Res* 2015;75:2232–42.
- 33 Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, et al. Stereotactic radiotherapy increases functionally suppressive regulatory T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2017;5:992–1004.
- 34 Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2013;19:5300–9.
- 35 Hua C, Boussemaert L, Mateus C, et al. Association of vitiligo with tumor response in patients with metastatic melanoma treated with pembrolizumab. *JAMA Dermatol* 2016;152:45–51.
- 36 Wei SC, Anang N-AAS, Sharma R, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:22699–709.
- 37 Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities Leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin* 2017;67:65–85.
- 38 Lawrence TS, Haffty BG, Harris JR. Milestones in the use of combined-modality radiation therapy and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2014;32:1173–9.
- 39 Topalian SL, Taube JM, Anders RA, et al. Mechanism-Driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:275–87.
- 40 Pol J, Vacchelli E, Aranda F, et al. Trial Watch: immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* 2015;4:e1008866.
- 41 Shitara K, Van Cutsem E, Bang Y-J, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab or pembrolizumab plus chemotherapy vs chemotherapy alone for patients with first-line, advanced gastric cancer: the KEYNOTE-062 phase 3 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020;6:1571–80.
- 42 Peereboom DM, Alban TJ, Grabowski MM, et al. Metronomic capecitabine as an immune modulator in glioblastoma patients reduces myeloid-derived suppressor cells. *JCI Insight* 2019;4. doi:10.1172/jci.insight.130748. [Epub ahead of print: 14 11 2019].
- 43 Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, et al. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2003;170:6338–47.
- 44 Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. Dna exonuclease TREX1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 2017;8:15618.
- 45 El Sissy C, Kirilovsky A, Van den Eynde M, et al. A diagnostic Biopsy-Adapted immunoscore predicts response to neoadjuvant treatment and selects patients with rectal cancer eligible for a Watch-and-Wait strategy. *Clin Cancer Res* 2020;26:5198–207.
- 46 Nizard M, Roussel H, Diniz MO, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun* 2017;8:15221.
- 47 Milner JJ, Toma C, Yu B, et al. Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature* 2017;552:253–7.
- 48 Arina A, Beckett M, Fernandez C, et al. Tumor-reprogrammed resident T cells resist radiation to control tumors. *Nat Commun* 2019;10:3959.
- 49 Menares E, Gálvez-Cancino F, Cáceres-Morgado P, et al. Tissue-Resident memory CD8+ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nat Commun* 2019;10:1–12.
- 50 Marciscano AE, Ghasemzadeh A, Nirschl TR, et al. Elective nodal irradiation attenuates the combinatorial efficacy of stereotactic radiation therapy and immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2018;24:5058–71.
- 51 Vatner RE, Formenti SC. Myeloid-Derived cells in tumors: effects of radiation. *Semin Radiat Oncol* 2015;25:18–27.
- 52 Barker HE, Paget JTE, Khan AA, et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 2015;15:409–25.
- 53 Brown JS, Sundar R, Lopez J. Combining DNA damaging therapeutics with immunotherapy: more haste, less speed. *Br J Cancer* 2018;118:312–24.
- 54 Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014;74:5458–68.
- 55 Benci JL, Xu B, Qiu Y, et al. Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade. *Cell* 2016;167:1540–54.
- 56 Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol* 2018;8:86.
- 57 Wei SC, Anang N-AAS, Sharma R, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:22699–709.
- 58 Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maitly A, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 2015;520:373–7.
- 59 Grapin M, Richard C, L'Imagne E, et al. Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT: a promising new combination. *J Immunother Cancer* 2019;7:160.

60 Demaria S, Guha C, Schoenfeld J, *et al.* Radiation dose and fraction in immunotherapy: one-size regimen does not fit all settings, so how

does one choose? *J Immunother Cancer* 2021;9.

Partie III. Cohorte de validation de biopsies de cancer du rectum, patients suivis par la stratégie de surveillance Watch & Wait (article en préparation)

1) Constitution de la cohorte de validation

Afin de confirmer les résultats préliminaires publiés dans *Clinical Cancer Research* sur la cohorte de 73 patients suivis par la stratégie de « Watch and Wait » (El Sissy et al., 2020) nous avons initié des collaborations internationales avec différents centres oncologiques pratiquant la stratégie thérapeutique de « Watch and Wait » (W&W). Ces centres étaient notamment inclus dans le consortium « IWWD » (International Watch and Wait Database).

Nous avons pu constituer une cohorte de validation issue du réseau IWWD, de **177 biopsies diagnostiques** de patients atteints de cancer du rectum traités par radiochimiothérapie néoadjuvante, bons répondeurs puis suivis par la stratégie de surveillance simple (W&W). Les nombre de patients inclus dans les différents centres sont résumés dans le **Tableau 4**.

Les biopsies diagnostiques sont rarement réalisées dans les centres réalisant la prise en charge du cancer du rectum et ne sont pas non plus centralisées secondairement par ces centres. Un effort considérable a été effectué par tous les centres afin de rapatrier ces biopsies. **Il s'agit -à notre connaissance- de la plus grosse cohorte de biopsies diagnostiques de cancer du rectum de patients bons répondeurs à la nRCT, et suivi par la stratégie de surveillance simple (W&W).**

Tableau 4. Cohorte de validation patients suivis en Watch and Wait, IS_B

Center	PI	Number of patient included
Velje Hospital, University of South Denmark	Pr Lars	42
The Netherland Cancer Institute, Antoni Van Leeuwenhoek	Pr Geerat Beets	94
Champalimaud Foundation, Liboa, Portugal	Pr Nuno Figueirido	12
Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina	Pr Juan Manuel O'Connor	20
Regional Institute of Oncology Iasi, Romania	Pr Gabriel Dimofte	9
	Total	177

Toutes les biopsies ont été centralisées sur la plateforme d'Immunomonitoring de l'Hôpital Européen Georges Pompidou afin d'y effectuer les immunomarquages.

Seule la cohorte hollandaise a été immunomarkuée localement par le centre recruteur après validation des protocoles de marquages par notre équipe et la réalisation d'une étude d'équivalence pour les immunomarquages entre nos deux centres.

Les mêmes clones d'anticorps (CD3 2GV6, 0,4 µg/mL; Ventana ; CD8 C8/144B, 3 µg/mL; Dako) ont été utilisés, ainsi que les mêmes protocoles de marquage. Seul l'automate de marquage différait entre les deux centres (BenchmarkXT vs Benchmark ULTRA). Afin de valider les immunomarquages 5 cas de biopsies ont été immunomarkués en parallèle dans les deux centres, puis comparés entre eux, en termes d'intensité de marquage et de densité immunitaire quantifiée par le logiciel d'analyse d'image. La détermination des IS_B a été faite selon la même méthodologie que dans l'article précédemment publié dans *Clinical Cancer Research* (El Sissy et al., 2020).

Les intensités de marquage CD3 et CD8 étaient équivalents dans les deux centres (**Figure 15**), ainsi que les densités calculées. Au total, toutes les biopsies tests ont été classées dans la même catégorie d'IS_B, à l'exception d'une qui avait un MeanScore de 70 sur le marquage effectué à l'HEGP et de 77,5 sur la biopsie immunomarkuée en Hollande, les classant ainsi en IS_B Int et IS_B High respectivement. Le seuil défini pour catégoriser les IS_B entre les catégories Intermédiaire et High étant strictement supérieur à 70, il a été conclu une concordance entre les marquages et la cohorte hollandaise a ainsi pu être prise en charge localement (**Tableau 5**).

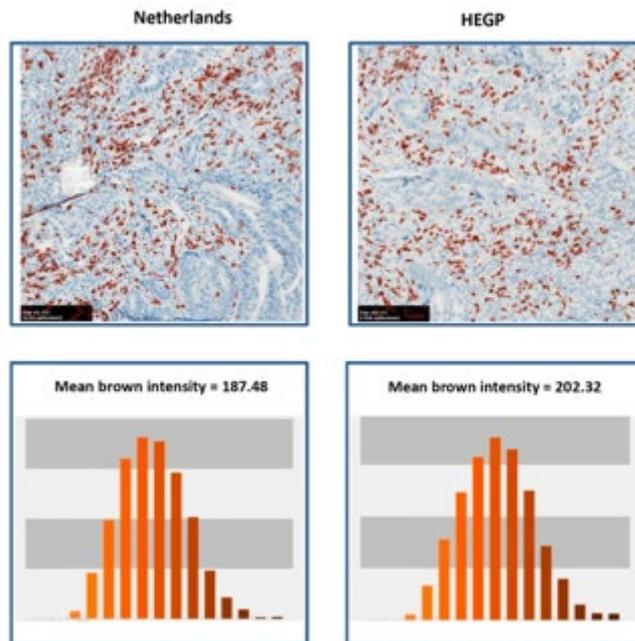


Figure 15. Comparaison de l'intensité de marquage entre les deux centres (Hollande vs France).

ID	Mean Score agreement		ISb agreement (0=Lo; 1=Int.; 2=Hi)	
	NTHLD	HEGP	NTHLD	HEGP
T15-00461A1	35	32,5	1	1
T15-00507A1	40	42,5	1	1
T15-02486A1	90	82,5	2	2
T15-06018A1	30	37,5	1	1
T15-06905A1	77,5	70	2	1

Tableau 5. Détermination des IS_B à partir d'immunomarquages fait dans les deux centres (Pays-Bas et

2) Résultats de la cohorte Hollandaise (n=94) de patients suivis par la stratégie de Watch and Wait

Les répartitions des IS_B en fonction des caractéristiques cliniques de la cohorte sont résumées dans le **Tableau 6**. La répartition des IS_B était indépendante du sexe, de l'âge, de la localisation de la tumeur (haut, moyen ou bas rectum), du stade initial de la tumeur et du type de traitement néoadjuvant reçu (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Répartition des différentes catégories d'IS_B en fonction des caractéristiques cliniques.

	[ALL] N=94	Low N=29	Int. N=52	High N=13	p.overall
Sex:					0.202
F	23 (24.5%)	4 (13.8%)	14 (26.9%)	5 (38.5%)	
M	71 (75.5%)	25 (86.2%)	38 (73.1%)	8 (61.5%)	
Age	65.0 (10.2)	65.3 (9.96)	66.4 (10.1)	58.8 (9.33)	0.052
Location.cat:					0.855
High	3 (3.19%)	2 (6.90%)	1 (1.92%)	0 (0.00%)	
Low	71 (75.5%)	21 (72.4%)	40 (76.9%)	10 (76.9%)	
Mid	20 (21.3%)	6 (20.7%)	11 (21.2%)	3 (23.1%)	
cTNM.cat:					0.758
I	3 (3.19%)	0 (0.00%)	3 (5.77%)	0 (0.00%)	
II	25 (26.6%)	7 (24.1%)	15 (28.8%)	3 (23.1%)	
III	66 (70.2%)	22 (75.9%)	34 (65.4%)	10 (76.9%)	
Type_of_neoadjuvant_treatment:					0.809
LCRT	91 (96.8%)	29 (100%)	49 (94.2%)	13 (100%)	
RT	1 (1.06%)	0 (0.00%)	1 (1.92%)	0 (0.00%)	
SCRT	2 (2.13%)	0 (0.00%)	2 (3.85%)	0 (0.00%)	
Chemotherapy:					1.000
Capecitabine	1 (10.0%)	0 (0.00%)	1 (25.0%)	0 (0.00%)	
CAPOX	9 (90.0%)	4 (100%)	3 (75.0%)	2 (100%)	

Dans cette première cohorte analysée, 30,8%, 55,3% et 13,8% des patients étaient catégorisés en IS_B Low, Int et High, respectivement en suivant la classification IS_B précédemment publiée. Les différences de temps avant récurrence (Time to relapse, TTR) entre les patients IS_B High vs IS_B Low étaient à la limite de la significativité ($p_{(High\ vs\ Low)} = 0,056$). Le test de tendance du log rank (test for trend) qui renseigne sur la relation linéaire entre l'IS_B et la survie des patients sur l'ensemble de la cohorte était significatif ($p=0.042$) (**Figure 16 A**)

Une répartition des patients de la cohorte en terciles, permettant une répartition équilibrée des patients dans 3 groupes (High, Intermediate et Low) a été réalisée. Une différence significative en terme de différence de temps avant récurrence ($p_{(High\ vs\ Low)} = 0,039$) était observée entre les groupes. Le test de tendance sur l'ensemble de la cohorte était significatif ($p_{testfortrend}=0.038$) (**Figure 16 B**).

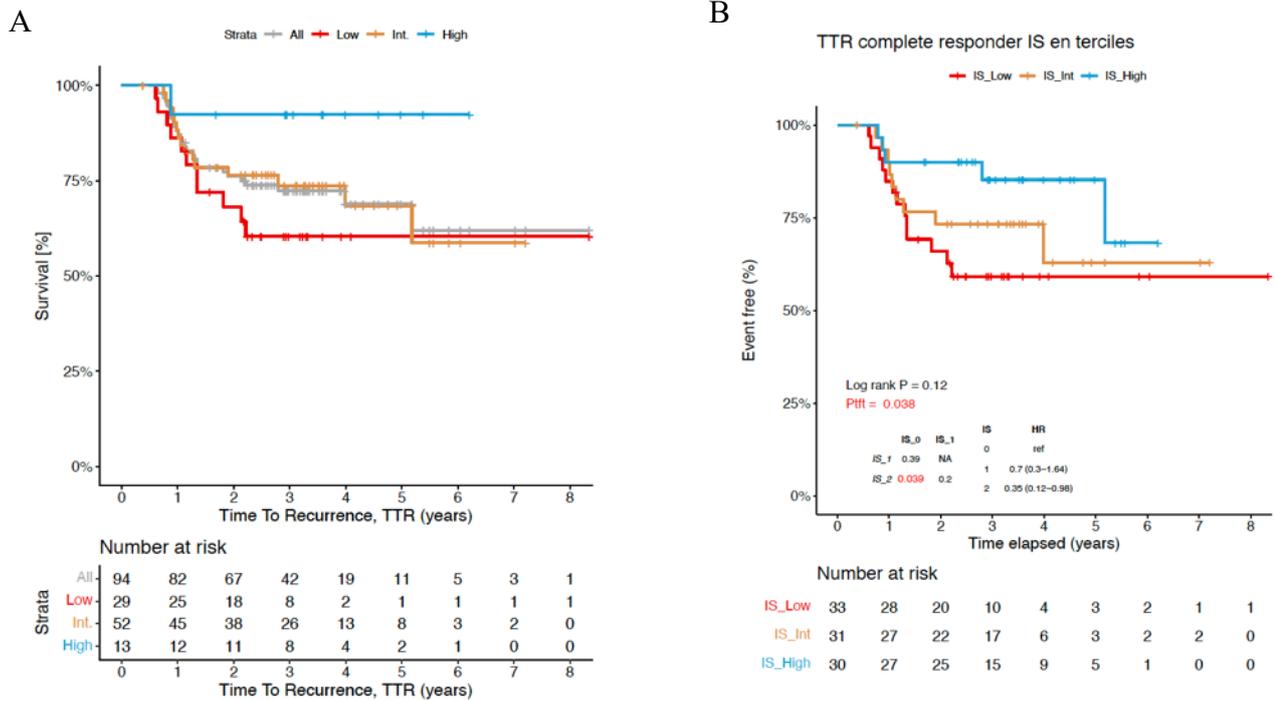


Figure 16. A. TTR en fonction de l’IS_B en trois catégories (High, en bleu, Intermediare en Jaune et Low en rouge) chez les patients bon répondeurs à la nRCT suivis par Watch and Wait. **B.** TTR en fonction de l’IS_B en tertile (High, en bleu, Intermediare en Jaune et Low en rouge) chez les patients bon répondeurs à la nRCT suivis par Watch and Wait

La probabilité de survie sans rechute à 2 et 5 ans en fonction du « Meanscore » (IS_B en variable continue) a également été modélisée selon le modèle des risques proportionnels de Cox sans (Figure 17 A) ou avec relâchement (*restricted cubic spline*) (Figure 17 B). Ainsi, la probabilité de survie sans rechute à 5 ans variait de 46% à 85% en fonction de l’IS_B meanscore chez les patients (modèle sans relâchement). Dans le modèle avec relâchement, on note que (i) un meanscore minimal de 50 est nécessaire pour percevoir un bénéfice en termes de survie sans récurrence (ii) la probabilité de survie sans rechute à 5 ans peut atteindre 95% pour les valeurs d’IS_B les plus élevées.

En prenant en compte, les données accessibles à l’initiation du traitement néoadjuvant, l’âge, le sexe, la localisation de la tumeur, le stade cTNM et l’IS_B, l’IS_B était le seul paramètre pronostique ($P_{\text{HighvsLow}} = 0,047$) (Tableau 7) en termes de prédiction du temps avant récurrence. Ainsi, la donnée immunitaire était plus informative que la donnée d’extension tumorale initiale (cTNM). Le paramètre « stadification cTNM » n’avait pas de valeur pronostique significative dans ce modèle multivarié, lorsque la valeur de l’IS_B était connue.

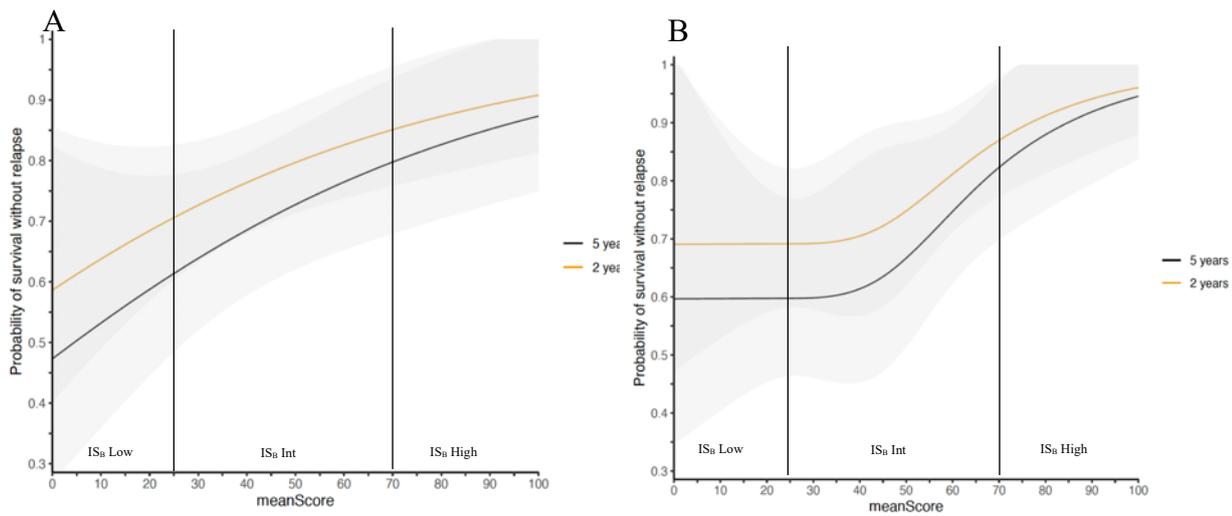


Figure 17. Probabilité de rechute à 2 ou 5 ans en fonction de l'IS_B exprimé en variable continue (IS_B Meanscore) sans relâchement (A) ou avec relâchement (restricted cubic spline ; ponts de relâchement à 25%, 45% et 70%) (B).

Caractéristiques	PHA test	HR (95% CI)	P value
Sexe	0.07		
M vs F		0.91 (0.33-2.53)	0.863
Age	0.825		
<65 vs >65 ans		0.70 (3.49-0.76)	0.276
Localisation de la tumeur	0.146		
Moyen vs Bas rectum		0.72 (0.26-1.97)	0.52
Haut vs Bas rectum		NA	NA
cTNM	0.346		
I vs III		1.74 (0.78-3.90)	0.179
II vs III		0.78 (0.09-6.39)	0.813
IS _B	0.576		
Int vs Low		0.60 (0.27-1.33)	0.208
High vs Low		0.12 (0.01-0.98)	0.047

Tableau 7. Modèle de Cox multivarié pour la TTR en fonction de l'IS_B combiné aux paramètres cliniques

Nous avons analysé la contribution relative de chaque paramètre clinique disponible au moment du diagnostic permettant de prédire la survie avant rechute : parmi tous les paramètres cliniques disponibles la variable la plus importante en termes de prédiction de la survie sans rechute était l'IS_B (contribution de 54%), devant le cTNM (contribution de 24%) (Figure 18).

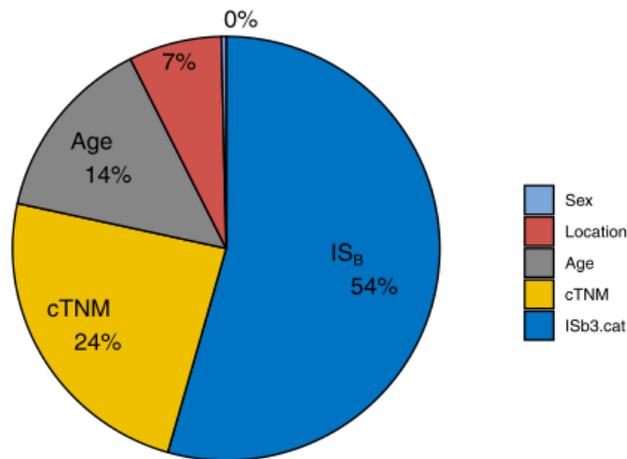


Figure 18. Contribution relative des différents paramètres cliniques et de l'IS_B sur la survie avant rechute

Ces résultats préliminaires confirment les observations faites sur la cohorte exploratrice de 73 patients.

3) Résultats de la cohorte du Danemark suivi par Watch and Wait après une intensification locale du traitement néoadjuvant

Plusieurs stratégies d'intensification du traitement néoadjuvant sont actuellement à l'essai. Nous avons pu avoir accès à 42 biopsies du centre de Velje (Danemark) qui pratique en complément du traitement néoadjuvant classique un boost par brachythérapie. Tous les patients étaient des patients bons répondeurs au traitement néoadjuvant (réponse évaluée par imagerie post-traitement) et ont tous été inclus dans un protocole de « Watch and Wait ».

De façon intéressante, la contribution de l'IS_B pour prédire la survie sans rechute n'était pas retrouvée dans cette petite cohorte (Figure 19).

Ces données pourraient suggérer que le mode de délivrance de la radiothérapie, dans une situation d'intensification locale très forte du rayonnement ionisant (boost par

brachythérapie) pourrait annuler l'action de la composante immunitaire du microenvironnement tumoral.

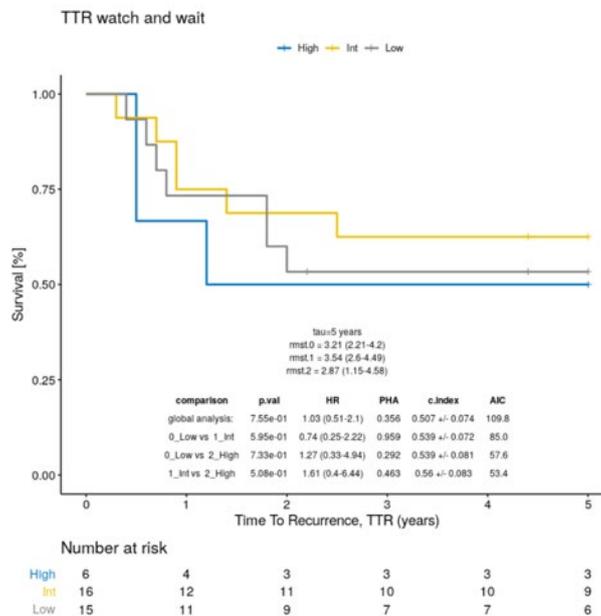


Figure 19. TTR en fonction de l'IS_B en trois catégories (High, en bleu, Intermediare en Jaune et Low en gris) chez les patients traités par nRCT et boost brachythérapie, bon répondeurs à la nRCT suivis par Watch and Wait. Cohorte Denmark

Nous allons pouvoir tester cette hypothèse dans les mois à venir. En effet, nous avons initié au cours de ma thèse une collaboration avec l'équipe du Pr Gérard (CHU Nice, Centre Antoine Lacassagne), qui est spécialisé dans la radiothérapie de contact. L'étude OPERA (NCT02505750) qu'il coordonne augmente la dose d'irradiation grâce à l'utilisation de la contact-thérapie (chez des patients cT2T3N0N1 (<5 cm)) ; dans cette étude l'excision locale ou une stratégie de surveillance (Watch and Wait), sont envisagées si une réponse complète est initialement observée. Après avoir obtenu les autorisations réglementaires, nous réalisons actuellement une étude ancillaire (ID-RCB 2014-A0 1851-46) cherchant à évaluer la valeur pronostique et prédictive de l'IS_B sur la réponse au traitement. 140 patients ont été inclus dans cette étude internationale (France et UK). Les données cliniques consolidées à 2 ans de suivi sont figées et disponibles. L'analyse des biopsies est en cours au sein de notre structure (40 cas reçus à ce jour).

Partie IV. Analyse du statut immunitaire ganglionnaire des patients atteints de cancer du rectum en fonction du degré de réponse au traitement néoadjuvant.

L'absence de chirurgie radicale dans les stratégies de W&W préserve les ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Ceci pourrait fournir un avantage immunitaire pour le patient, favorisant l'absence de récurrence locale de la maladie et sa dissémination.

L'objectif de cette étude est de rechercher des signes d'activation immunitaire dans les ganglions drainant les tumeurs du rectum ayant répondu au traitement adjuvant, potentiellement non présents chez les patients non-répondeurs, qui fourniraient un argument immunitaire fort, par-delà l'amélioration de la qualité de vie, en faveur d'une stratégie de préservation de l'organe et de ses ganglions drainants.

Ainsi, pourrait se dessiner un « repositionnement » du rôle du ganglion en Cancérologie, au-delà de son rôle attribué jusqu'alors comme site potentiel métastatique, permettant d'établir la stadification N de la classification TNM. Le ganglion, en tant qu'organe lymphoïde secondaire qui joue un rôle essentiel dans la mise en place d'une immunité adaptative au niveau du territoire de drainage serait ainsi pris en compte et sanctuarisé, car potentiellement siège de populations immunitaires mémoires et/ou de cellules présentatrice d'antigène résidentes, pertinentes dans le conflit hôte/tumeur.

Nous avons donc initié une étude exploratoire multiparamétrique du statut ganglionnaire de 19 patients traités par nRCT pour un cancer du rectum ; 10 étant répondeurs (R) et 9 étant non répondeurs (NR) au traitement.

L'étude de l'infiltrat immunitaire a été réalisée selon différentes techniques :

1/ Analyse histologique de l'architecture ganglionnaire

- Analyse optique sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)
- Analyse par Intelligence artificielle sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)

2/ Analyse des populations immunitaires infiltrant les régions ganglionnaires

- Analyses par immunohistochimie et quantification en pathologie digitale
- Analyses multiplex en immunofluorescence et quantification en pathologie digitale

3/ Analyse transcriptomique à large échelle, technologie NGS 3' (Lexogen)

4/ Analyses du répertoire lymphocytaire T, technologie séquençage de la région TCR β CDR3 (AmpliSeq for Illumina TCR beta-SR Panel)

Les techniques réalisées et les marqueurs analysés sont résumés dans le **Tableau 8**.

	Nombre de patients	Nombre de ganglions analysés (moyenne, min-max)	Techniques
Répondeurs	10	144	Lames HES
	9	88	IHC CD3/CD20; Ki67-Lyve1
	7	15	IF Panel 1 4plex, CD3, CD20, Ki67, Lyve-1
	6	15	IF Panel 2 4plex, CD20, CD27, CD38, Lyve-1
	en cours	en cours	IF Panel 3 7plex, CD3, CD8 TCF-1, CD103, CD69, CD45Ro,
	XX	les 3 plus gros ganglions	3'RNA Seq
	8	les 3 plus gros ganglions	Analyse de la clonalité T
Non Répondeurs	9	118	Lames HES
	8	73	IHC CD3/CD20; Ki67-Lyve1
	7	17	IF Panel 1 4plex, CD3, CD20, Ki67, Lyve-1
	7	13	IF Panel 2 4plex, CD20, CD27, CD38, Lyve-1
	en cours	en cours	IF Panel 3 7plex, CD3, CD8 TCF-1, CD103, CD69, CD45Ro,
	XX	les 3 plus gros ganglions	3'RNA Seq
	6	les 3 plus gros ganglions	Analyse de la clonalité T

Tableau 8. Tableau récapitulatif des analyses effectuées sur les ganglions en fonction du degré de réponse au traitement néoadjuvant chez des patients atteints de cancer du rectum

1) Analyses histologiques de l'architecture ganglionnaire

a) Analyse optique sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)

Dans un premier temps, les lames HES issues de la résection chirurgicale de la tumeur et des ganglions de drainage ont été désarchivées et numérisées. Les lames HES de l'ensemble des ganglions de chaque cas ont été relues selon différents critères morphologiques : taille, nombre de centres germinatifs, épaisseur du cortex, du paracortex, de la médullaire. Un score semi-quantitatif (de 1 à 3 en fonction de l'épaisseur relative de la région d'intérêt) a été attribué pour chaque ganglion analysé.

Les critères histologiques ganglionnaires ont été comparés entre les groupes de patients répondeurs vs non répondeurs à la nRCT. Au total, 209 ganglions ont été analysés.

Aucune différence significative portant sur le nombre de ganglions et la taille moyenne des ganglions n'a été observée entre les deux groupes (Figure 20). Le nombre de ganglions retrouvés sur la pièce opératoire et analysés chez les patients bons répondeurs à la nRCT était très hétérogène (de 1 à 32 ganglions). Cette variabilité pourrait être supérieure à celle observée pour les patients non-répondeurs.

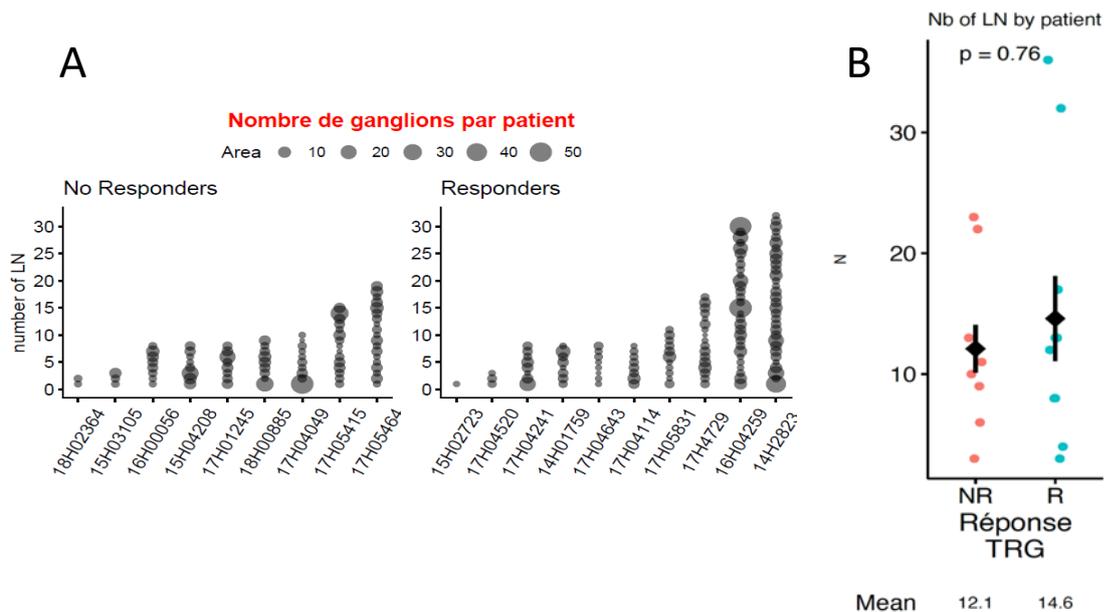


Figure 20. Nombre de ganglions par patient. **A.** Ensemble des ganglions des patients en fonction de la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant **B.** Moyenne du nombre de ganglions retrouvés par groupe de patient (P=0,76) NR non répondeur, R répondeur.

Il est à noter que, les patients bons répondeurs à la nRCT n'ont pas tous le même profil d'activation immunitaire post-nRCT au sein de la tumeur (Figure 3A, *Clinical Cancer Research*). Seuls 40 % présentaient de forts niveaux d'expression de gènes immunitaires, témoignant d'une intense activation immunitaire locale. La sélection des patients bons répondeurs pour lesquels nous étudions le statut ganglionnaire n'a pas été réalisée en fonction du statut immunitaire intra-tumoral mais uniquement sur le critère de réponse à la nRCT. Ce groupe de patients comprend donc probablement une hétérogénéité de qualité et d'intensité de réponse immunitaire locorégionale avec un possible retentissement ganglionnaire différent.

La quantification visuelle du nombre des follicules lymphoïdes secondaires (contenant un centre germinatif avec centre clair) a été effectuée pour tous les ganglions des 2 groupes de patients répondeurs et non répondeurs (n=209). Une tendance à l'augmentation du nombre de follicules secondaires était observée chez les patients répondeurs (moyenne de 5,3 vs 3,8 pour les R et NR respectivement, $P = 0,055$, **Figure 21 B et C**).

L'immunomarquage avec l'Ac CD20 des lymphocytes B permettait une quantification précise des follicules lymphoïdes primaires et secondaires. Cette quantification montrait également une différence significative en termes de nombre de follicules totaux ($P < 0,05$) (**Figure 21 D**). Ainsi les patients R présentaient une plus grande richesse en follicules lymphoïdes dans les ganglions, que les patients NR.

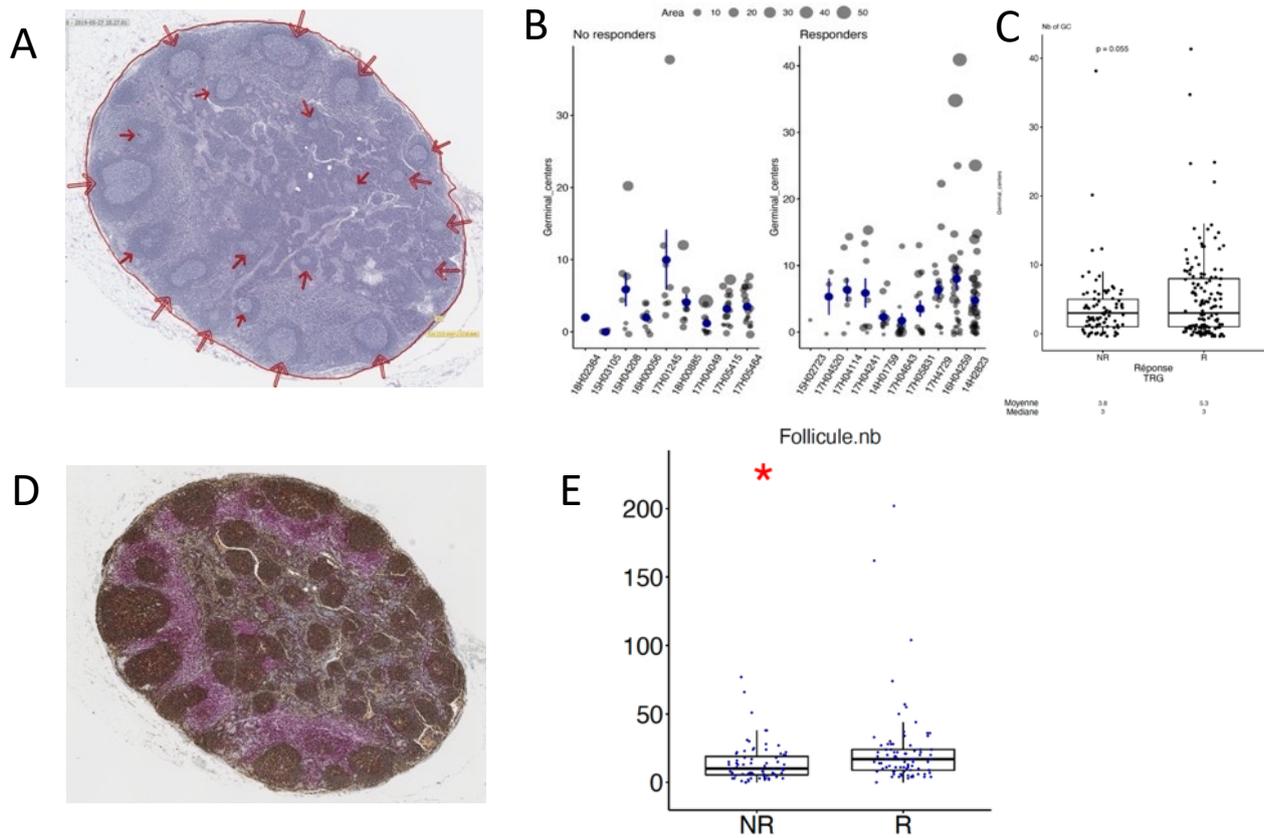


Figure 21. **A.** Image numérisée d'une lame HES de ganglion ayant permis la quantification des follicules secondaires avec centre germinatif **B.** Graphique représentant le nombre de centres germinatifs par patient (en abscisse) en fonction du degré de réponse à la nRCT **C.** Box-plot représentant le nombre total de follicules secondaires avec centre clair chez les patients répondeurs (R) et non répondeurs (NR) **D.** Image numérisée du même ganglion immunomarqué par le CD3 (rose) et CD20 (marron) **E.** Box-plot représentant le nombre total de follicules chez les patients répondeurs (R) et non répondeurs (NR)

La proportion relative de cortex, de paracortex et de médullaire de chaque ganglion a été évaluée optiquement et quantifié selon un score allant de 1 à 3 (**Figure 22** : 1= faible en rouge, 2= intermédiaire en vert, 3 = fort en bleu) a été attribué aux zones de cortex et de paracortex de chaque ganglion. Cette évaluation a été réalisée par 2 observateurs indépendants et les discordances ont fait l'objet d'une relecture pour définir un score consensus.

Les patients répondeurs présentaient une proportion de cortex plus importante dans les ganglions (couleur bleu, likelihood ratio test $P = 0,0145$) i.e. donc un cortex probablement plus épais et une moindre proportion de paracortex ($P = 0,026$), que les patients non répondeurs (**Figure 22**).

A noter, que les patients répondeurs à la nRCT présentaient également une capsule plus épaisse par rapport aux patients non répondeurs (likelihood ratio test $P = 0.027$). L'épaississement de la capsule correspondant à une réaction fibreuse suggérant un processus de remaniement « inflammatoire » au sein des ganglions des patients répondeurs à la nRCT (Figure 23).

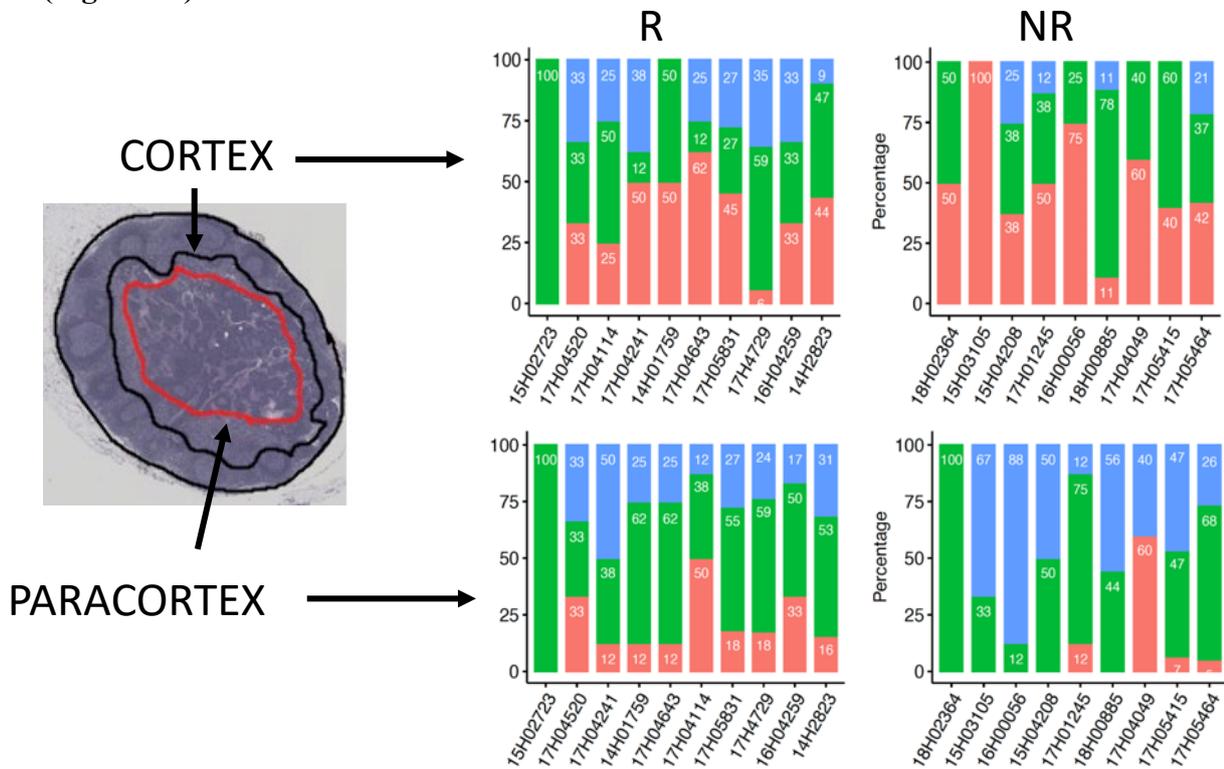


Figure 22 : Distribution des tailles du cortex (haut) et du paracortex (bas). En abscisse sont représentés les patients classés en R et NR, chaque barre correspond à la proportion de chaque catégories de taille de cortex ou de paracortex , Rouge = faible épaisseur , vert = épaisseur intermédiaire ou bleu = forte épaisseur. NR non répondeurs, R répondeurs

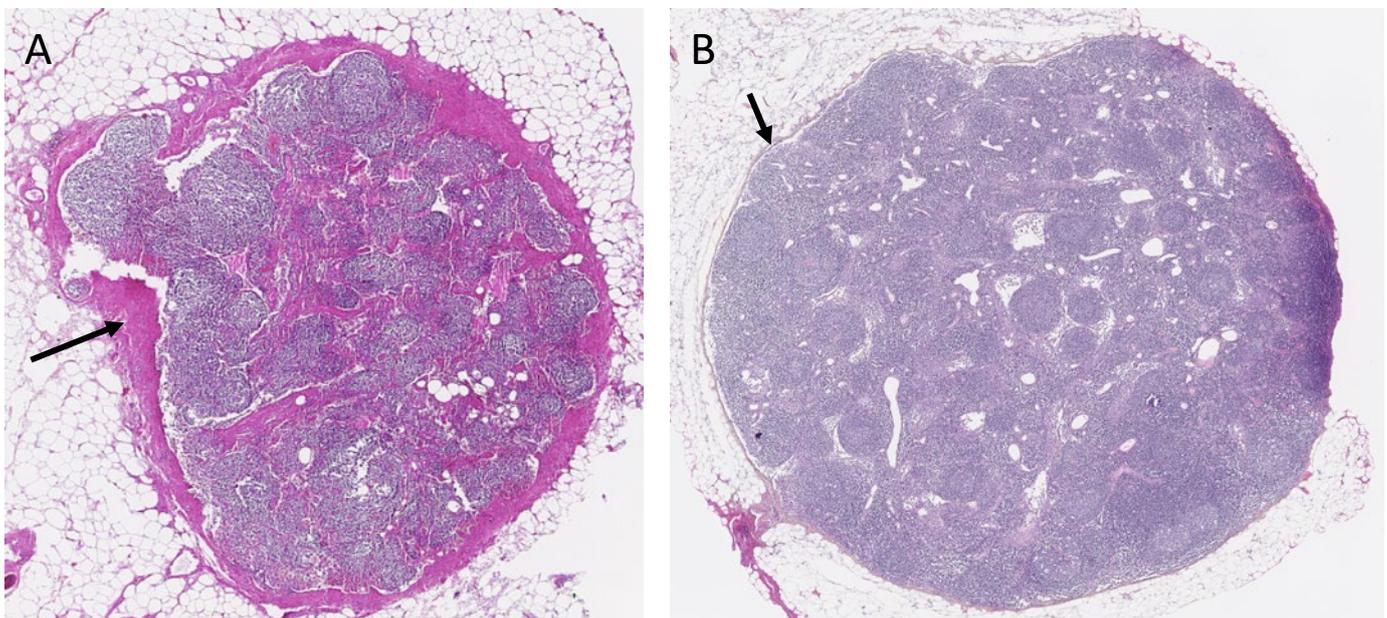


Figure 23 : A. Exemple de capsule épaisse (flèche) chez un patient répondeur à la nRCT B. Exemple de capsule fine (flèche) chez un patient non répondeur) à la nRCT

b) Analyse par Intelligence artificielle sur lames HES (cortex, follicules lymphoïdes primaires, secondaires, paracortex, médullaire)

Les pièces opératoires présentent de nombreux ganglions de drainage. Les caractéristiques histologiques de ces ganglions sont variables, pour un même patient. Ainsi, l'analyse doit être menée sur l'ensemble de ceux-ci, d'autant plus qu'il n'existe pas de ganglion sentinelle individualisable, comme premier relai lymphatique de la tumeur. Cette analyse est donc longue et justifie le fait d'explorer les capacités de l'Intelligence Artificielle (IA) à reconnaître ces structures et automatiser l'analyse.

Nous avons à ces fins entamé une collaboration avec la société Keeneye, plateforme d'IA spécialisée dans l'analyse des numérisations de coupes histologiques. L'objectif était d'établir dans un premier temps un algorithme d'IA capable de reconnaître de manière automatisée les différentes structures ganglionnaires à partir de la lame HES : capsule, centres germinatifs, zone médullaire, cortex et paracortex.

L'objectif secondaire était de trouver des « patterns » histologiques intra-ganglionnaires pouvant être associées à une bonne réponse au traitement néoadjuvant (analyse non supervisée).

Un algorithme capable de reconnaître les ganglions sur une lame HES, la capsule, les centres germinatifs, les sinus lymphatiques, a été établi et validé (**Figure 24**). L'apprentissage a été réalisé sur une série de 30 ganglions. Puis une validation a été réalisée sur l'ensemble des ganglions de la cohorte (n=209).

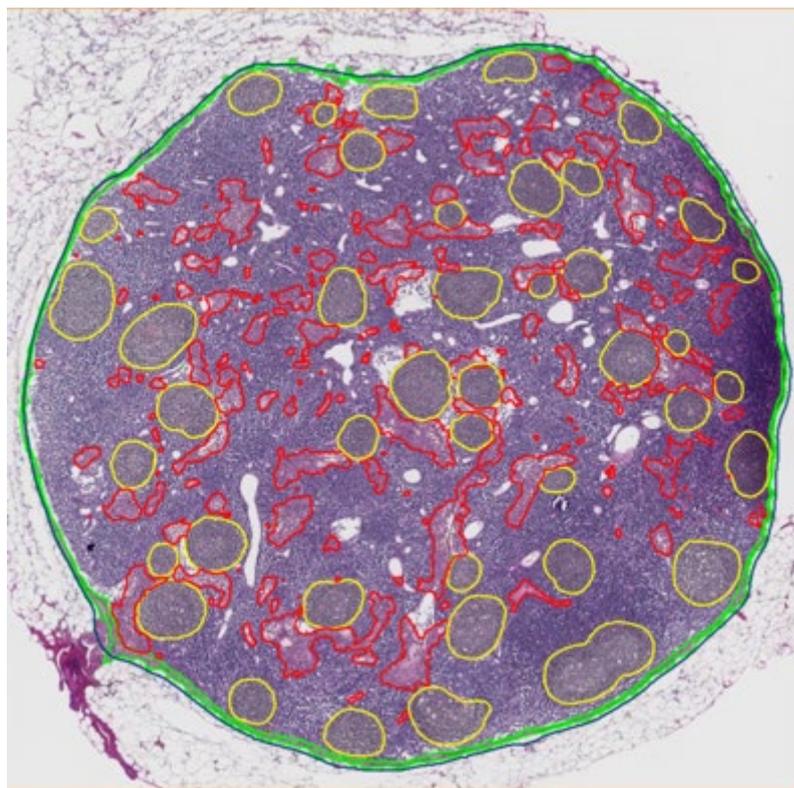


Figure 24. Exemple de reconnaissance par IA des différentes zones du ganglion : en vert la capsule, en rouge les vaisseaux lymphatiques (médullaire principalement) et en jaunes les centres germinatifs.

Méthodologie

Les images issues des lames HES ont été fractionnées suivant une segmentation sémantique (**Figure 25**) permettant d'assigner une « classe » à chaque pixel de l'image. Une carte de segmentation est ensuite générée pour chaque image analysée. Cette cartographie permet d'identifier les différentes composantes d'intérêt de l'image et permet de séparer le tissu du fond de la lame, et de repérer des zones d'intérêt morphologique à l'intérieur du tissu (ici les ganglions).

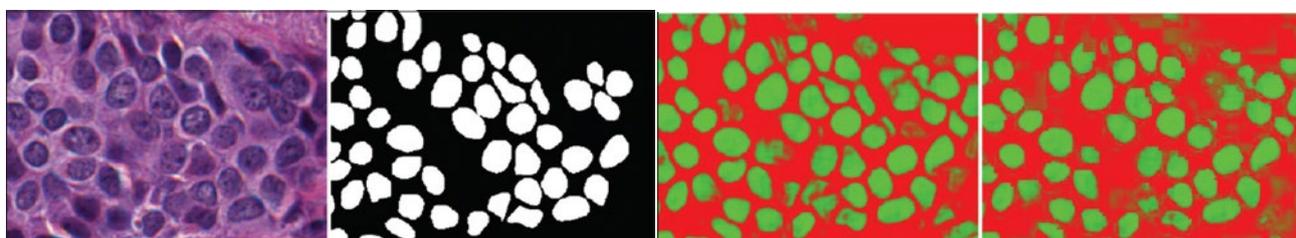


Figure 25. Exemple de segmentation sémantique

De nombreuses méthodes de traitement d'image sont utilisées pour segmenter des lames histologiques. Les dernières avancées utilisent des réseaux convolutionnels d'apprentissage

profond (CNN) basé sur un jeu d'entraînement (images annotées) permettant d'établir un premier algorithme et un jeu de validation. Les données de validation permettent de monitorer les performances du modèle pendant l'entraînement et d'arrêter ce dernier une fois que le modèle converge vers une erreur globale la plus faible possible. Lors de cette évaluation, différentes métriques de segmentation telles que le Dice Score et l'IoU sont données en comparant les cartes de segmentation prédites et celles préalablement annotées (**Figure 26**).

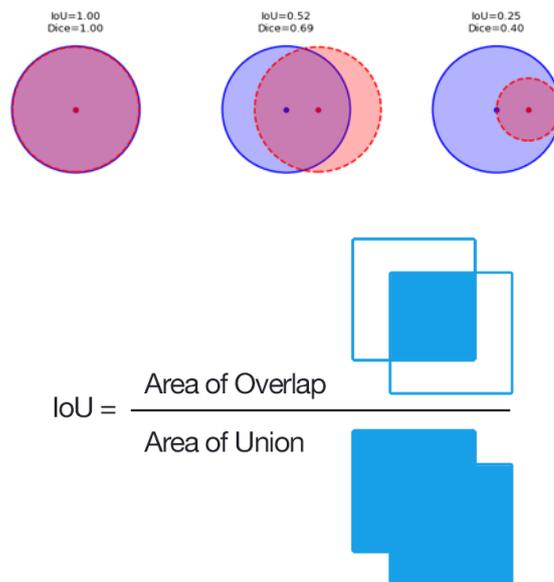


Figure 26. Explications des métriques de segmentation Dice et IoU

Pour l'analyse des ganglions le niveau de magnification utilisé était de 7x. Nous avons 3 classes à segmenter : Cortex (défini comme l'ensemble des follicules), Médullaire, Capsule, ainsi que le « fond » ou background de la lame.

L'entraînement a été effectué sur GPU v100 avec 100 tours de dataset (epoch). Le nombre total d'itération était défini comme tel : nombre de tuiles * 100.

Deux trainings ont été nécessaires afin d'obtenir une segmentation correcte des 3 régions :

Premier training

Nombre de lames analysées : 9

Nombre de tuiles analysées : 373 (entraînement : 260, validation : 30, évaluation : 83)

Taille des tuiles analysées : 1024x1024 pixels

Deuxième training

Nombre de lames analysées : 29

Nombre de tuiles analysées : 673 (entraînement : 474, validation : 64, évaluation : 135)

Les performances de l’algorithme final sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 9**), montrant une performance acceptable de l’algorithme final (IoU > 0,5).

Tableau 9 : Résultats des différentes métriques de segmentation de l’algorithme de segmentation permettant de définir les zones de capsule, cortex (follicules) et médullaire

Quantitative evaluation results

	Iou	Dice	Recall	Precision	Accuracy
Capsule	0.524	0.688	0.692	0.684	0.991
Cortex	0.571	0.727	0.772	0.687	0.888
Médullaire	0.493	0.66	0.552	0.822	0.944
Mean	0.529	0.692	0.672	0.731	0.941
Global	0.55	0.707	0.703	0.717	0.825

Des analyses complémentaires sur les ganglions de la cohorte sont en cours avec la société Keeneye afin de tenter de définir un pattern prédictif de la bonne réponse au traitement néoadjuvant à partir de l’analyse des lames HES de ganglions. Une analyse non supervisée des images HES ganglionnaire sera également réalisée afin d’identifier des structures histologiques associées à la réponse au traitement.

2) Analyses en immunohistochimie chromogénique

Afin d’étudier plus précisément les populations lymphocytaires et les différences potentielles entre les populations lymphocytaires infiltrant les ganglions des sujets répondeurs et non répondeurs, nous avons effectué différents marquages immunohistochimiques chromogéniques et en immunofluorescence.

Des doubles marquages CD3 (Clone 2GV6 ; 0,4 µg/mL, Roche Ventana) /CD20 (Clone L-26 ; Roche Ventana) puis Ki67, marqueur de prolifération cellulaire, exprimé pendant la division cellulaire (Clone MIB-1, Roche Ventana) /Lyve-1, marquant les vaisseaux lymphatiques (Clone EPR 21857 ; Abcam) ont été effectués sur 2 coupes consécutives des ganglions de chaque patient.

Les lames ont été immunomarquées sur la plateforme d'Immunomonitoring de l'HEGP sur l'automate Benchmark XT selon les protocoles résumés dans le tableau- ci-dessous (**Tableau 10**).

	Clone	Démasquage	Incubation	Révélation	Coloration
CD3	2GV6, Roche Ventana	CC1, pH8,4; 60min	8 min, 37°C	Ultraview DAB	Hematoxiline II 4min Bluing reagent 4 min
CD20	L-26, Roche Ventana	CC1, pH8,4; 60min	4 min, 37°C	UltraRed	Hematoxiline II 4min Bluing reagent 4 min
Ki67	Mib-1, Roche Ventana	CC1, pH8,4; 60min	16 min, 37°C	Ultraview DAB	Hematoxiline II 4min Bluing reagent 4 min
Lyve-1	EPR 21857 Abcam	CC1, pH8,4; 60min	32 min, 37°C	UltraRed	Hematoxiline II 4min Bluing reagent 4 min

Tableau 10. Protocoles d'immunomarquage sur automate Benchmark XT (Roche)

Les lames ont ensuite été scannées sur le scanner Nanozoomer HT. Les analyses ont été effectuées avec l'aide du logiciel d'analyse d'images Halo®, Indica Lab (**Figures 27 et 28**).

Les densités en cellules CD3+, CD20+ dans la totalité de la surface des ganglions ont été évaluées chez les patients répondeurs et non répondeurs à la nRCT (**Figures 27**). **Aucune différence en termes de densité totale ganglionnaire, en cellules CD3+ et CD20+ n'a été mise en évidence entre les 2 groupes de patients (Figure 29).**

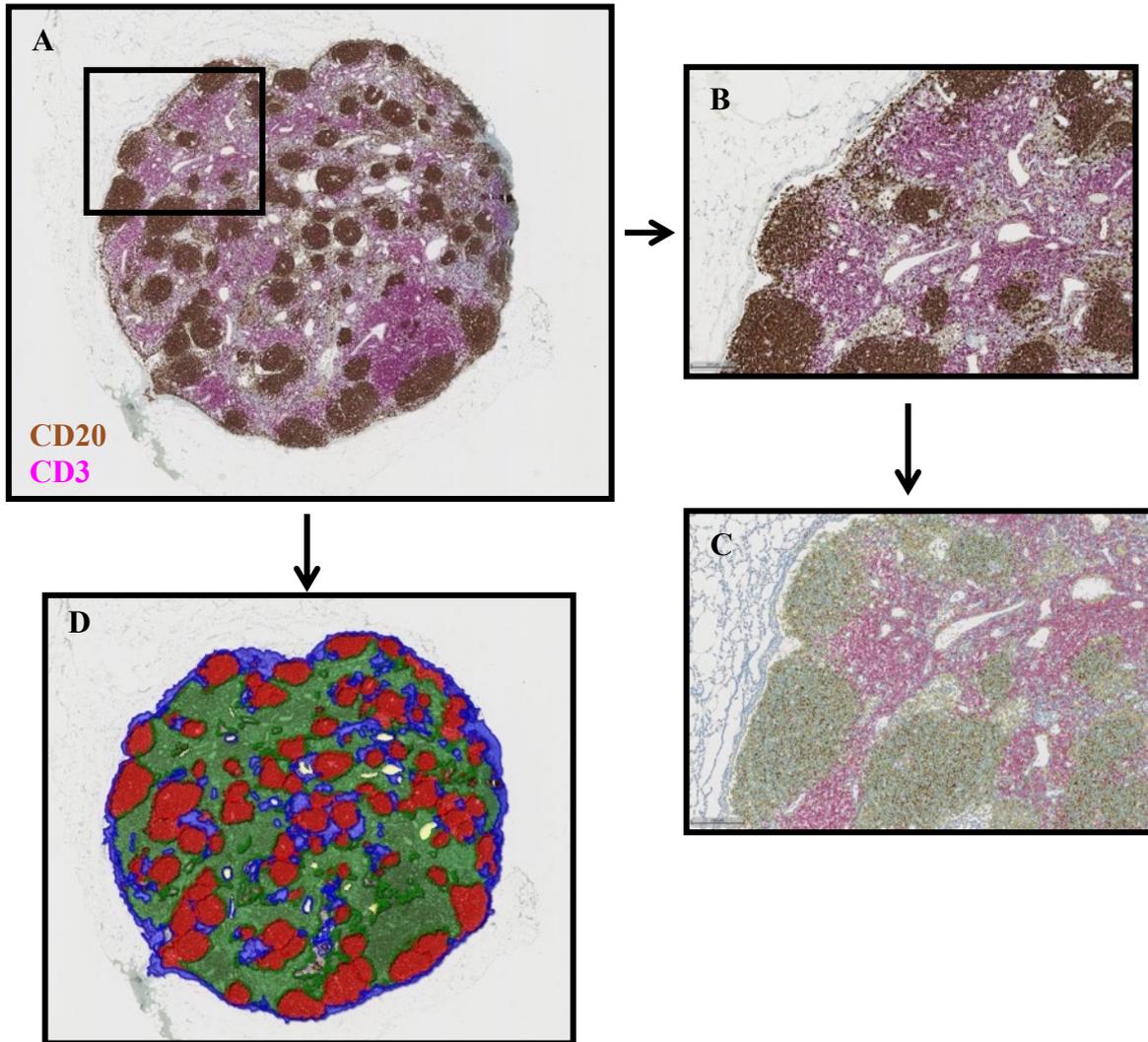


Figure 27. Double marquage CD3/CD20 et analyses Halo. **A.** Exemple de double marquage CD3 (rose) /CD20(marron), **B.** Focus sur une zone d'intérêt **C.** Reconnaissance des cellules immunomarquées par le logiciel d'analyse d'image Halo permettant une quantification des cellules **D.** Module « classifier » de Halo permettant la reconnaissance des différentes régions du ganglion, en rouge les centres germinatifs zone CD20+, en vert la zone de paracortex avec une majorité de cellules CD3+, la zone bleue correspondant au tissu non immunomarké

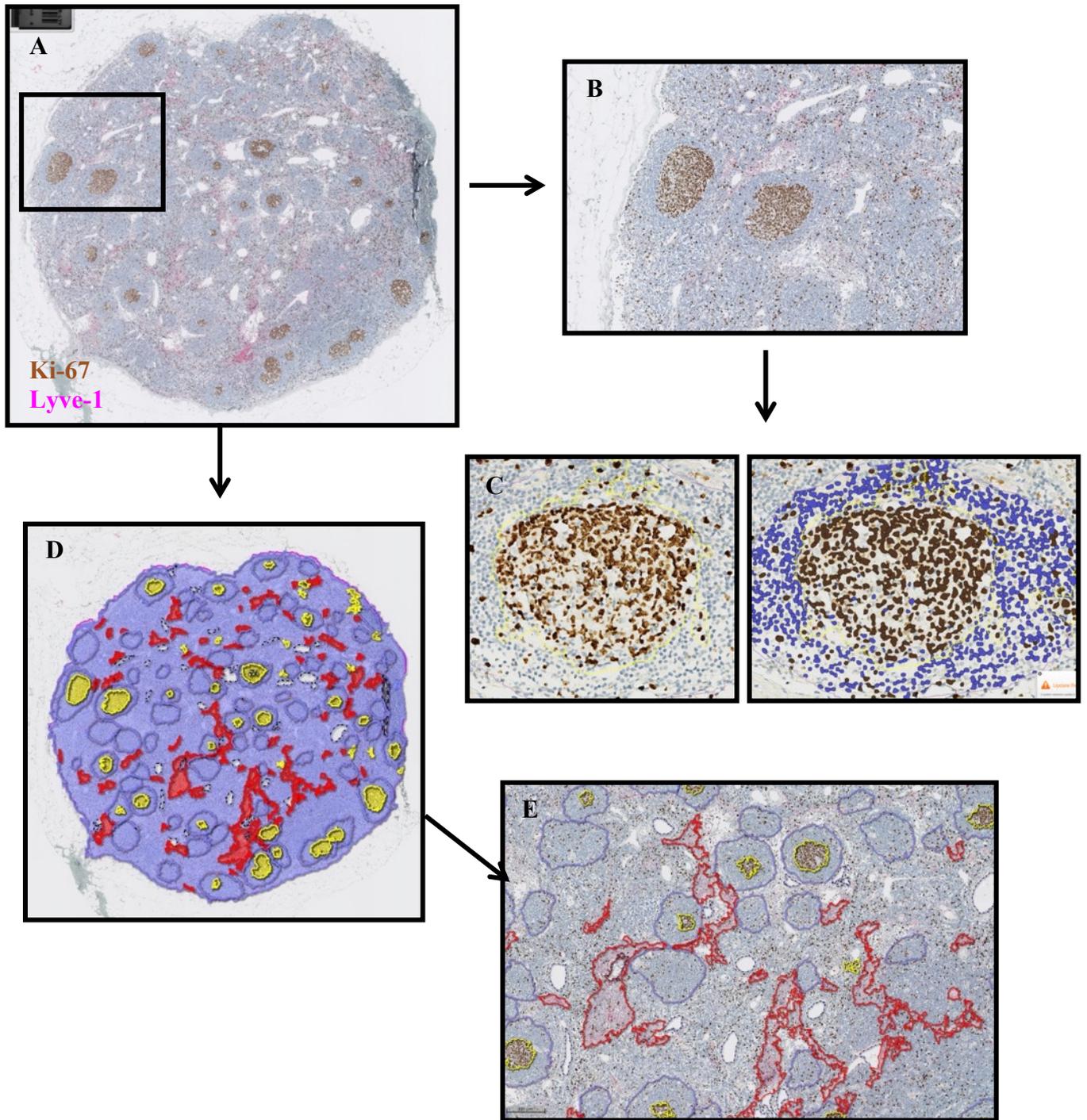


Figure 28. Marquage Ki-67 et Lyve-1, analyses Halo. **A.** Exemple de double marquage Ki-67 (marron) Lyve-1 (rose). **B.** Focus sur une zone d'intérêt **C.** Reconnaissance des cellules immunomarquées par le logiciel d'analyse d'image Halo permettant une quantification des cellules **D.** Module « classifier » de Halo permettant la reconnaissance des différentes régions du ganglion, en rouge les zones marquées par le Lyve-1, correspondant aux sinus lymphatiques, les zones jaunes correspondent à des zones denses en Ki-67. **E.** Détail de reconnaissance des zones marquées par le Lyve-1 (rouge) et zone avec centre germinatif (Ki-67)

Totalité du ganglion

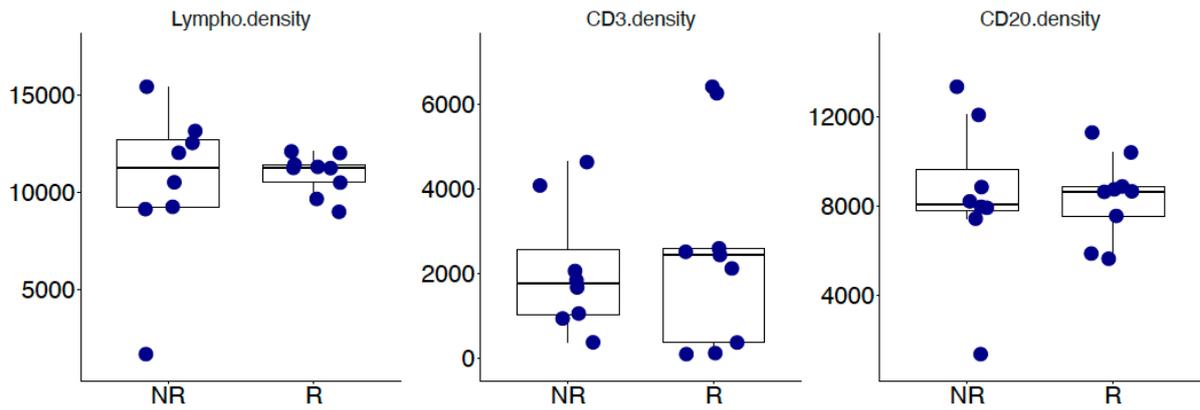


Figure 29. Box plot illustrant la moyenne des densités en lymphocytes, en cellules CD3+ et CD20+ par patient, calculée sur l'ensemble des ganglions en fonction du statut de réponse à la nRCT. Un point correspond à la moyenne des densités calculée sur l'ensemble des ganglions.

A l'inverse, l'analyse des cellules immunitaire en prolifération (Ki67+) montrait une augmentation significative des cellules Ki67+ chez les patients bons répondeurs à la nRCT dans l'ensemble du ganglion ($P < 0,001$), dans la médullaire ($P < 0,0001$) et au sein des follicules ($P < 0,0001$) (Figure 30).

Densité en Ki67+

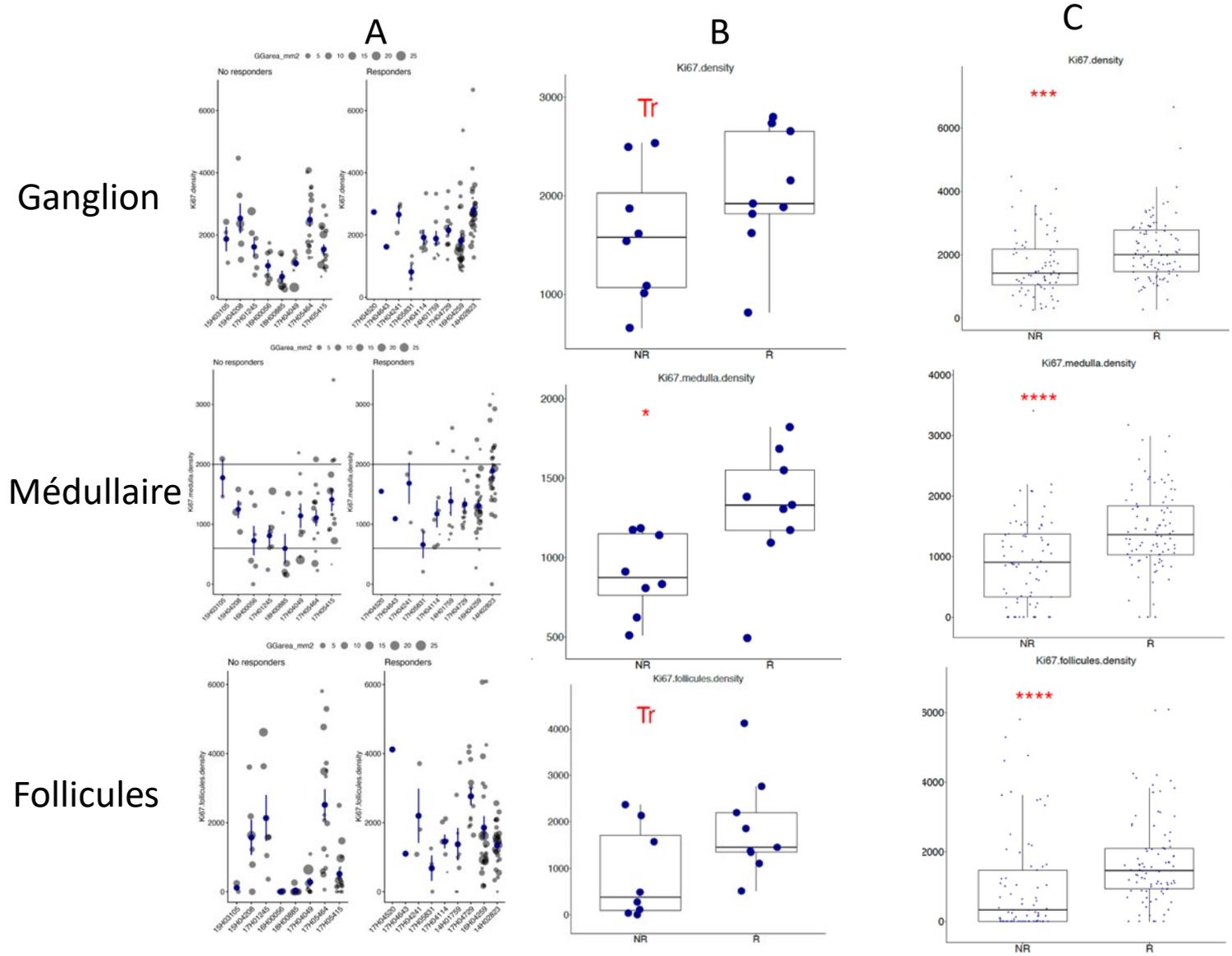


Figure 30. Densité en Ki67 dans les ganglions, dans la zone médullaire et au sein des follicules. **Panel A.** Box plot illustrant les densités en cellules Ki67+ dans l'ensemble des ganglions analysés, les patients sont en abscisse. **Panel B.** Blox plot illustrant les moyennes des densités en cellules Ki67+ pour chaque patient. **Panel C.** Box plot illustrant l'ensemble des densités en cellules Ki67 par ganglions analysés. Tr 0,05 < P < 0,15, * P < 0,05, *** P < 0,001 ; **** P < 0,0001

3) Immunofluorescence

J'ai mis au point 3 panels d'Immunofluorescence (IF) par la technologie OPAL (Akoya Bioscience) que j'ai appliqué aux ganglions afin d'explorer plus finement les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations immunitaires et chercher des différences entre les groupes R et NR.

Panel 1 : CD3, CD20, Ki67, Lyve-1 permettant de déterminer le niveau de prolifération des cellules CD3+ (majorité de lymphocytes T) et CD20+ (majoritairement les lymphocytes B)

Panel 2 : CD20, CD27, CD38, Lyve-1, pour l'étude des sous populations lymphocytaires B

Panel 3 : CD3, CD8, CD103, CD69, TCF-1, CD45RO, pour l'étude des populations T

L'Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle (IHCm) permet de détecter sur **une même coupe de tissu plusieurs cibles d'intérêt** par fixation séquentielle de fluorophores (OPALs). Ces trois panels d'IF ont été mis au point au Centre de Recherche des Cordeliers sur l'automate Leica BOND RX en utilisant les kits de détection OPAL (Multiplex IHC Detection Kits, Opal Polaris 7-Color Automated IHC Detection Kit, Akoya Bioscience). Les OPALs sont des chromogènes organiques beaucoup plus stables et brillants (10 à 100X d'augmentation du ratio Signal/bruit) que les fluorochromes classiques. Ils utilisent l'amplification de signal par le système tyramide. Une fois le couple TSA-Dye activé par la HRP (conjuguée à l'anticorps secondaire), les Opals se déposent au niveau de l'antigène et se conjuguent de manière irréversible à tout groupement Tyrosyle libre. Seul le complexe Anticorps primaire -Anticorps secondaire est dissocié par la chaleur (Heat stripping step), afin de permettre d'ajouter un deuxième anticorps primaire dirigé contre le deuxième antigène et révélé avec un autre OPAL. Le marquage se fait donc en plusieurs cycles successifs.

L'ensemble des lames marquées a ensuite été scanné sur le Vectra® Polaris dans le service d'Anatomopathologie de l'HEGP, puis les images analysées par le logiciel Halo AI (**Figure 31**).

Compte tenu du coût et du temps nécessaire à l'analyse en IF seuls les 3 plus gros ganglions ont été analysés. Cette décision a été prise après vérification que les résultats observés en termes de densité des sous populations étudiées (cellules CD3+, CD20+ et Ki67+) en IHC sur l'ensemble des ganglions étaient identiques à ceux obtenus quand les 3 plus gros ganglions étaient seulement analysés.



Figure 31. Séquence d'analyse : marquage en IF multiplex, numérisation des lames sur le scanner Vectra Polaris puis analyses des images obtenues par le logiciel d'analyse d'image Halo AI.

a) Panel 1: CD3/CD20/Ki67/Lyve-1

Ce premier panel nous a permis d'analyser les différences en termes de prolifération des lymphocytes T et B, entre les patients R et NR à la nRCT.

Nous avons ainsi observé ; sur l'analyse des 3 plus gros ganglions de chaque patient, que la différence de prolifération (Ki 67+) cellulaire observée en IHC enzymatique entre les patients R et NR était majoritairement portée par les lymphocytes B CD20+ et non par les lymphocytes T CD3+ (**Figure 32**). Une différence significative était observée en terme de densité immunitaire CD20+Ki67+ entre les R et les NR ($P < 0,001$) sur la totalité du ganglion ainsi que dans les régions médullaire et extra-médullaire ($P < 0,05$ et $P < 0,01$ respectivement).

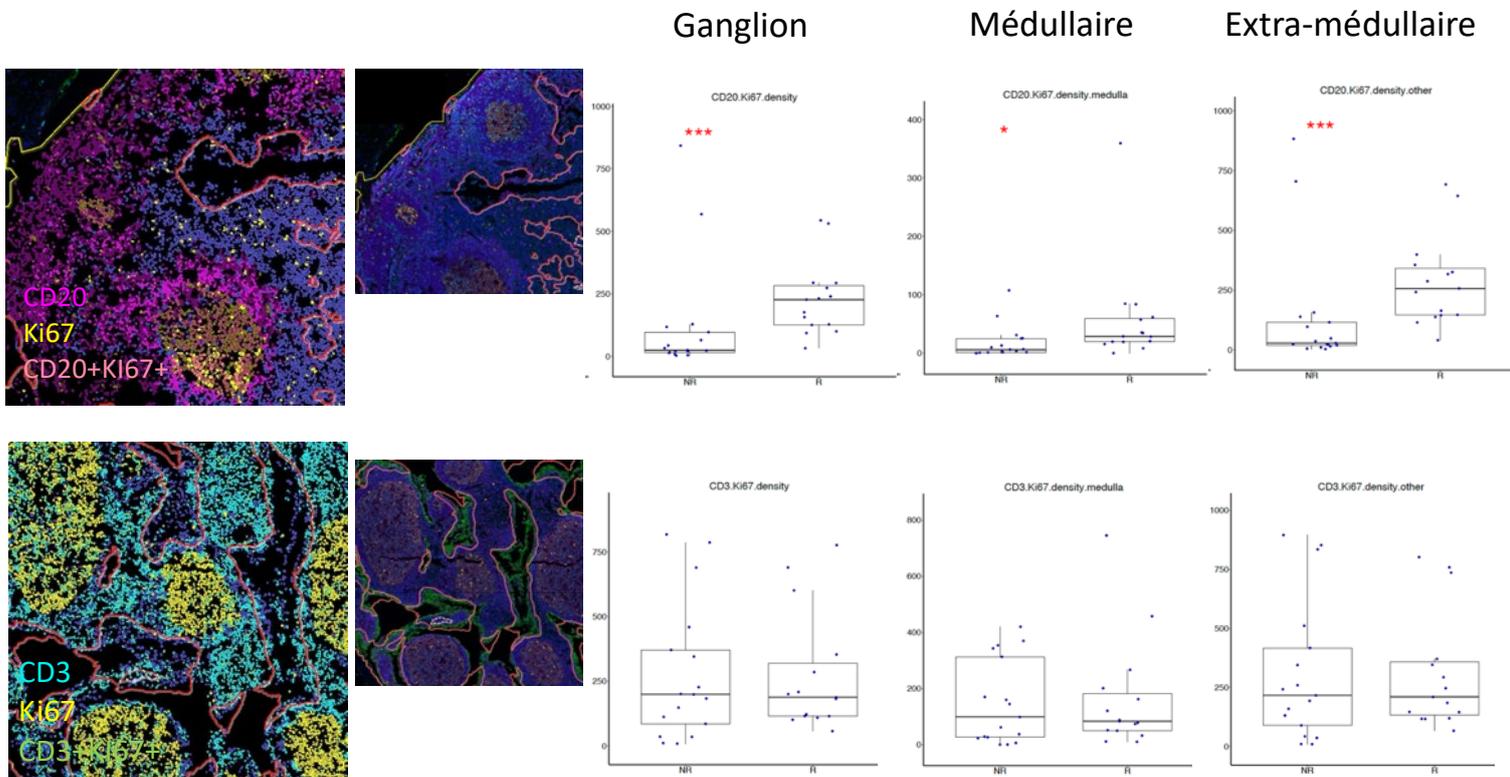


Figure 32. Box plot montrant les différences en termes de densités en cellules CD3+Ki67+ et CD20+Ki67+ dans l'ensemble des ganglions, au niveau de la zone médullaire ou de la zone extra-médullaire. Un point représente un ganglion analysé. * P < 0,05, *** P < 0,001

b) Panel 2: CD20/CD27/CD38/Lyve-1

Ce panel permettait une analyse des sous-populations lymphocytaires B : en définissant les lymphocytes B naïfs comme CD20+CD27-CD38- ; lymphocytes B transitionnels comme CD20+CD27-CD38+, les plasmablastes CD20-CD27+CD38+ et les lymphocytes B mémoires CD20+CD27+CD38-.

Les différentes sous populations identifiées ont été quantifiées à l'aide du logiciel d'analyse d'image Halo AI (**Figure 33**).

Les ganglions des patients R semblaient être moins infiltrés dans l'ensemble du ganglion en cellules B naïves (CD20+CD27-CD38-) (P en tendance $0,05 < P < 0,15$) en comparaison aux patients NR (**Figure 34**).

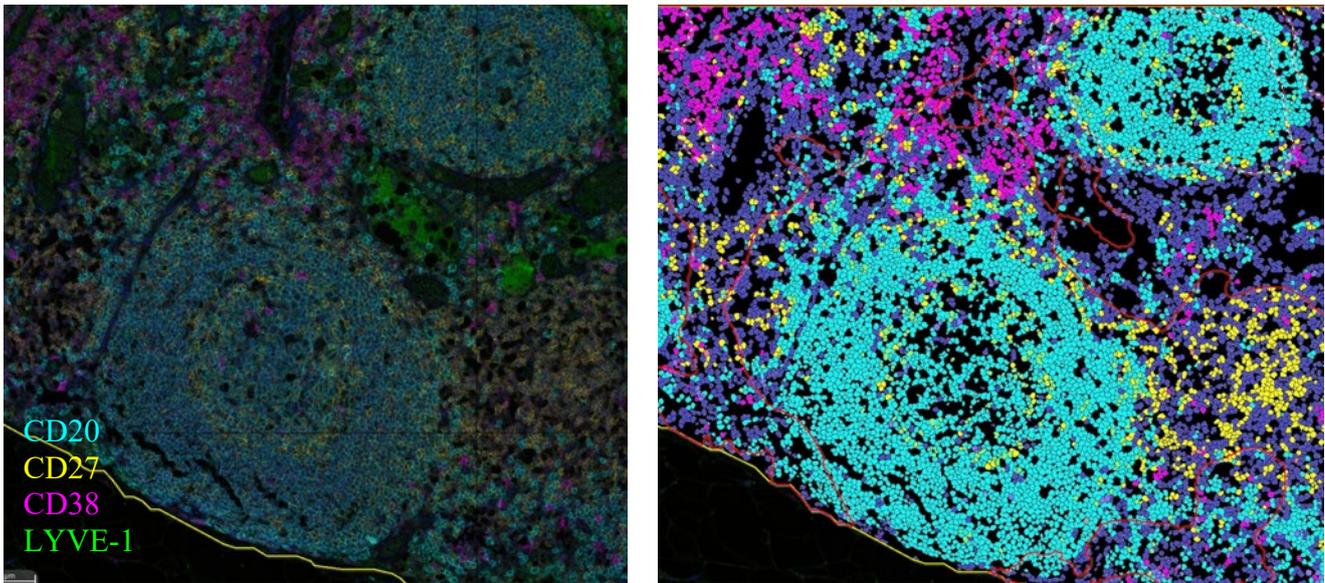


Figure 33. Panel 2 en immunofluorescence permettant l'analyse des sous populations B, reconnaissances des cellules immunomarquées par le logiciel Halo (mettre image plus zoomée)

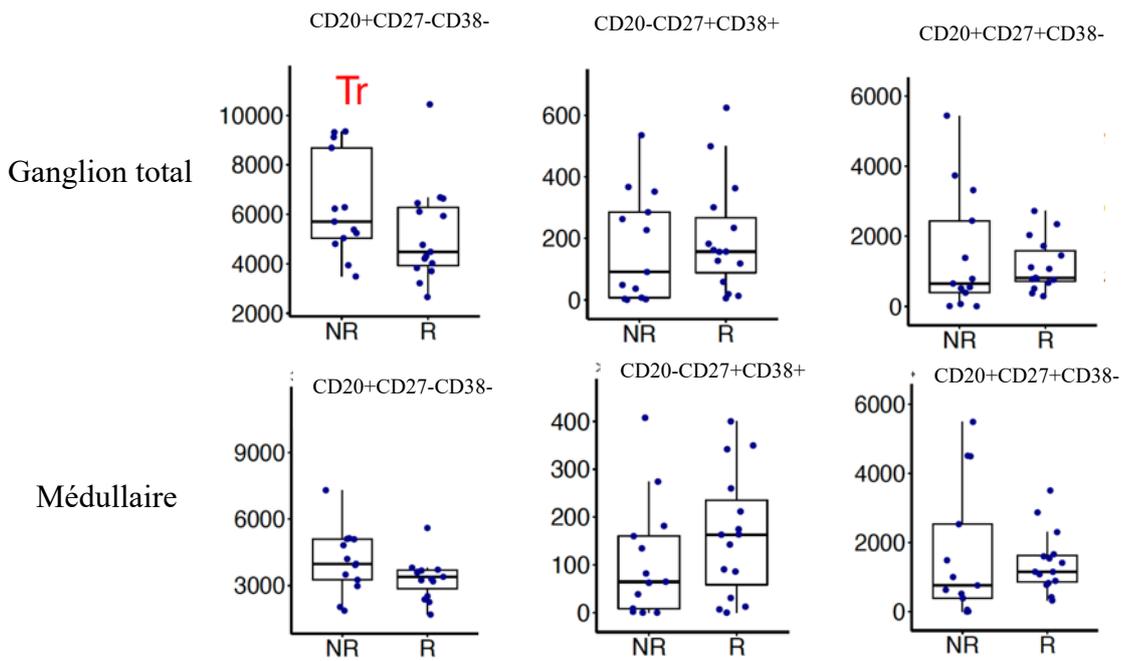


Figure 34. Box plot représentant les densités en cellules B naïves (CD20+CD27-CD38-), plasmablastes (CD20-CD27+CD38+) et en cellules B mémoires (CD20+CD27+CD38-) dans la totalité du ganglion et dans la médullaire, R répondeurs, NR non répondeur TR $0,05 < P < 0,15$

4) Analyses transcriptomiques par la technique 3'RNAseq (Lexogen)

Une analyse transcriptomique à large échelle par la technologie QuantSeq 3'mRNA a été initiée pour comparer les profils d'expression géniques des ganglions des patients R et NR.

Le séquençage « 3'RNAseq » offre une alternative à l'analyse des transcrits « entiers » (« whole transcript analysis »). Depuis la première application des analyses du transcriptome par RNA-Seq, de nombreuses méthodes de préparation de bibliothèques et de plateformes de séquençage ont été développées. Dans la méthode « classique » de transcription, les ARNm extraits sont coupés de manière aléatoire en fragments qui sont ensuite transcrits en cDNA. Bien que le RNA-Seq soit généralement considéré comme non biaisé, la fragmentation et la construction des bibliothèques peuvent introduire des biais. En effet, ce sont les fragments de cADN qui sont séquencés, ainsi le nombre de lectures est proportionnel au nombre de fragments de cDNA et non au nombre de transcrits. Les transcrits les plus longs étant en général coupés en plus de fragments, plus de lectures leur seront attribués. Par conséquent, lors d'une analyse d'expression de gènes, les gènes différentiellement exprimés sont plus susceptibles d'être enrichis en longs transcrits.

Récemment, de nouvelles méthodes de séquençage de type 3'RNASeq (TaqSeq ou QuantSeq) ont été développées afin de minimiser ce biais potentiel. Les ARNm ne sont plus fragmentés avant la transcription inverse et les cDNA séquencés sont les résultats d'une transcription inverse de l'extrémité 3' de l'ARNm. Le nombre de fragments (lectures, reads) générés reflète directement le nombre de transcrits d'un certain gène. La longueur du gène n'influence pas le niveau de quantification.

Dans le cas d'extraction d'ARNs à partir de bloc FFPE, les ARNs extraits ont un profil très dégradé. La technologie QuantSeq 3'mRNA en ne retrotranscrivant que la partie 3' de l'ARNm permet alors une analyse plus reproductible. Les séquençages des ARN extraits de ganglions réalisés par QuantSeq 3'mRNA ont été effectués sur la plateforme iGenSeq, de l'Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM) à la Pitié Salpêtrière.

L'ARN des 3 ganglions les plus gros de chaque patient a été extrait à partir d'une coupe de 20 µm à l'aide du kit d'extraction AllPrep FFPE DNA/RNA kit (Qiagen), permettant l'extraction simultanée de l'ARN et de l'ADN à partir de tissus FFPE.

Au total l'ARN de 16 patients a été extrait.

Compte tenu de la différence en termes de prolifération Ki67 retrouvée entre les patients répondeurs et non répondeurs à la nRCT, nous avons également constitué trois groupes de patients en fonction du statut de réponse à la nRCT et de la densité du Ki67 au sein des ganglions : RKi67+ (patients répondeurs avec forte densité en Ki67), RKi67- (patients répondeurs avec faible densité en Ki67), NRKi67+ (patients non répondeurs avec forte densité en Ki67). Ainsi, pour chaque groupe l'ARN extrait d'un pool de ganglions sélectionnés en fonction de la densité en Ki67 et de la qualité de la réponse a été séquencé afin d'étudier les différences d'expression de gènes.

a) Traitement bio-informatique et contrôle qualité

Les analyses des séquençages ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr Laurent-Puig (INSERM, UMRS-1138). Les tables de comptages ont été générées par le Pr de Reyniès et le Dr Sroussi après un alignement des séquences par logiciel STAR. Les tables ont par la suite été traitées à l'aide du logiciel R 4.1.0, le paquet R « EdgeR » version 3.34.0.(Robinson et al., 2010) et le paquet R « EnsDb.Hsapiens.v86 » regroupant la base données Ensembl, un système bio-informatique d'annotation automatique de génomes.

Plusieurs étapes de traitement bio-informatique des données sont nécessaires afin de les exploiter. En raison de la variabilité du nombre de fragments séquencés entre les patients, une normalisation des données est indispensable pour éliminer les biais techniques dans les données séquencées, telles que la profondeur du séquençage, et rendre les expressions des gènes directement comparables entre les échantillons. Pour l'analyse d'expression différentielle des gènes, la normalisation est effectuée en utilisant la méthode TMM (Trimmed Mean of M-values) de la fonction *calcNormFactors* du paquet edgeR. La normalisation TMM est adaptée à l'analyse différentielle de gènes par le paquet edgeR. Pour les autres analyses, une normalisation dite CPM (Counts Per Million) a été préférée. Elle correspond aux sommes du nombre total de transcrits séquencés et s'alignant sur le génome mis à l'échelle de l'ensemble du comptage des séquences, le tout divisé par 1 million.

Afin d'éliminer les séquences non informatives, plusieurs étapes de filtration sont nécessaires :

- Filtre par correspondance avec la base de données d'annotation des génomes Ensembl permettant de filtrer des séquences non codantes.
- Filtre des séquences qui ne sont pas de vrais gènes (pseudogènes...)
- Filtre des gènes peu ou pas exprimés par la fonction *FilterByExpr* du paquet R EdgeR.
- Filtre des gènes dupliqués en ne gardant que la séquence la plus exprimée.

Afin de contrôler la qualité des séquences, pour chaque échantillon le nombre total de fragments séquencés s'alignant sur la base de données de référence (Mapped Reads) a été comptabilisé (**Figure 35**). Cette somme, variant de 2.10^6 à 6.10^6 transcripts, n'a pas mis en évidence de défaut de qualité.

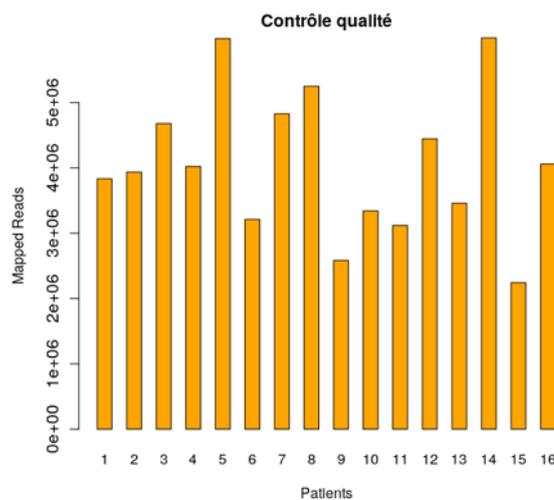


Figure 35. Barplot de la somme des reads s'alignant sur le génome de référence, pour les ganglions de chaque patient.

b) Comparaison des patients répondeurs ou non répondeurs à la nRT

Les profils transcriptomiques ont été comparés par la méthode du positionnement multidimensionnel (MDS ou PCoA). Le MDS est une technique de réduction de dimensions permettant d'analyser et de visualiser les transcriptomes de plusieurs échantillons en fonction de deux axes. Ce graphique est obtenu par la fonction *plotMDS* du paquet R *Limma*, qui calcule les distances entre deux échantillons à partir du ratio du niveau d'expression des

transcrits exprimés en logarithme 2 des CPM. Les 300 transcrits présentant les plus larges variations biologiques entre deux échantillons ont été inclus dans cette analyse.

Cette analyse n'a pas permis de différencier les 2 groupes de patients en fonction de la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant (**Figure 36**).

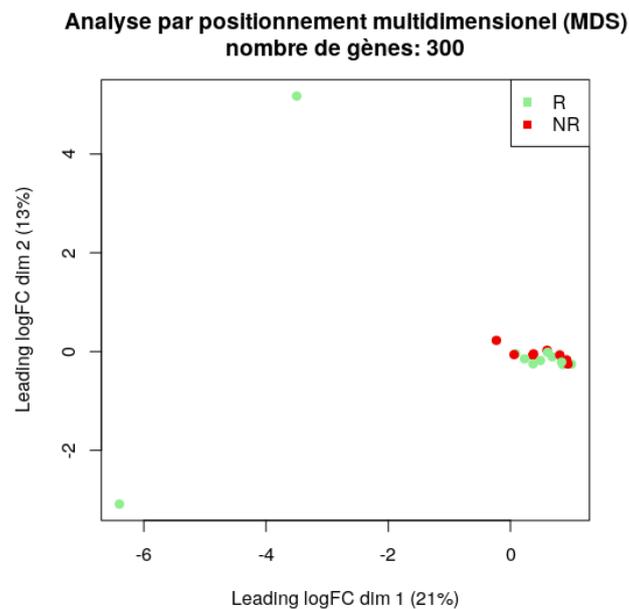


Figure 36. Analyse par positionnement multidimensionnel (MDS) après normalisation chez tous les patients, selon les dimensions 1 et 2.

Concernant l'analyse d'expression différentielle entre les deux groupes de patients avec le package R, EdgeR, nous avons observé que 283 gènes étaient différentiellement exprimés entre les ganglions des sujets R et NR avant ajustement de la p value. Cependant ces différences significatives n'étaient plus observées après ajustement de la P value en raison du « multiple testing », (méthode FDR (False discovery rate) de Benjamini et Hochberg). Ceci pouvait être la conséquence d'un trop faible effectif de patients dans chaque groupe et surtout de l'hétérogénéité du statut immunitaire intra-ganglionnaire des patients R et NR.

Pour tenter de pallier cela, nous avons ensuite comparé le statut R et NR suivant le profil de prolifération KI 67+ des patients, objectivé en immunohistochimie. Une différence significative en termes de densité immunitaire avait été observée sur le critère prolifératif Ki67+ entre les patients R et NR à la nRCT.

c) Comparaison des ganglions proliférant (Ki67 forts) ou non (Ki67 faibles)

Nous avons constitué trois groupes de patients ; RKi67+ (patients répondeurs avec forte densité en Ki67), RKi67- (patients répondeurs avec faible densité en Ki67), NRKi67+ (patients non répondeurs avec forte densité en Ki67). Un pool de ganglions a été sélectionné sur le critère d'expression Ki67 en IHC, pour chaque groupe de patients. Les ARN ont été extraits et séquencés afin d'étudier les différences d'expression de gènes.

La présence de sous-populations immunitaires dans ces groupes a été évaluée grâce à l'identification de gènes spécifiques de chaque sous-population immunitaire, regroupées sous le terme d'Immunome publié par notre équipe en 2013 (Bindea et al., 2013a).

Les niveaux d'expression normalisés (méthode cpm) de gènes associés aux différentes sous populations immunitaires ont ensuite été comparés entre les trois groupes de ganglions.

Les profils d'expression de gènes différaient en fonction du statut de réponse et du niveau de Ki67. 15 gènes parmi les 40 de l'Immunome associés aux lymphocytes B étaient fortement et différenciellement exprimés dans le groupe des patients répondeurs Ki67 fort (RKi+) comparés aux autres groupes RKi67- et NRKi67+ (**Figure 37 A**). A titre d'exemple, les intensités d'expression des gènes *CD19* et *MS4A1* (CD20) étaient 2 à 4 fois supérieures parmi les ganglions RKI+ (**Figure 37 B**).

36 gènes d'expression lymphocytaire T (T totaux, T CD8, Th1, TFH, T mémoires) issus de l'immunome (n=270) étaient surreprésentés dans le groupe des patients répondeurs Ki67 fort (RKI+) comparés aux autres groupes RKi67- et NRKi+ (**Figure 37 C**). De plus, parmi les 94 gènes associés à une signature Trm (issues de la publication (Molodtsov et al., 2021)), 26 étaient sur-exprimés parmi les ganglions RKi67+ comparés aux groupes RKi67- et NRKi67+ (**Figure 37 D**).

De façon intéressante, des gènes associés aux éosinophiles (8/40) et aux macrophages (9/40) étaient également sur-exprimés parmi les ganglions RKi67+ (**Figure 37 E**). En revanche aucun gène associé aux lymphocytes NK n'était sur-exprimé parmi les ganglions RKi67+ (**Figure 37 F**).

Une analyse d'enrichissement de fonctions à partir des gènes de l'Immunome sur-exprimés parmi les ganglions RKi67+ réalisée à l'aide du logiciel Cluego (Bindea et al., 2009) (**Figure 37 G**). Cette analyse montrait que 5 fonctions étaient significativement ($P < 0,05$) enrichies en gènes surexprimés dans les ganglions RKi67+ parmi lesquelles la signalisation lymphocytaire

B (CD19, MS4A1, CD38, LCK, IGHV1, IGHM) et le développement ganglionnaire (LTA, TOX).

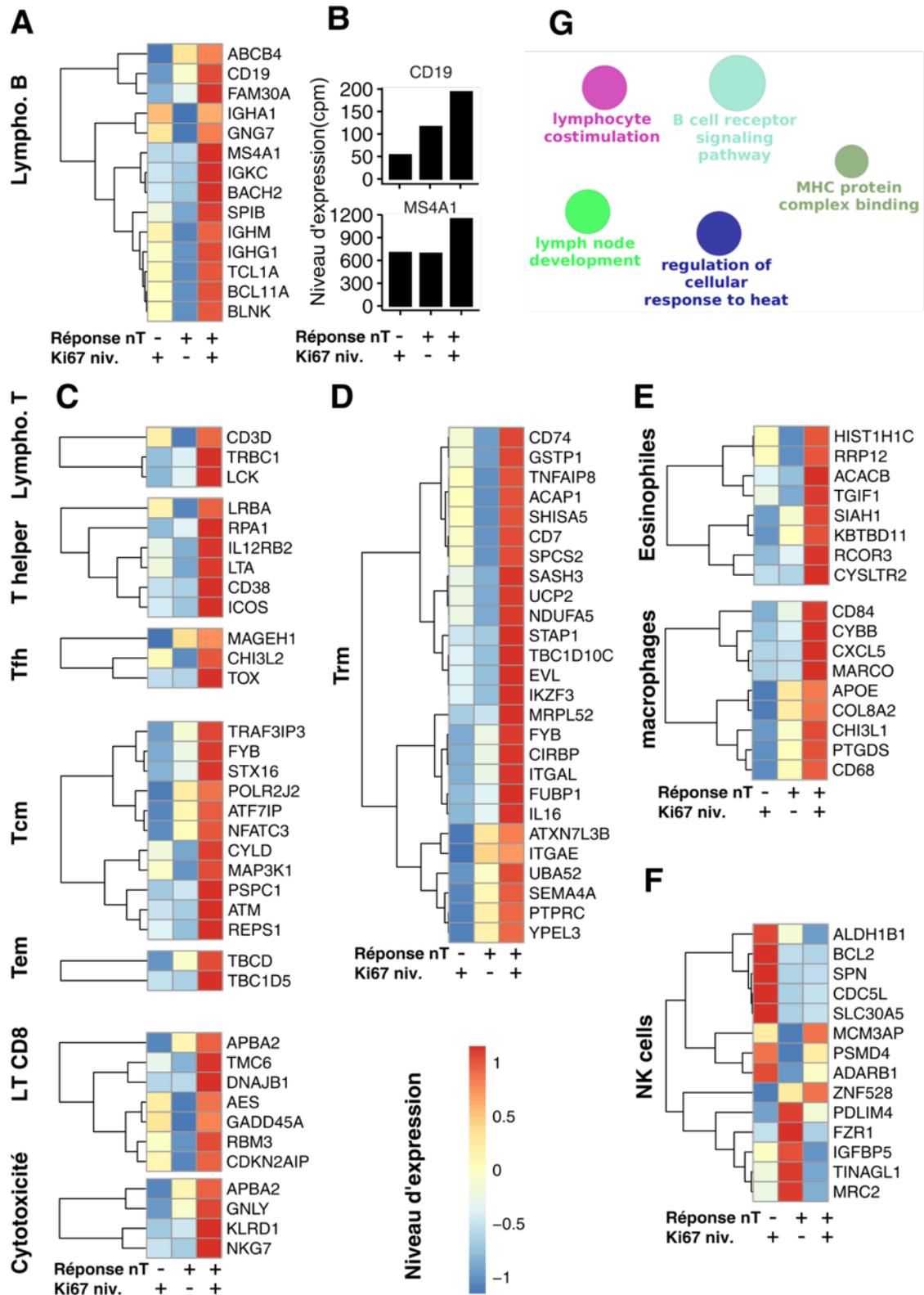


Figure 37. Heatmap représentant les gènes associés aux sous populations lymphocytaires B (**A**), T (**C et D**), des cellules de l'immunité innée (**E et F**) (en fonction du statut de réponse à la nRCT (- non répondeur vs + répondeur) et du statut de prolifération Ki67 (- : densité faible en Ki67 sur les analyses en IHC et IF, + : densité forte en Ki67). **B.** Niveau d'expression de gènes CD19 et MS4A1 (CD20) en fonction du niveau de réponse et de la densité en Ki67 **G.** Analyse d'enrichissement de fonction réalisée à partir du logiciel Cluego.

5) Analyse du répertoire des cellules T chez les patients répondeurs et non répondeurs à la nRCT

Enfin, une analyse de la clonalité T à partir de l'ADN extrait des 3 plus gros ganglions des patients répondeurs et non répondeurs à la nRCT a été initiée en collaboration avec la société HalioDx (Marseille, France). Cette analyse avait pour objectif de mettre en évidence une diversité en termes de diversité T au sein de ganglions issus de patients répondeurs ou non à la nRCT.

Le répertoire des cellules T a été analysé par séquençage à haut débit de la région CDR3 du TCR β à l'aide du panel « AmpliSeq for Illumina TCR beta-SR (20031675, Illumina) ».

Ce panel de séquençage a été conçu pour mesurer la diversité des cellules T et l'expansion clonale à partir d'ADN extrait d'échantillons FFPE en séquençant les réarrangements de la chaîne bêta du TCR. Le panel cible une région de 80 paires de bases (pb) couvrant la région CDR3 impliqué dans la reconnaissance antigénique. Les bibliothèques du panel ont été préparées à partir de 30 à 650 ng d'ADN issus de ganglions inclus en paraffine (FFPE) et séquencées sur le système NextSeq™ 550 à 2X75 pb.

Des analyses préliminaires ont été effectuées sur ces données de clonalité T.

Le répertoire de ganglions issus de 8 patients ayant répondu au traitement a été comparé à celui de ganglions issus de 6 patients non répondeurs. Le nombre de clones identifiés variait de 10^6 à $>10^7$ (Figure 38). Aucune différence évidente en termes de nombre de clones séquencés n'a pu être observée (**Figures 38**). L'index de diversité D50 représente le nombre de clones occupant 50% du répertoire. La majorité des patients répondeurs avait une D50 autour de 300, alors que 3 patients NR se distinguaient par un nombre très importants de clones nécessaires pour couvrir 50% du répertoire (de 400 à >1000). Ceci est compatible avec une possible restriction de TCR chez les patients répondeurs (**Figure 39**). Les résultats de ces analyses préliminaires sont en cours d'approfondissement.

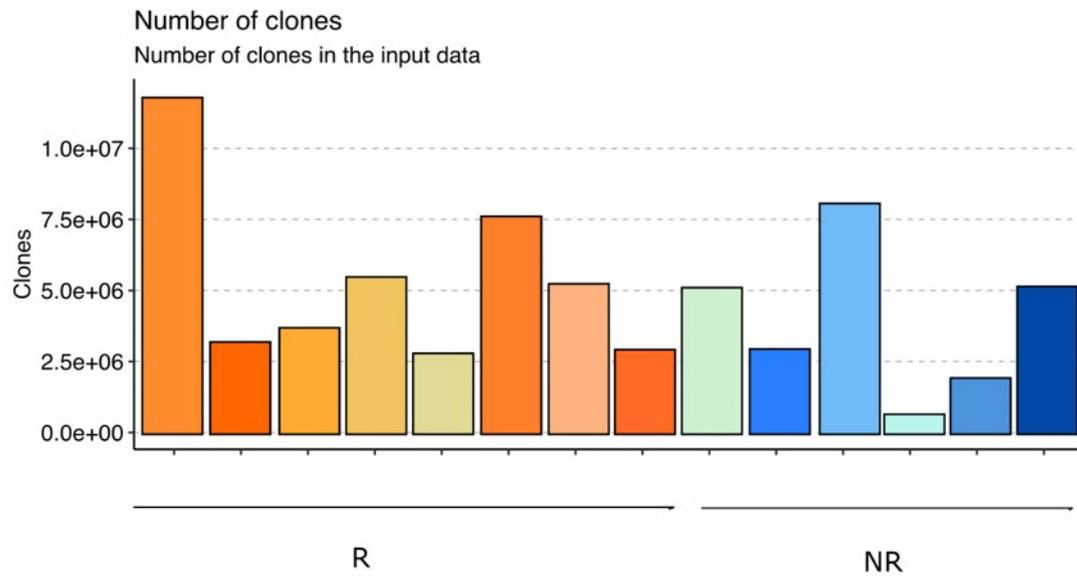


Figure 38. Nombres de clones séquencés au sein des 3 plus gros ganglions des patients répondeurs (R) et non répondeurs (NR)

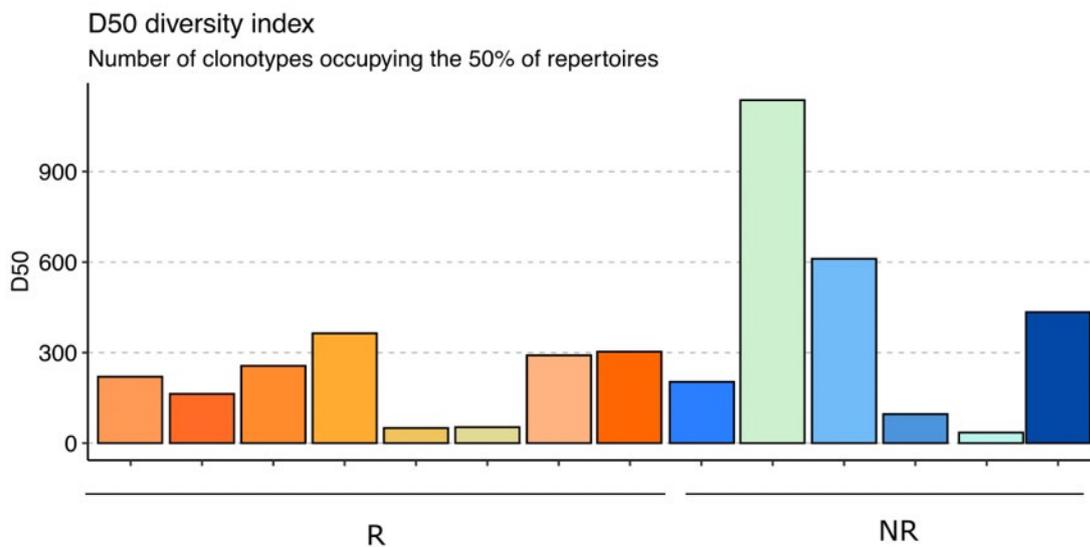


Figure 39. D50 diversity représentant le nombre de clones occupant 50% du répertoire séquencé au sein des 3 plus gros ganglions des patients répondeurs (R) et non répondeurs (NR).

L'analyse en composante principale des indices de Jaccard mesurant la similarité des échantillons ne permettait pas de distinguer les groupes des ganglions issus des patients R et NR à la nRCT (**Figure 40**).

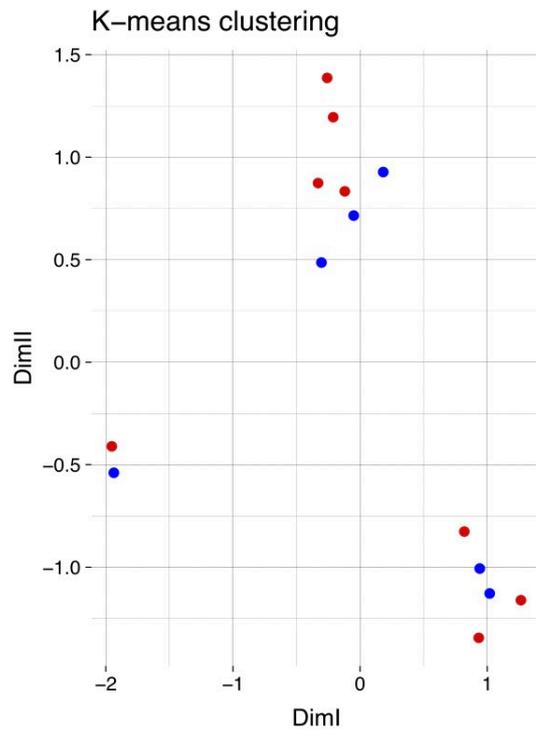


Figure 40. Analyse en composante principale représentant les indices de Jaccard, un point représente un patient, les patients R sont en rouge les patients NR sont en bleu

Ces résultats très préliminaires portant sur la clonalité T semblent corroborés ceux obtenus en analyses par IHC et IF. A l'inverse des lymphocytes B, la composante lymphocytaire T intra-ganglionnaire ne semble pas présenter de différences majeures en termes de densité, de phénotypes et de répertoires entre les patients R et NR.

DISCUSSION

I. Optimisation de la prise en charge thérapeutique dans le cancer du rectum, apport de l'analyse du microenvironnement tumoral avant tout traitement

A. De l'intérêt du biobanking

Il y a 10 ans déjà, l'importance des prélèvements biopsiques dans le cadre de traitements néoadjuvants avait été soulevée par les anatomopathologistes des Breast International Group (BIG) et le National Cancer Institute-sponsored North American Breast Cancer Group (NABCG) (Loi et al., 2011). Ces groupes préconisaient fortement l'adoption de procédures standardisées de collection de biopsies à des fins diagnostiques et de recherche.

Une des étapes des plus chronophages -et des moins gratifiantes- de ma Thèse a été la constitution d'une collection de biopsies diagnostiques. A ce jour, en France, il n'existe aucune base de données centralisée recensant à l'échelle nationale l'ensemble des données (p.ex. compte-rendus) associées aux prélèvements anatomopathologiques d'un patient. Les bio-banques jouent pourtant un rôle crucial en recherche biomédicale en facilitant l'utilisation à des fins scientifiques de biomatériaux humains, supports irremplaçables pour appréhender non seulement les différents facteurs pronostiques des pathologies mais également pour le développement de nouveaux traitements. Nous avons eu la chance de collaborer avec les Pays-Bas lors de mon travail de Thèse, collecter les biopsies précieuses de patients inclus dans la stratégie de conservation d'organes s'est avéré beaucoup moins compliqué qu'attendu. En effet, depuis 1971, la fondation hollandaise PALGA, réseau national regroupant l'ensemble des laboratoires d'anatomopathologie du pays, constitue un registre de l'ensemble des comptes-rendus anatomopathologiques et un archivage national des prélèvements anatomopathologiques afin de faciliter leur accessibilité à des fins cliniques, universitaires ou de recherche (Verjans et al., 2021). Les résultats que nous avons obtenus sur les biopsies diagnostiques, illustrent l'importance de ce prélèvement. Les patients atteints de cancer du rectum pourraient bénéficier d'une étroite collaboration entre les différents acteurs impliqués dans sa prise en charge (laboratoires de ville, cliniques, hôpitaux universitaires) en recensant à l'échelle nationale l'ensemble des prélèvements effectués pour un patient. En effet, dans la très grande majorité des cas les biopsies ne sont pas faites dans les centres où le patient est traité. Une base de données nationale permettant de localiser facilement

l'ensemble des prélèvements histologiques d'un patient permettrait de considérer ce matériel comme partie intégrante du dossier médical du patient.

B. Apport de l'analyse de l'infiltrat immunitaire des biopsies diagnostiques du cancer du rectum

Aujourd'hui, les biopsies réalisées lors de la coloscopie initiale dans les cancers colorectaux - ainsi que dans la plupart des cancers- ne sont utilisées « qu'à » visée diagnostique.

L'évaluation de la composante immunitaire des cancers sur biopsies tumorales apparaît de plus en plus nécessaire. En effet, **i/** dans certaines tumeurs inopérables, la valeur pronostique immunitaire ne peut être évaluée que sur biopsies, **ii/** en situation de tumeur du rectum localement avancé, l'évaluation immunitaire à des fins de prédiction de réponse au traitement ne peut se réaliser que sur les biopsies initiales, et enfin **iii/** dans le cas de tumeurs métastatiques d'emblée les immunothérapies par immune checkpoint inhibitors (ICI) peuvent être envisagée et l'évaluation de la réaction immunitaire au site de la tumeur serait utile pour tenter de prédire la réponse à ces traitements.

Après validation du test « Immunoscore » (IS) dans le cancer du côlon comme biomarqueur pronostique faisant désormais partie des guidelines de l'ESMO (ESMO Clinical Guidelines, 2020) (Argiles et al., 2020), il était nécessaire d'évaluer l'analyse de la composante immunitaire sur biopsies, qui diffère en quelques points de l'analyse sur pièce opératoire :

- La surface totale analysée sur la biopsie diagnostique est en moyenne 10 fois plus petite que la surface analysée sur pièce opératoire pour l'évaluation de la densité en CD3 et CD8 en IS.
- L'évaluation de l'infiltration immunitaire par l'IS_B, ne tient compte que de la densité lymphocytaire T au sein de la tumeur, l'étude de l'infiltrat au sein de la marge d'invasion est en effet impossible sur le prélèvement biopsique. Or, les informations fournies par l'étude de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur et de sa marge d'invasion sont complémentaires en termes d'informations pronostiques (Mlecnik et al., 2016a; Pages et al., 2009). Ainsi, la non-évaluation de la marge d'invasion dans le test IS_B va induire à une perte de puissance pronostique. A titre d'exemple, l'infiltrat immunitaire du front d'invasion est impliqué dans la défense contre l'expansion de la masse tumorale et de sa dissémination locale à type de « tumor budding ». Ce processus est défini par la présence au niveau du front d'invasion de la tumeur de cellules isolées ou groupées en petits amas cellulaires (< 5) se détachant du reste de la tumeur (Svrcek and Fléjou, 2012). Il a récemment été décrit une corrélation inverse entre la densité immunitaire au sein de la marge d'invasion et le « tumor budding » (Guil-Luna et al., 2020; Nearchou et al., 2019).

Malgré la petite taille de ces prélèvements, l'hétérogénéité de l'infiltrat immunitaire au sein des tumeurs, l'absence de marge d'invasion, l'évaluation de la densité en lymphocytes T CD3+ et CD8+ évaluée par l'IS_B a permis de montrer un lien entre la qualité de l'infiltrat initial, et (i) la nature de la réponse immunitaire intra-tumorale post-traitement néoadjuvant, (ii) la qualité de la réponse de la tumeur au traitement néoadjuvant, (iii) la survie sans récurrence et la survie globale du patient.

La corrélation positive et significative entre l'IS_B et la qualité de la réponse à la nRCT. Cette observation que nous avons observée est en accord avec une précédente étude publiée par notre équipe (Anitei et al., 2014) ainsi qu'avec d'autres études publiées par différents groupes (Matsutani et al., 2018; Teng et al., 2015a, 2015b; Yasuda et al., 2011). Seuls 5% des patients avec un IS_B low (22,7% de la cohorte) ont présenté une réponse pathologique complète sur la pièce opératoire. Ceci indique que ces patients initialement faiblement infiltrés en cellules T cytotoxiques pourrait bénéficier d'une optimisation du traitement néoadjuvant telle que l'ajout d'une immunothérapie néoadjuvante (Chalabi et al., 2020; Rahma et al., 2021) ou d'une intensification du traitement néoadjuvant (Conroy et al., 2021). A noter que 12% des patients avec un IS_B high présentaient une très faible régression tumorale post-nRCT, soulignant que la résistance au traitement était également guidée par des facteurs intrinsèques à la tumeur, tels que la présence d'un statut mutationnel favorisant une résistance tumorale à l'apoptose, de cellules souches cancéreuses impliquées dans la résistance aux traitements (Makena et al., 2018) et/ou de la présence d'un microenvironnement immunosuppresseur en particulier induit par la présence de MDSC (myeloid-derived suppressor cell) ou de TAM (Tumor-associated macrophages) qui suppriment la réponse T via la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que IL-6, IL-10 ou TGF- β (Barker et al., 2015).

Les résultats obtenus dans le rectum avec l'IS_B, nécessitent maintenant une validation à large échelle – similaire à l'étude internationale ayant validé l'IS sur plus de 3000 patients atteints de cancer du côlon- afin d'envisager son application en pratique clinique. La limitation principale à cette étude de validation à large échelle est l'accessibilité des biopsies initiales.

Aujourd'hui, certains critères cliniques et radiologiques, tels que la taille de la tumeur, le stade cTNM, la dose d'irradiation ainsi que la période entre la fin du traitement néoadjuvant et la chirurgie ont été identifiés comme étant associés à la qualité de la réponse au traitement (Zeng et al., 2015). Cependant, ces paramètres n'ont montré jusqu'à présent qu'une spécificité et une sensibilité limitées (Daye et al., 2017; Huh et al., 2013). La valeur

prédictive de nombreux biomarqueurs a été évaluée (Alkan et al., 2021; Dayde et al., 2017), cependant aucun n'est aujourd'hui utilisé en pratique clinique essentiellement par manque de confirmation à large échelle de résultats observés sur des petites séries de patients. Cependant, certains biomarqueurs reflétant la masse tumorale tels que l'ACE pourrait être un marqueur utile à la fois en terme de pronostic et de suivi de la régression tumorale post nRCT (Alkan et al., 2021). Les différentes études ne sont cependant pas d'accord sur le seuil d'ACE à considérer.

Ainsi, une combinaison de biomarqueurs reflétant à la fois la masse tumorale (ACE), des marqueurs intrinsèques de résistance tumorale (p.ex. niveau d'expression de l'EGFR) et la composante immunitaire du microenvironnement tumoral pourrait sans doute apporter une précision plus importante et permettre d'établir un pronostic plus précis, d'anticiper la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant et ainsi de l'ajuster.

C. L'IS_B comme biomarqueur permettant l'évolution de la prise en charge des cancers du rectum

Ces 30 dernières années, la prise en charge des cancers du rectum a beaucoup évolué, grâce à l'amélioration des techniques de chirurgie (standardisation de la TME, développement de la TME par voie laparoscopique) et à l'instauration d'une nRCT dans les cancers du rectum localement avancés (LARC) afin de diminuer la masse tumorale. Ces évolutions thérapeutiques se poursuivent actuellement par des tentatives d'intensification de la radiothérapie, d'association à des immunothérapies ou au contraire de désescalade thérapeutique (Watch and Wait) chez les patients répondeurs.

1) L'intensification de la radiothérapie pourrait annuler l'impact du système immunitaire en termes de pronostic

Plusieurs stratégies d'intensification locale du traitement néoadjuvant visant à augmenter les taux de réponse clinique et pathologique complètes sont en cours d'évaluation. Nous avons eu accès à une cohorte de patients chez qui le traitement néoadjuvant classique était complété par de la brachythérapie. Les patients très bons répondeurs à ce schéma thérapeutique étaient suivis par une stratégie de W&W (cohorte danoise). De manière intéressante, l'évaluation de l'infiltrat immunitaire sur les biopsies diagnostiques par l'IS_B, ne permettait pas de prédire

l'évolution clinique (*i.e.* la survie sans rechute), à l'inverse de ce qui était observé avec la prise en charge classique par nRCT. Ceci suggère que le type et la dose de rayons ionisants pouvait diminuer voire annuler l'action des cellules immunitaires au site de la tumeur. Plusieurs études précliniques ont retrouvé sur des cultures de cellules tumorales de différentes lignées, une corrélation entre la dose de rayons ionisants administrée et le niveau d'expression d'antigènes tumoraux et de molécules « pro-immunogéniques » (CMH-I, ICAM-1, Fas) (Garnett et al., 2004). Cette observation était retrouvée dans un modèle murin de mélanome B16 dans lequel une dose croissante de rayons (5 Gy, 7,5Gy, 10 Gy, 15Gy) était administrée au site de la tumeur. Une relation dose-effet de 5Gy à 10Gy était retrouvée concernant l'infiltration tumorale par des lymphocytes T CD8+ spécifiques de la tumeur, et le contrôle tumoral local. Cependant, une dose trop importante (15Gy) entraînait au contraire une diminution de l'infiltration tumorale en lymphocytes T CD8+ et en conséquence une absence de contrôle tumoral local, définissant ainsi un « effet seuil » (Schau et al., 2012). L'étude de phase III RTOG 0617 a comparé dans les cancers du poumon non à petites cellules non opérables deux doses de radiothérapie (RT) : une dose standard de 60 Gy et une forte dose de 74 Gy. De manière surprenante la médiane de survie dans le groupe de patients ayant reçu de la radiothérapie forte dose était de 20,3 mois (95% IC 17,7-25) contre 28,7 mois (24,1-36,9) (HR 1,38, 95% IC 1,09-1,76 ; p=0,004) dans le groupe ayant reçu une dose standard de RT (Bradley et al., 2015). Une ré-analyse des résultats de cette étude, a permis de montrer que l'estimation de la dose de rayons délivrée au système immunitaire (EDIC, effective dose to the immune cells) était significativement augmentée chez les patients ayant reçu une forte dose de RT (6,9+/-2,1 Gy vs 5,7+/-7,1 Gy, p <0,0001) et était significativement associée à une moindre survie sans récurrence et survie globale (P<0,0001) suggérant que la toxicité immunitaire secondaire à la radiothérapie pouvait être un facteur de progression tumorale et de décès (Jin et al., 2017; Ladbury et al., 2019).

Afin de confirmer nos premières observations obtenues sur l'IS_B et l'intensification locale du traitement, nous avons initié une étude ancillaire sur l'essai clinique de phase III OPERA comparant deux bras de traitement néoadjuvant : un bras nRCT (45 Gy, capécitabine) + boost externe de 9 Gy et un bras nRCT (45 Gy + capécitabine) + irradiation endocavitaire de 90 Gy en trois fractions par radiothérapie de contact (RX 50Gy). L'évaluation de l'IS_B sur les biopsies diagnostiques est en cours de réalisation. Ainsi, une absence de différence en termes de pronostic entre les groupes de patients fortement ou faiblement infiltrés pourrait confirmer cette première observation.

2) Allongement du délai entre la fin de la radiothérapie et la chirurgie pourrait être bénéfique : implication de la composante immune

Une des stratégies actuellement envisagée est l'augmentation du délai entre la chirurgie et la radiothérapie courte (SCRT). Dans le protocole standard de SCRT la chirurgie est envisagée 7 jours après la fin de la radiothérapie contrairement au protocole LCRT où la chirurgie a lieu 6 à 8 semaines après la fin du traitement. L'essai de phase III Stockholm III a comparé 3 bras de traitements : un bras SCRT « standard » avec chirurgie 7 jours après, un bras SCRT avec une chirurgie décalée entre 4 à 8 semaines après la fin de la RT et un bras LCRT avec radiothérapie normofractionnée de 50 Gy avec une chirurgie 4 à 8 semaines après. L'allongement du délai entre la fin de la RT et la chirurgie était associée à une augmentation significative du taux de pCR passant de 0,3% à 10,4% ($p < 0,0001$) (Erlandsson et al., 2019). Cette différence très significative ne pourrait-elle pas être le reflet d'une stimulation immunitaire au site de la tumeur post-RT (Glynn-Jones et al., 2020) ? Des modèles pré-cliniques murins de cancer de côlon ont montré que la réponse immunitaire (infiltration en lymphocytes T CD8 de la tumeur) induite par la RT en réponse à la libération d'antigènes de tumeur atteignant son maximum au bout de 8 à 10 jours après l'irradiation, puis revenait rapidement à un état basal (Dovedi et al., 2014; Filatenkov et al., 2015; Frey et al., 2017). Ainsi une chirurgie trop précoce pourrait freiner la réaction immunitaire anti-tumorale en ne bénéficiant pas du processus de mort immunogène induite par la RT. Nos analyses d'expression de gènes sur pièces opératoires chez des patients opérés 6 à 8 semaines après la nRCT (tous traités par LCRT) montraient une stimulation immunitaire d'orientation Th1 cytotoxique chez 30,6% de l'ensemble des patients analysés, cette stimulation était présente chez 44% des patients bons répondeurs à la nRCT (pCR) confirmant un rôle de la réponse immunitaire post-nRCT dans la qualité de la réponse au traitement. Cette réponse était d'autant plus importante que la qualité de l'infiltrat initial était bonne (ISB High). Ainsi le meilleur taux de réponse après une augmentation du délai post-SCRT pourrait être le reflet de cette activation immunitaire *in situ*.

3) Combinaison nRCT et immunothérapie

L'avènement des immunothérapies anti-MCI (ICI) ces dernières années et leurs résultats bénéfiques dans de nombreux cancers a ouvert la voie à de nouvelles combinaisons de traitements anti-cancéreux afin de maximiser leurs effets. Nous avons montré dans notre étude que la nRCT pourrait orienter la tumeur vers un profil lymphocytaire compatible avec une réponse aux ICI. En effet, la nRCT entraînait une augmentation de l'expression des MCI tels que PD1 ou CTLA-4 et de leurs ligands tels que PD-L1. Ce profil était accompagné d'un contexte immunitaire de type Th1, avec présence IFN- γ . Ceci témoigne très probablement de la mise en place d'une résistance adaptative au traitement par radiochimiothérapie.

Cette augmentation était d'autant plus importante chez les patients ayant reçu de la radiothérapie en association avec de la chimiothérapie. En 2016, l'équipe de Hecht (Hecht et al., 2016) a montré que l'expression tumorale de PD-L1 avant traitement était un facteur pronostique chez les patients atteints de cancer du rectum non métastatique traité par nRCT, et que la nRCT augmentait l'expression de PD-L1. Dans cette étude, 199 patients traités par nRCT (5.4Gy avec 5FU ou Fu/oxaliplatine) ont été inclus. **Le traitement néoadjuvant entraînait une augmentation de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales** (7.8% dans la tumeur, $p < 0.001$ et 9.3% au niveau de la marge d'invasion $p < 0.001$). Une expression forte de PD-L1 sur cellules inflammatoires à la fois au niveau des biopsies pré-traitement ($p = 0.048$) et sur la pièce opératoire ($p = 0.010$), était associée à une meilleure survie sans récurrence.

De plus, des données pré-cliniques récentes montrent l'intérêt de la combinaison entre RCT et ICI qui limiterait la progression tumorale et pourrait ainsi augmenter les taux de réponse clinique au traitement anti-cancéreux (Chen et al., 2020; Guan et al., 2020; McLaughlin et al., 2020; Reynders et al., 2015; Twyman-Saint Victor et al., 2015). Dans le cancer colorectal, les ICI n'étaient jusqu'alors envisagés que dans des cancers de stades avancés métastatiques. *Chalabi et al.* ont montré dans une étude récente l'intérêt de l'utilisation des ICI en néoadjuvant dans les cancers du côlon localement avancé (UICC TNM I-III), ainsi 100% (95% CI 86-100) des patients avec un statut MSI présentait une régression tumorale sur la pièce de résection, contre 27% (95% CI, 8-55%) chez les patients MSS. La densité intratumorale avant traitement en T CD8+ PD-1+ était prédictive de la réponse aux ICI. Même si seuls 5-10% des cancers du rectum sont MSI+, l'effet bénéfique, jamais observé auparavant, de la combinaison anti-PD-1 + anti-CTLA-4 en néoadjuvant chez les patients MSS, ouvre des perspectives de traitement dans les cancers du rectum MSS, en particulier pour les patients identifiés par l'ISB comme ayant un fort infiltrat immunitaire.

Une étude multicentrique PRIME-RT de phase II randomisée inclue actuellement des patients atteints de LARC et compare un *bras A* associant une SCRT (short-course radiotherapy) suivie de 6 cycles de chimiothérapie FOLFOX + durvalumab (anti PD-1), au *bras B* associant une LCRT (longue-course radiotherapy) suivie de 4 cycles de FOLFOX + durvalumab (Hanna et al., 2021). Les objectifs principaux de cet essai clinique sont de vérifier si l'ajout d'une immunothérapie anti-PD1 aux protocoles de type TNT (total neoadjuvant therapy) permettrait d'obtenir des taux de réponse complète plus élevés, et ainsi proposer à une plus grande proportion de patients une stratégie de préservation d'organe. Les biopsies rectales effectuées dans cet essai clinique (avant traitement, semaine 2, semaine 6 et à la fin du traitement) vont permettre de suivre le taux de CD3+ et ainsi de suivre le statut d'activation immunitaire. Les résultats obtenus dans nos analyses d'expression de gènes suggèrent que la nRCT pourrait orienter la tumeur vers un profil lymphocytaire compatible avec une réponse au traitement par ICI.

4) Stratégies de préservation d'organe

La chirurgie du cancer du rectum expose le patient à une morbidité de 20 à 30% si on tient compte de tous les stades de la classification de Dindo Clavien (Clavien et al., 2009). En effet, malgré les progrès de la chirurgie du cancer du rectum, il persiste encore des séquelles qui prennent progressivement une place croissante dans les plaintes des patients, ces séquelles sont d'ordres digestives et extra-digestives. Les patients opérés ont un résultat fonctionnel variable, souvent avec un confort digestif très altéré en termes de continence et de vidange rectale. De plus, il existe des séquelles urinaires et sexuelles. On estime que 5 ans après la chirurgie, 30 à 40 % des patients auront des troubles de vidange vésicale se manifestant par des pollakiuries et des mictions nocturnes (Bregendahl et al., 2015).

En raison d'un taux de réponses clinique et pathologique complètes non négligeables (Sanghera et al., 2008) ainsi qu'un faible taux de récurrence locale observé dans les LARC, plusieurs stratégies de désescalade chirurgicale telles que la chirurgie mini-invasive ou le Watch & Wait sont actuellement activement évaluées. Le principal problème de ces stratégies est le contingent de patients chez qui cette stratégie ne peut être menée à terme. En effet, ces patients sont aujourd'hui « uniquement » choisis sur des critères cliniques de bonne réponse : absence de contingent tumoral en imagerie et absence de tumeur perceptible lors de l'examen clinique. L'étude de l'International Watch and Wait Database (IWWD) menée sur plus de 1000 patients inclus dans un protocole de surveillance simple montrait un taux de récurrence

locale à 2 ans de 25,3% (95% CI 22,3-28,6), 88,3% des rechutes locales étaient diagnostiquées dans les 2 premières années (van der Valk et al., 2018).

Aucun biomarqueur permettant une sélection plus fine des patients pouvant bénéficier de cette stratégie de préservation sans sur-risque n'est actuellement disponible en pratique clinique. Nous avons eu l'opportunité lors de ce travail de Thèse de pouvoir analyser des biopsies de patients issus de centres internationaux proposant une stratégie de préservation d'organe par W&W. Cependant, les patients bons répondeurs et pouvant être inclus dans cette stratégie de préservation d'organe ne représentent que 15% des patients atteints de LARC (Ngan et al., 2012; Probst et al., 2015).

Dans notre cohorte (n=167), les patients avec un IS_B High au moment du diagnostic, bons répondeurs et inclus dans ce protocole de surveillance simple avaient un taux de récurrence à 5 ans de 3% (95% CI 0 -10%) alors que ce taux était de 32% (95% CI 17-44%) et 44% (95% CI 25-59%) chez les patients ayant un IS_B Int et Low respectivement. Les patients avec un IS_B High, représentent environ 18% des patients bons répondeurs. Ainsi, dans le monde, en Europe et en France, 19000, 2700 et 400 patients par an avec un IS_B High pourraient respectivement bénéficier de stratégies de désescalade chirurgicale avec un risque minimal de récurrence à 5 ans. En combinant ce score à d'autres facteurs pronostiques tels que l'ACE par exemple, ou en affinant les seuils des catégories d'IS_B ces chiffres pourraient être plus importants.

D. Perspectives : application de l'IS_B à d'autres types de cancers traités par nRCT

Grâce à l'efficacité croissante des traitements oncologiques, la liste des cancers localement avancés pris en charge par traitement néoadjuvant (nT) (radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie, combinaison), ne cesse de s'allonger : cancers du larynx (Forastiere et al., 2003), du sein (Thompson and Moulder-Thompson, 2012), du pancréas (Oba et al., 2020), de l'œsophage (Campbell and Villaflor, 2010), de l'estomac (Lorenzen et al., 2020), du poumon (Wang et al., 2021), sarcome (Bonvalot et al., 2020). Un des objectifs de cette prise en charge néoadjuvante est la désescalade chirurgicale et la préservation d'organe chez les patients très bons répondeurs afin d'éviter au maximum la perte de fonction de l'organe et une meilleure qualité de vie. Cependant, l'évaluation de la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant repose essentiellement sur une évaluation radiologique qui n'est pas toujours corrélée à la réponse pathologique. Ainsi, la recherche de biomarqueurs permettant d'affiner le niveau de réponse en les combinant avec les résultats de l'évaluation radiologique semble nécessaire.

L'impact clinique -notamment en terme de pronostic et de réponse aux traitements anti-cancéreux- de l'évaluation de la contexture immunitaire a largement été décrite (Fridman et al., 2012). Un lien entre la qualité de l'infiltrat immunitaire initial et la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant a été retrouvé dans le cancer du sein (Cerbelli et al., 2020), le cancer de l'œsophage (Goedegebuure et al., 2021), le cancer gastrique (Zurlo et al., 2021). Ainsi, dans ces cancers un lien entre une forte infiltration initiale en TILs (tumor infiltrating lymphocytes) et une bonne réponse au traitement néoadjuvant a été démontré. Aujourd'hui, malgré les preuves solides de corrélation entre le degré de l'infiltrat immunitaire initial et la qualité de la réponse cette évaluation n'est pas prise en compte. La standardisation de l'évaluation de l'infiltrat immunitaire à travers un test reproductible et fiable (tel que l'ISB) permettrait une prise en charge personnalisée du patient atteint de cancer : stratégie de préservation d'organe dans le cadre d'une bonne réponse radiologique et d'un infiltrat initial fort, intensification du traitement néoadjuvant (immunothérapie ?) dans le cadre d'un infiltrat immunitaire faible.

Dans les cancers du côlon, de stade II ou III, le traitement de référence consiste en une résection de la tumeur par excision total du mesocôlon suivie d'une chimiothérapie adjuvante à base d'oxaliplatine. Entre 15 et 45% des patients traités développent une rechute locale ou à distance dans les 3 ans suivant la fin de la chimiothérapie (André et al., 2018; Taieb et al., 2014), illustrant les limites de cette prise en charge dans le contrôle de la dissémination tumorale ou l'éradication des micrométastases. Dans les cancers du rectum localement avancés, le traitement néoadjuvant a permis une réduction des micrométastase et un « downstaging » de la tumeur initiale. Afin de tenter de transposer ces résultats aux tumeurs du côlon de stade II/III, l'étude de phase II Prodigé 22-ECKINOXE à évaluer l'efficacité d'un traitement périopératoire par FOLFOX (Karoui et al., 2020). Dans cette étude, les patients éligibles au traitement néoadjuvant étaient ceux dont le stade de cancer du côlon répondait aux critères définis par Smith et al. (Smith et al., 2007) et chez qui un traitement adjuvant par oxaliplatine et fluoropyrimidine était jugé approprié. Cette étude a montré la bonne tolérance du traitement néoadjuvant dans le cancer du côlon, mais seul 8% des patients ayant reçu un traitement néoadjuvant présentait une réponse complète au traitement néoadjuvant, inférieur aux 10% attendus pour un essai positif. Ceci pouvait être une conséquence d'une mauvaise sélection initiale des patients, en effet, dans cette étude 33% des patients présentaient un cancer du côlon de faible risque non identifié sur l'examen radiologique initial. Ces patients ne nécessitant pas de traitement adjuvant, une meilleure

sélection des patients au moment du diagnostic semble nécessaire dans de futurs essais cliniques où un traitement néoadjuvant est testé dans le cancer du côlon. Ainsi, une évaluation de la qualité initiale de l'infiltrat immunitaire initiale sur biopsie combiné à l'évaluation radiologique (cTNM) permettrait peut-être une meilleure sélection des patients. De plus, nous avons montré dans le cancer du rectum qu'une association entre le ycTNM (évaluation radiologique post traitement néoadjuvant) et le IS_B permettait une meilleure prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant, une telle évaluation pourrait également être envisageable dans le cancer du côlon.

II. Ganglions lymphatiques, acteurs de la réponse anti-tumorale

A. Ganglions lymphatiques : historique

Dans les cancers solides, les métastases sont de loin la première cause de décès des patients (90 %) (Chaffer and Weinberg, 2011; Sleeman and Thiele, 2009). À ce jour, la chirurgie reste le principal traitement des tumeurs primitives avec l'idée, véhiculée par toutes les campagnes de dépistage, qu'elle est potentiellement curative. Si elle est pratiquée à un stade précoce, avant que le processus métastatique ne se produise. Selon les directives internationales, la réalisation d'une exérèse à visée curative implique dans les cancers solides (sauf rares exceptions) le curage ganglionnaire de l'axe de drainage lymphatique. Dans le cancer colorectal, un minimum de 12 ganglions lymphatiques prélevés dans la pièce opératoire est désormais obligatoire pour considérer ce curage comme étant « adéquatement réalisée » (Benson et al., 2020). Ce geste a deux objectifs, l'un pronostique, l'autre thérapeutique. Ces deux attendus reposent sur des concepts apparus à la fin du XIX^e siècle. Si les observations ont parfaitement validé l'attendu pronostique, il n'en est pas de même sur l'attendu thérapeutique.

Le XIX^e siècle a été déterminant pour notre approche classique et encore bien ancrée du processus métastatique. En 1822, le chirurgien français Récamier inventait le terme « métastase » pour décrire le phénomène conduisant à des lésions distales survenant à la suite d'une tumeur primaire (Recamier, 1829). Pour la première fois, était proposée l'idée qu'une tumeur pouvait se propager aux ganglions lymphatiques et aux organes distants. Cinquante ans plus tard, De Morgan, un chirurgien britannique, affirmait, à partir d'observations

cliniques de cancers du sein qu'un cancer progressait linéairement du site tumoral primaire aux ganglions lymphatiques, puis à des sites distants (De Morgan, 1872). Le cancer du sein a été à l'origine des premières théories et hypothèses majeures en cancérologie, car en l'absence de toute imagerie, c'était le seul dont la mise en évidence de la lésion primaire et des ganglions pathologiques étaient cliniquement observables. Les métastases distales, non directement visibles (observées seulement à l'autopsie), semblaient n'apparaître qu'à un stade tardif. Cette vision linéaire de la propagation d'un cancer s'accordait bien avec le flux unidirectionnel du système lymphatique dont la découverte était relativement récente (fin du XVIIème siècle) et l'observation par Handley de cellules cancéreuses se développant le long des vaisseaux lymphatiques (Handley, 1911). Cliniquement, le cancer était ainsi décrit comme une maladie locale se propageant dans tout le corps dans un sens unique par une expansion contiguë utilisant le système lymphatique. Dans cette vision mécanistique, une tumeur était considérée comme se propageant de manière ordonnée et distante. On pensait logiquement que les métastases se produisaient dernièrement en tant que stade terminal mettant la vie en danger. Les ganglions lymphatiques régionaux constituaient des obstacles au passage des cellules tumorales, jouant un rôle mécanique de filtre. Sur la base des connaissances les plus pertinentes de cette époque, l'hypothèse lymphatique était née. La justification de la résection locale étendue et de la lymphadénectomie vient de cette vision anatomique et biologique du cancer.

En 1932, la découverte de la valeur pronostique de l'envahissement des ganglions lymphatiques par les cellules cancéreuses, telle que décrite par Sir Dukes dans ses travaux fondateurs, a été considérée comme la confirmation de l'hypothèse lymphatique (Dukes, 1932). Après la fin de la Seconde Guerre mondiale, le système TNM a été conçu par Pierre Denoix, un chirurgien du sein, de l'Institut Gustave Roussy, qui a ajouté à l'évaluation pathologique T et N de Dukes le statut M dans le but de distinguer clairement les patients atteints d'une maladie locale accessible à une chirurgie potentiellement curative des patients porteurs d'une maladie diffuse incurable (Denoix, 1946). L'extension du système de stadification TNM à toutes les tumeurs solides est depuis lors devenue un outil majeur pour pronostiquer le risque de récurrence du cancer.

B. Revisiter le dogme du curage ganglionnaire systématique

La place majeure du système immunitaire, tant sur un plan pronostique que thérapeutique devrait nous inciter à replacer le ganglion dans sa fonction immunitaire. Loin d'exercer une

simple action mécanique de filtre, les ganglions lymphatiques devraient être vus maintenant à travers leurs fonctions d'éducation immunitaire anti-tumorale, d'activation et d'amplification des lymphocytes pertinents (Shayan et al., 2006). En effet, les implications immunologiques potentielles du curage ganglionnaire doivent être étudiées car tous les ganglions ne partagent peut-être pas les mêmes fonctions ou comportements. La vision purement centrée sur la cellule cancéreuse avait incité à étudier les ganglions uniquement sous l'angle de la présence de cellules cancéreuses jusqu'à rechercher la présence intra-ganglionnaire de micro-fragments d'ADN tumoraux. L'intérêt devrait se porter sur les ganglions non-métastatiques et l'opportunité de conserver leur fonction immunitaire en tant que telle mais aussi dans le cadre de thérapies spécifiques telles que la radiothérapie, les chimiothérapies et immunothérapies.

La conception d'expériences et d'essais cliniques évaluant les interactions dynamiques entre les cellules immunitaires et les structures immunitaires primaires, secondaires (c'est-à-dire les ganglions lymphatiques) et tertiaires au cours du processus métastatique est d'une importance primordiale. Selon les connaissances récentes, les raisons éthiques empêchant les essais cliniques de contester la lymphadénectomie étendue ne sont plus un obstacle. La dernière raison qui pouvait encore être invoquée pour effectuer une lymphadénectomie prolongée était une évaluation précise du pronostic par le système TNM. Or, du moins dans le cancer colorectal cet argument pourrait ne plus tenir, du fait de la supériorité pronostique démontrée de l'Immunoscore sur la stadification TNM (Mlecnik et al., 2011).

Le curage ganglionnaire lymphatique étendu est ainsi remis en question dans différents cancers. Le cancer épithélial de l'ovaire est -à raison- présenté comme un cancer de mauvais pronostic, malgré le développement de thérapies ciblées la chirurgie garde un rôle central dans la prise en charge des patientes et la qualité de sa mise en œuvre est un facteur influençant le pronostic. Elle repose schématiquement sur deux notions principales : la cytoréduction péritonéale et la chirurgie des aires ganglionnaires pelvienne et lombo-aortique. Si l'impact de la réduction du résidu tumoral est bien démontré, celui de la chirurgie ganglionnaire fait toujours l'objet de débats. En mars 2019, Harter et *al.* publient les résultats de l'essai LION (Lymphadenectomy in patient with advanced ovarian neoplasms) qui remet en cause l'intérêt des curages ganglionnaires pour certaines patientes présentant un cancer épithélial de l'ovaire à un stade avancé (Harter et al., 2019). En effet cet essai clinique suggère **l'absence de bénéfice en termes de survie globale ou sans récurrence à la réalisation d'un curage ganglionnaire** après chirurgie de cytoréduction péritonéale macroscopiquement complète chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire de stade avancé en absence d'argument préopératoire ou peropératoire pour une atteinte

ganglionnaire. La réalisation d'une lymphadénectomie n'a pas montré d'amélioration ni sur la survie globale (HR = 1,06, 95% CI 0,83-1,34 ; P=0,65) ni sur la survie sans progression (HR = 1,11; 95% CI, 0,92-1,34 ; P=0,29). Malgré la mise en évidence d'une atteinte ganglionnaire rétropéritonéale microscopique chez 55,7% des patientes. Dans le cancer de l'endomètre, plusieurs études multicentriques rétrospectives ont comparé l'utilisation du ganglion sentinelle (GS) au curage ganglionnaire systématique. Les données montrent que la technique du GS présente une sensibilité similaire à celle du curage, avec une morbidité moindre. L'analyse des données de survie ne montre pas de différence entre les deux techniques. Des données similaires ont également été rapportées dans le cancer du sein. Ces données pourraient suggérer que dans les cancers gynécologiques pelviens (ovaire et endomètre), la réalisation d'un curage pourrait avoir un impact délétère sur l'immunosurveillance anti-tumorale.

Des données récentes dans le cancer colorectal suggèrent le potentiel effet délétère d'une résection des ganglions non métastatiques chez des patients avec cancer colorectal MSI-H/dMMR (Inamori et al., 2021). En effet, dans cette étude un curage étendu des ganglions régionaux (>38) était associé à une survie sans récurrence plus courte en comparaison aux patients dont le curage ganglionnaire était plus localisé (<38 ganglions). Ces résultats remettent en question le dogme « more is better » en termes de curage lymphatique dans les cancers colorectaux (O'Boyle and Stephenson, 2017), où l'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est recommandé par l'UICC et l'AJCC pour établir le statut N de la classification TNM.

Il faut également noter que la chirurgie des tumeurs entraîne automatiquement l'ablation des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) présentes au sein de la tumeur. Les TLS sont des structures lymphoïdes dont la formation est induite par la présence d'un microenvironnement sujet à l'inflammation chronique comme le microenvironnement tumoral (Goc et al., 2013). Les TLS partagent de nombreuses caractéristiques structurelles et fonctionnelles avec les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions, suggérant très fortement leur rôle comme structure de présentation antigénique aux lymphocytes effecteurs et lieu de différenciation des lymphocytes T et B mémoires (Germain et al., 2015). En effet, les TLSs se composent d'une zone riche en cellules T et d'une zone riche en cellules B organisées en follicules avec en son centre un centre germinatif. Ainsi, les TLS pourraient être un des premiers sites de rencontre entre les cellules T et les antigènes de tumeurs, aboutissant à une réponse anti-tumorale efficace. La présence de TLSs est dans la plupart des cancers associée

à un meilleur pronostic (Di Caro et al., 2015; Goc et al., 2014; Petitprez et al., 2020). Ainsi, l'ablation de la tumeur et de ses TLSs remet le ganglion au centre de la réponse anti-tumorale. De plus, il serait judicieux dans notre travail, de comparer le nombre, la taille et la qualité des TLS des patients répondeurs et non répondeurs à la nCRT. Ceci pourrait fournir un argument immunitaire additionnel pour une stratégie de W&W.

Aujourd'hui, très peu d'études portant sur le rôle pronostique des populations lymphocytaires intra-ganglionnaire sont disponibles (Kemp et al., 2011; Kohrt et al., 2005) et les résultats rapportés y sont contradictoires quant au rôle pronostique des lymphocytes T intraganglionnaires.

L'essor des thérapies ciblant les points de contrôle immunitaire (immune checkpoint inhibitors, ICI) a remis le ganglion au centre de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, « seuls » 20 à 30 % des patients traités répondent favorablement de manière stable et durable, aux prix parfois d'effets secondaires sévères (Martins et al., 2019). La recherche de biomarqueurs permettant de sélectionner avec précision les patients qui répondront aux ICI est devenue un enjeu majeur. La plupart des efforts se sont concentrés sur l'expression de marqueurs immunitaires du microenvironnement tumoral. Or, la réponse immunitaire aux néoantigènes tumoraux commence au niveau des ganglions lymphatiques régionaux. C'est ainsi que certaines équipes se sont intéressées à l'étude des mécanismes de recrutement des lymphocytes T au sein de ces organes lymphoïdes secondaires. Ces études ont montré la nécessité de cibler les ganglions drainant la tumeur plutôt que le microenvironnement tumoral afin de garantir à la fois la génération de cellules T dirigées contre les cellules tumorales et une meilleure infiltration de la tumeur par ces cellules (Francis et al., 2020; Fransen et al., 2021; van Pul et al., 2021). Ainsi, Francis et al. ont récemment montré que l'administration intra-tumorale d'anti-CTLA-4 et/ou d'anti-PD-1 garantissait un accès optimal aux ganglions drainant la tumeur contrairement à une administration systémique. De plus, l'administration ipsilatérale des ICI au niveau d'un site différent de la tumeur mais ayant les mêmes relais lymphatiques que celle-ci entraînait une réduction de la taille tumorale (Francis et al., 2020).

Un nombre croissant d'études cliniques en cours testent l'efficacité des ICI en tant que traitement néoadjuvant, c'est à dire en situation où la tumeur et ses ganglions de drainage sont toujours en place. Ces études suscitent en conséquence un regain d'intérêt pour le rôle des ganglions lymphatiques dans la réponse à ces traitements.

C. Rôle des lymphocytes B dans la réponse à la nRCT

Un des principaux résultats obtenus à l'issue de notre analyse des ganglions lymphatiques provenant de patients répondeurs ou non au traitement néoadjuvant était l'importance de la composante immunitaire B dans la réponse à la nRCT. En effet, les patients bons répondeurs à la nRCT présentaient des ganglions lymphatiques avec un cortex plus épais, un nombre de follicules et de centres germinatifs plus élevés et une densité plus importante de cellules CD20+Ki67+. Ceci contrastait avec nos résultats obtenus sur la biopsie diagnostique, dans lesquelles l'évaluation de la composante immunitaire T à travers l'IS_B permettait de prédire la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant. Ceci soulève la question du rôle des lymphocytes B comme marqueur prédictif de réponse au traitement dans le cancer du rectum et plus largement la question du rôle des lymphocytes B comme marqueur pronostique. Une étude récente, publiée par Sendoya et al., a évalué l'impact de l'infiltrat immunitaire B évaluée sur la biopsie diagnostique initiale avant tout traitement néoadjuvant (Sendoya et al., 2020). Dans cette étude, une forte densité en cellules CD20+ évaluée à la fois par analyses transcriptomiques et en immunohistochimie était associée à une bonne réponse au traitement néoadjuvant ($P = 0,047$, Hedges' $g = -0,73$). Cette étude suggère ainsi l'importance de la composante immunitaire B dans la qualité de la réponse au traitement néoadjuvant.

Ces données récentes suggèrent qu'une possible optimisation de la signature immunitaire évaluée sur les biopsies diagnostiques dans le cancer du rectum pourrait être envisagée. Ainsi, l'IS_B pourrait être complété par l'ajout de l'information de l'analyse de la composante lymphocytaire B.

Les lymphocytes B ont suscité beaucoup de travaux portant sur leur capacité unique à produire, une fois différenciés en plasmocytes, des anticorps spécifiques d'une immense variété d'antigènes. Une fois fixées sur leur cible antigénique et outre leur capacité neutralisante, ces molécules vont activer des mécanismes effecteurs majeurs de la réponse immunitaire, incluant la phagocytose, l'endocytose, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et celle dépendante du complément. Mais le rôle des lymphocytes B ne se limite pas à la production des anticorps. Au début des années 1980, il a été montré qu'ils servaient également de cellules présentatrices d'antigènes, conduisant à la formation de synapses immunologiques avec des lymphocytes T spécifiques, via la présentation de peptides antigéniques associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, cette synapse étant renforcée par des interactions entre des molécules de co-

stimulation et de signalisation. Ainsi, les lymphocytes B sont des acteurs pléiotropes du système immunitaire, avec cette capacité à activer à la fois des effecteurs de l'immunité innée et des effecteurs de l'immunité adaptative. Malgré le rôle important des lymphocytes B dans l'élaboration de la réponse immunitaire, notamment contre des microorganismes pathogènes, leur rôle reste controversé dans le contexte du cancer. Dans de nombreux modèles murins les lymphocytes B semblaient jouer un rôle délétère en induisant une inflammation chronique ou en inhibant la réponse T notamment (Barbera-Guillem et al., 2000; Qin et al., 1998; de Visser et al., 2005), alors que dans d'autres modèles murins les lymphocytes B semblaient au contraire avoir un rôle anti-tumoral en activant le compartiment T (DiLillo et al., 2010). Chez l'homme, la majorité des études montrent un rôle positif des lymphocytes B. Nous avons montré que la chimiokine CXCL13, un chemoattractant des lymphocytes B, était associé à un pronostic favorable et son absence à une diminution des lymphocytes B dans les tumeurs colorectales (Bindea et al., 2013b). De nombreux travaux ont directement associé la présence de lymphocytes B au sein des tumeurs au bon pronostic des tumeurs (Fridman et al., 2020). De façon intéressante, nous avons également associé la densité de lymphocytes B dans des métastases de tumeurs CRC, à l'évolution de ces métastases (Mlecnik et al., 2016b). Récemment, dans une étude dans les sarcomes, les lymphocytes B présents majoritairement au sein de LTS, ont également été associés à la réponse aux immunothérapies (Petitprez et al., 2020).

Les différences obtenues au niveau de l'analyse ganglionnaire en termes de populations lymphocytaires T étaient plus contrastées. Cependant, les données transcriptomiques suggèrent des différences en particulier pour les Trm dans les ganglions en prolifération chez les patients répondeurs. Les analyses en cours en immunofluorescence va nous permettre d'analyser en détail les rôles des différentes composantes T cytotoxiques et résidentes mémoires au sein des ganglions des patients bons et non répondeurs au traitement néoadjuvant.

Les ganglions sont un site privilégié de localisation de lymphocytes T et B mémoires, en particulier pour la population T centrale mémoire qui exprime à sa surface les molécules nécessaires à son adressage vers le ganglion. Dans les ganglions proximaux des cancers colorectaux, lieu d'éducation des lymphocytes naïfs, les lymphocytes mémoires pourraient représenter jusqu'à 28% des lymphocytes totaux (Lores-Vazquez et al., 1996). Notre équipe a observé un rôle prépondérant des lymphocytes T mémoires dans la prévention de la récurrence tumorale suivant l'acte chirurgical (Pagès et al., 2005). La bonne valeur pronostique associée

était d'autant plus importante que la densité intra-tumorale en cellules mémoires était forte. Or, le curage ganglionnaire a créé une déplétion d'une partie du pool des lymphocytes T et B mémoires. Il est concevable de penser que cet acte chirurgical a dans certains cas, en particulier pour des cancers bien infiltrés par des lymphocytes cytotoxiques et mémoires, une conséquence collatérale néfaste par la diminution du pool de lymphocytes cytotoxiques et mémoires.

D. Limitations et perspectives

Notre étude sur les ganglions lymphatiques chez les patients répondeurs ou non à la nRCT dans le cadre d'un cancer du rectum localement avancé présente certaines limitations.

Nous avons dans nos analyses, tenté d'objectiver des différences en termes de morphologie, d'infiltrations lymphocytaires, d'analyse du répertoire T des ganglions issus de ces patients. Cependant, le cancer du rectum n'est pas un modèle aisé pour l'étude des ganglions drainant la tumeur, en effet comme nous l'avons vu les relais ganglionnaires sont multiples et il n'existe pas de ganglion sentinelle à proprement dit. De plus, la topographie précise des ganglions prélevés est très rarement spécifiée dans les comptes rendus histologiques alors qu'elle est essentielle et qu'elle permet de distinguer les ganglions drainant spécifiquement le rectum, les ganglions drainant non spécifiquement le côlon ou le rectum et les ganglions drainant spécifiquement le côlon (Pirro et al., 2009).

Cette étude pilote sur les ganglions est une étude essentiellement descriptive et soulevant des hypothèses avec un faible nombre de patients et sans cohorte de validation permettant de valider nos observations. Cependant, les analyses sur lames HES ont été effectuées sur l'ensemble des ganglions, cette évaluation longue et fastidieuse nous a permis de développer un algorithme d'intelligence artificielle afin d'automatiser la reconnaissance des structures d'intérêt. Cet algorithme est facilement généralisable à l'ensemble des lames HES de ganglions issus de différents types de cancers permettant à l'avenir une exploration sur un grand nombre de patients. L'intérêt est croissant pour l'étude des populations présentes dans les ganglions. Afin de poursuivre nos analyses dans un modèle moins complexe, une collaboration avec l'équipe du service de chirurgie gynécologique de l'Hôpital Georges Pompidou est en cours. Cette étude a pour objectif d'étudier les différences de populations immunitaires au sein des ganglions de drainage dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons analysé la composante immunitaire intratumorale avant traitement nCRT et son évolution après nCRT ainsi que le statut immunitaire des ganglions drainant les tumeurs.

La translation clinique de ces investigations en termes d'IS_B a été explorée. Nous avons ainsi montré l'intérêt de l'évaluation simple et standardisée de la composante immunitaire T cytotoxique au niveau de biopsies diagnostiques de patients traités pour un cancer du rectum. Ce marqueur présente ainsi un double intérêt prédictif de réponse au traitement néoadjuvant mais également pronostique. De plus, ce travail a permis de montrer l'intérêt de la combinaison de l'évaluation de la réaction immunitaire initiale et de l'évaluation par imagerie de la réponse au traitement néoadjuvant pour mieux discriminer les patients qui pourraient bénéficier d'une désescalade chirurgicale ou d'une stratégie de surveillance simple. Nous avons également montré l'intérêt de l'IS_B chez les patients très bons répondeurs à la nRCT et inclus dans la stratégie de « Watch and Wait » avec un très faible taux de rechute chez les patients initialement très fortement infiltrés en lymphocytes T cytotoxiques sur leurs biopsies diagnostiques.

Ces résultats ont encouragé l'équipe à déposer un brevet.

Nous avons également dans une étude préliminaire analysé les modifications et le retentissement ganglionnaire lors de la nCRT afin d'évaluer le bénéfice potentiel de la préservation des ganglions lors des stratégies de conservation d'organe.

L'étude du rôle des ganglions comme organe central de la réponse anti-tumorale n'en est qu'à ses débuts. Après avoir intensément étudié le microenvironnement tumoral, l'élargissement du champ de la recherche anti-cancéreuse aux ganglions en tant qu'organe lymphoïde secondaire essentiel à la réponse immunitaire et non plus comme simple niche métastatique semble un défi passionnant à relever.

Bibliographie

- Adell, G., Sun, X.-F., Stål, O., Klintonberg, C., Sjö Dahl, R., and Nordenskjöld, B. (1999). p53 status: an indicator for the effect of preoperative radiotherapy of rectal cancer. *Radiotherapy and Oncology* 51, 169–174.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834–846.
- Alkan, A., Hofving, T., Angenete, E., and Yrlid, U. (2021). Biomarkers and cell-based models to predict the outcome of neoadjuvant therapy for rectal cancer patients. *Biomark Res* 9, 60.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155–161.
- Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., and Schilsky, R.L. (2009). American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27, 2091–2096.
- Allemani, C., Matsuda, T., Di Carlo, V., Harewood, R., Matz, M., Nikšić, M., Bonaventure, A., Valkov, M., Johnson, C.J., Estève, J., et al. (2018). Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet* 391, 1023–1075.
- Anania, G., Davies, R.J., Arezzo, A., Bagolini, F., D’Andrea, V., Graziosi, L., Salomone, D.S., Popivanov, G., Cheruiyot, I., Cirotchi, R., et al. (2021). Rise and fall of total mesorectal excision with lateral pelvic lymphadenectomy for rectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis of 11,366 patients. *Int J Colorectal Dis*.
- André, T., Vernerey, D., Mineur, L., Bennouna, J., Desrame, J., Faroux, R., Fratte, S., Hug de Larauze, M., Paget-Bailly, S., Chibaudel, B., et al. (2018). Three Versus 6 Months of Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy for Patients With Stage III Colon Cancer: Disease-Free Survival Results From a Randomized, Open-Label, International Duration Evaluation of Adjuvant (IDEA) France, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* 36, 1469–1477.
- André, T., Shiu, K.-K., Kim, T.W., Jensen, B.V., Jensen, L.H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., et al. (2020). Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 383, 2207–2218.
- Angka, L., Martel, A.B., Kilgour, M., Jeong, A., Sadiq, M., de Souza, C.T., Baker, L., Kennedy, M.A., Kekre, N., and Auer, R.C. (2018). Natural Killer Cell IFN γ Secretion is Profoundly Suppressed Following Colorectal Cancer Surgery. *Ann Surg Oncol* 25, 3747–3754.
- Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Tosi, A.-M., Kirilovsky, A., Bindea, G., Ferariu, D., Danciu, M., et al. (2014). Prognostic and Predictive Values of the Immunoscore in Patients with Rectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 20, 1891–1899.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050–1059.

Appelt, A.L., Pløen, J., Harling, H., Jensen, F.S., Jensen, L.H., Jørgensen, J.C., Lindebjerg, J., Rafaelsen, S.R., and Jakobsen, A. (2015). High-dose chemoradiotherapy and watchful waiting for distal rectal cancer: a prospective observational study. *The Lancet Oncology* *16*, 919–927.

Araghi, M. (2019). Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *4*, 8.

Argiles, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Laurent-Puig, P., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., et al. (2020). Localised Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Annals of Oncology*.

Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* *66*, 683–691.

Avril, M.F., Nguyen, T., Duvillard, P., Bognel, C., and Margulis, A. (1994). [Late recurrence of melanoma beyond 10 years]. *Ann Dermatol Venereol* *121*, 454–458.

Badoual, C. (2006). Prognostic Value of Tumor-Infiltrating CD4+ T-Cell Subpopulations in Head and Neck Cancers. *Clinical Cancer Research* *12*, 465–472.

Badoual, C., Hans, S., Fridman, W.H., Brasnu, D., Erdman, S., and Tartour, E. (2009). Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer. *J Clin Oncol* *27*, e5-6; author reply e7.

Barbera-Guillem, E., Nelson, M.B., Barr, B., Nyhus, J.K., May Jr., K.F., Feng, L., and Sampsel, J.W. (2000). B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunol Immunother* *48*, 541–549.

Barker, H.E., Paget, J.T.E., Khan, A.A., and Harrington, K.J. (2015). The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence. *Nat Rev Cancer* *15*, 409–425.

Barlozzari, T., Leonhardt, J., Wiltout, R.H., Herberman, R.B., and Reynolds, C.W. (1985). Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. *J Immunol* *134*, 2783–2789.

Baurain, J.-F., Van der Bruggen, P., Van den Eynde, B.J., Coulie, P.G., and Van Baren, N. (2008). [General principles and first clinical trials of therapeutic vaccines against cancer]. *Bull Cancer* *95*, 327–335.

Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The Biology of NKT Cells. *Annual Review of Immunology* *25*, 297–336.

Benson, A.B., Venook, A.P., Al-Hawary, M.M., Arain, M.A., Chen, Y.-J., Ciombor, K.K., Cohen, S., Cooper, H.S., Deming, D., Garrido-Laguna, I., et al. (2020). NCCN Guidelines Insights: Rectal Cancer, Version 6.2020: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* *18*, 806–815.

Beura, L.K., Wijeyesinghe, S., Thompson, E.A., Macchietto, M.G., Rosato, P.C., Pierson, M.J., Schenkel, J.M., Mitchell, J.S., Vezys, V., Fife, B.T., et al. (2018). T cells in non-lymphoid tissues give rise to lymph node resident memory T cells. *Immunity* *48*, 327-338.e5.

Bibeau, F., Frugier, H., Pedot, M., and Boissière-Michot, F. (2012). Instabilité microsatellitaire dans le cancer colorectal. *Oncologie* *14*, 525–529.

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pages, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* *25*, 1091–1093.

Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013a). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* *29*, 661–663.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013b). Spatiotemporal Dynamics of

Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* 39, 782–795.

Bonvalot, S., Gronchi, A., Le Péchoux, C., Swallow, C.J., Strauss, D., Meeus, P., van Coevorden, F., Stoldt, S., Stoeckle, E., Rutkowski, P., et al. (2020). Preoperative radiotherapy plus surgery versus surgery alone for patients with primary retroperitoneal sarcoma (EORTC-62092: STRASS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 21, 1366–1377.

Boon, T., De Plaen, E., Lurquin, C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Traversari, C., Amar-Costesec, A., and Van Pel, A. (1992). Identification of tumour rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Cancer Surv* 13, 23–37.

Bosset, J.-F., Calais, G., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Daban, A., Bardet, E., Beny, A., Briffaux, A., and Collette, L. (2005). Enhanced Tumorocidal Effect of Chemotherapy With Preoperative Radiotherapy for Rectal Cancer: Preliminary Results—EORTC 22921. *JCO* 23, 5620–5627.

Boustani, J., Caubet, M., and Bosset, J.-F. (2016). Adjuvant Chemotherapy in Rectal Cancer after Chemoradiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 28, 140–145.

Bouvier, A.-M., and Launoy, G. (2015). [Epidemiology of colorectal cancer]. *Rev Prat* 65, 767–773.

Bradley, J.D., Paulus, R., Komaki, R., Masters, G., Blumenschein, G., Schild, S., Bogart, J., Hu, C., Forster, K., Magliocco, A., et al. (2015). Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. *The Lancet Oncology* 16, 187–199.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 394–424.

Bregendahl, S., Emmertsen, K.J., Lindegaard, J.C., and Laurberg, S. (2015). Urinary and sexual dysfunction in women after resection with and without preoperative radiotherapy for rectal cancer: a population-based cross-sectional study. *Colorectal Disease* 17, 26–37.

Brenner, H., Bouvier, A.M., Foschi, R., Hackl, M., Larsen, I.K., Lemmens, V., Mangone, L., Francisci, S., and The EURO CARE Working Group (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EURO CARE study. *Int. J. Cancer* 131, 1649–1658.

Breugom, A.J., Gijn, W. van, Muller, E.W., Berglund, Å., Broek, C.B.M. van den, Fokstuen, T., Gelderblom, H., Kapiteijn, E., Leer, J.W.H., Marijnen, C. a. M., et al. (2015). Adjuvant chemotherapy for rectal cancer patients treated with preoperative (chemo)radiotherapy and total mesorectal excision: a Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG) randomized phase III trial†. *Annals of Oncology* 26, 696–701.

Bruchard, M., and Ghiringhelli, F. (2019). Deciphering the Roles of Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Frontiers in Immunology* 10, 656.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.

Bruni, D., Angell, H.K., and Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 20, 662–680.

Buggert, M., Nguyen, S., Salgado-Montes de Oca, G., Bengsch, B., Darko, S., Ransier, A., Roberts, E.R., Del Alcazar, D., Brody, I.B., Vella, L.A., et al. (2018). Identification and characterization of HIV-specific resident memory CD8⁺ T cells in human lymphoid tissue. *Sci Immunol* 3, eaar4526.

Bujko, K., Glimelius, B., Valentini, V., Michalski, W., and Spalek, M. (2015). Postoperative

chemotherapy in patients with rectal cancer receiving preoperative radio(chemo)therapy: A meta-analysis of randomized trials comparing surgery ± a fluoropyrimidine and surgery + a fluoropyrimidine ± oxaliplatin. *European Journal of Surgical Oncology* 41, 713–723.

Burnet, F.M. (1970). The Concept of Immunological Surveillance. *13*, 1–27.

Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *Br Med J* 1, 841–847.

Burnet, M. (1964). IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PROCESS OF CARCINOGENESIS. *Br. Med. Bull.* 20, 154–158.

Cammà, C., Giunta, M., Fiorica, F., Pagliaro, L., Craxì, A., and Cottone, M. (2000). Preoperative Radiotherapy for Resectable Rectal Cancer: A Meta-analysis. *JAMA* 284, 1008–1015.

Campbell, N.P., and Villalobos, V.M. (2010). Neoadjuvant treatment of esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 16, 3793–3803.

Canessa, C.E., Badía, F., Fierro, S., Fiol, V., and Háyek, G. (2001). Anatomic study of the lymph nodes of the mesorectum. *Diseases of the Colon & Rectum* 44, 1333–1336.

Caricato, M., Ausania, F., De Dominicis, E., Vincenzi, B., Rabitti, C., Tonini, G., Cellini, F., and Coppola, R. (2007). Tumor regression in mesorectal lymphnodes after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 33, 724–728.

Casparie, M., Tiebosch, A.T.M.G., Burger, G., Blauwgeers, H., van de Pol, A., van Krieken, J.H.J.M., and Meijer, G.A. (2007). Pathology databanking and biobanking in The Netherlands, a central role for PALGA, the nationwide histopathology and cytopathology data network and archive. *Cell Oncol* 29, 19–24.

Cerbelli, B., Scagnoli, S., Mezi, S., De Luca, A., Pisegna, S., Amabile, M.I., Roberto, M., Fortunato, L., Costarelli, L., Pernazza, A., et al. (2020). Tissue Immune Profile: A Tool to Predict Response to Neoadjuvant Therapy in Triple Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 12, E2648.

Cercek, A., Goodman, K.A., Hajj, C., Weisberger, E., Segal, N.H., Reidy-Lagunes, D.L., Stadler, Z.K., Wu, A.J., Weiser, M.R., Paty, P.B., et al. (2014). Neoadjuvant Chemotherapy First, Followed by Chemoradiation and Then Surgery, in the Management of Locally Advanced Rectal Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 12, 513–519.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559–1564.

Chakraborty, M., Abrams, S.I., Camphausen, K., Liu, K., Scott, T., Coleman, C.N., and Hodge, J.W. (2003). Irradiation of Tumor Cells Up-Regulates Fas and Enhances CTL Lytic Activity and CTL Adoptive Immunotherapy. *The Journal of Immunology* 170, 6338–6347.

Chalabi, M., Fanchi, L.F., Dijkstra, K.K., Van den Berg, J.G., Aalbers, A.G., Sikorska, K., Lopez-Yurda, M., Grootsholten, C., Beets, G.L., Snaebjornsson, P., et al. (2020). Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med* 26, 566–576.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10.

Chen, B., Alvarado, D.M., Iticovici, M., Kau, N.S., Park, H., Parikh, P.J., Thotala, D., and Ciorba, M.A. (2020). Interferon-Induced IDO1 Mediates Radiation Resistance and Is a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res* 8, 451–464.

Chen, M.-B., Wu, X.-Y., Yu, R., Li, C., Wang, L.-Q., Shen, W., and Lu, P.-H. (2012). P53 Status as a Predictive Biomarker for Patients Receiving Neoadjuvant Radiation-Based Treatment: A Meta-Analysis in Rectal Cancer. *PLOS ONE* 7, e45388.

Chen, X., Wan, J., Liu, J., Xie, W., Diao, X., Xu, J., Zhu, B., and Chen, Z. (2010). Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 69, 348–354.

Chen, Z., Duldulao, M.P., Li, W., Lee, W., Kim, J., and Garcia-Aguilar, J. (2011). Molecular diagnosis of response to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal cancer. *J Am Coll Surg* 212, 1008-1017.e1.

Clavien, P.A., Barkun, J., de Oliveira, M.L., Vauthey, J.N., Dindo, D., Schulick, R.D., de Santibañes, E., Pekolj, J., Slankamenac, K., Bassi, C., et al. (2009). The Clavien-Dindo Classification of Surgical Complications: Five-Year Experience. *Annals of Surgery* 250, 187–196.

Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320–2328.

Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 14, 199–220.

Commissioner, O. of the (2020). FDA allows marketing of first whole slide imaging system for digital pathology (FDA).

Conroy, T., Bosset, J.-F., Etienne, P.-L., Rio, E., François, É., Mesgouez-Nebout, N., Vendrely, V., Artignan, X., Bouché, O., Gargot, D., et al. (2021). Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 22, 702–715.

Coulie, P.G., Karanikas, V., Lurquin, C., Colau, D., Connerotte, T., Hanagiri, T., Van Pel, A., Lucas, S., Godelaine, D., Lonchay, C., et al. (2002). Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* 188, 33–42.

Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339, 286–291.

Crowe, N.Y., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *Journal of Experimental Medicine* 196, 119–127.

Crucitti, A., Corbi, M., Tomaiuolo, P.M., Fanali, C., Mazzari, A., Lucchetti, D., Migaldi, M., and Sgambato, A. (2015). Laparoscopic surgery for colorectal cancer is not associated with an increase in the circulating levels of several inflammation-related factors. *Cancer Biol Ther* 16, 671–677.

Dammeijer, F., van Gulijk, M., Mulder, E.E., Lukkes, M., Klaase, L., van den Bosch, T., van Nimwegen, M., Lau, S.P., Latupeirissa, K., Schetters, S., et al. (2020). The PD-1/PD-L1-Checkpoint Restrains T cell Immunity in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Cancer Cell* 38, 685-700.e8.

Dattani, M., Heald, R.J., Goussous, G., Broadhurst, J., São Julião, G.P., Habr-Gama, A., Perez, R.O., and Moran, B.J. (2018). Oncological and Survival Outcomes in Watch and Wait Patients With a Clinical Complete Response After Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Rectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Ann Surg* 268, 955–967.

Dayde, D., Tanaka, I., Jain, R., Tai, M.C., and Taguchi, A. (2017). Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 573.

De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 208, 469–478.

De Morgan, C. (1872). *The Origin of Cancer: Considered with Reference to the Treatment of the Disease*.

Deddish, M.R. (1951). Abdominopelvic lymphnode dissection in cancer of the rectum and distal colon. *Cancer* 4, 1364–1366.

Dedeurwaerdere, F., Claes, K.B., Van Dorpe, J., Rottiers, I., Van der Meulen, J., Breyne, J.,

Swaerts, K., and Martens, G. (2021). Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Sci Rep* 11, 12880.

Delmas, V. (2006). *Dictionnaire d'anatomie*, édition Masson, V. Delmas, 2006.

Demaria, S., and Formenti, S.C. (2012). Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Frontiers in Oncology* 2.

Demaria, S., Ng, B., Devitt, M.L., Babb, J.S., Kawashima, N., Liebes, L., and Formenti, S.C. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 58, 862–870.

Denoix, P. (1946). Enquete permanente dans les centres anticancereux. *Bulletin. Institut National d'hygiene (France)* 1, 12–17.

Di Caro, G., Castino, G.F., Bergomas, F., Cortese, N., Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Mantovani, A., and Marchesi, F. (2015). Tertiary lymphoid tissue in the tumor microenvironment: from its occurrence to immunotherapeutic implications. *Int Rev Immunol* 34, 123–133.

DiLillo, D.J., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2010). B Cells Are Required for Optimal CD4+ and CD8+ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. *The Journal of Immunology* 184, 4006–4016.

Dovedi, S.J., Adlard, A.L., Lipowska-Bhalla, G., McKenna, C., Jones, S., Cheadle, E.J., Stratford, I.J., Poon, E., Morrow, M., Stewart, R., et al. (2014). Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. *Cancer Research* 74, 5458–5468.

Dovedi, S.J., Cheadle, E.J., Popple, A.L., Poon, E., Morrow, M., Stewart, R., Yusko, E.C., Sanders, C.M., Vignali, M., Emerson, R.O., et al. (2017). Fractionated Radiation Therapy Stimulates Antitumor Immunity Mediated by Both Resident and Infiltrating Polyclonal T-cell Populations when Combined with PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* 23, 5514–5526.

Drago, L., Toscano, M., De Grandi, R., Casini, V., and Pace, F. (2016). Persisting changes of intestinal microbiota after bowel lavage and colonoscopy: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 28, 532–537.

Dukes, C.E. (1932). The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 35, 323–332.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22, 329–360.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6, 836–848.

Dworak, O., Keilholz, L., and Hoffmann, A. (1997). Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *International Journal of Colorectal Disease* 12, 19–23.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie*: 117-164.

Ehrlich, P. (1957). *The Collected Papers of Paul Ehrlich of Paul Ehrlich: Immunology and cancer research* (Pergamon P.).

El Sissy, C., Kirilovsky, A., Eynde, M.V. den, Mușină, A.-M., Anitei, M.-G., Romero, A., Marliot, F., Junca, A., Doyen, J., Mlecnik, B., et al. (2020). A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait Strategy. *Clin Cancer Res* 26, 5198–5207.

Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 514–525.

Erlandsson, J., Lörinc, E., Ahlberg, M., Pettersson, D., Holm, T., Glimelius, B., and Martling,

A. (2019). Tumour regression after radiotherapy for rectal cancer – Results from the randomised Stockholm III trial. *Radiotherapy and Oncology* *135*, 178–186.

Ettinger, D.S., Wood, D.E., Aggarwal, C., Aisner, D.L., Akerley, W., Bauman, J.R., Bharat, A., Bruno, D.S., Chang, J.Y., Chirieac, L.R., et al. (2019). NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw* *17*, 1464–1472.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018a). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer* *103*, 356–387.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018b). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* *103*, 356–387.

Fernandez-Martos, C., Garcia-Albeniz, X., Pericay, C., Maurel, J., Aparicio, J., Montagut, C., Safont, M.J., Salud, A., Vera, R., Massuti, B., et al. (2015). Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial†. *Annals of Oncology* *26*, 1722–1728.

Filatenkov, A., Baker, J., Mueller, A.M.S., Kenkel, J., Ahn, G.-O., Dutt, S., Zhang, N., Kohrt, H., Jensen, K., Dejbakhsh-Jones, S., et al. (2015). Ablative Tumor Radiation Can Change the Tumor Immune Cell Microenvironment to Induce Durable Complete Remissions. *Clin Cancer Res* *21*, 3727–3739.

Forastiere, A.A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T.F., Weber, R., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J.A., Chao, C., et al. (2003). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* *349*, 2091–2098.

Formenti, S.C., and Demaria, S. (2009). Systemic effects of local radiotherapy. *The Lancet Oncology* *10*, 718–726.

Francis, D.M., Manspeaker, M.P., Schudel, A., Sestito, L.F., O’Melia, M.J., Kissick, H.T., Pollack, B.P., Waller, E.K., and Thomas, S.N. (2020). Blockade of immune checkpoints in lymph nodes through locoregional delivery augments cancer immunotherapy. *Sci Transl Med* *12*, eaay3575.

Fransen, M.F., Schoonderwoerd, M., Knopf, P., Camps, M.G.M., Hawinkels, L.J.A.C., Kneilling, M., van Hall, T., and Ossendorp, F. (2018). Tumor-draining lymph nodes are pivotal in PD-1/PD-L1 checkpoint therapy. *JCI Insight* *3*, e124507.

Fransen, M.F., van Hall, T., and Ossendorp, F. (2021). Immune Checkpoint Therapy: Tumor Draining Lymph Nodes in the Spotlights. *Int J Mol Sci* *22*, 9401.

Frey, B., Rückert, M., Weber, J., Mayr, X., Derer, A., Lotter, M., Bert, C., Rödel, F., Fietkau, R., and Gaipl, U.S. (2017). Hypofractionated Irradiation Has Immune Stimulatory Potential and Induces a Timely Restricted Infiltration of Immune Cells in Colon Cancer Tumors. *Front Immunol* *8*, 231.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* *12*, 298–306.

Fridman, W.H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., and Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* *14*, 717–734.

Fridman, W.H., Petitprez, F., Meylan, M., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Roumenina, L.T., and Sautès-Fridman, C. (2020). B cells and cancer: To B or not to B? *Journal of Experimental Medicine* *218*.

Fritz, J.M., Tennis, M.A., Orlicky, D.J., Yin, H., Ju, C., Redente, E.F., Choo, K.S., Staab, T.A., Bouchard, R.J., Merrick, D.T., et al. (2014). Depletion of Tumor-Associated Macrophages Slows the Growth of Chemically Induced Mouse Lung Adenocarcinomas. *Frontiers in Immunology* *5*, 587.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174.

Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14, 1014–1022.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14, 1237–1243.

Galon, J. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Galon, J., Fridman, W.-H., and Pages, F. (2007). The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. *Cancer Research* 67, 1883–1886.

Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). $\gamma\delta$ T Cells Provide an Early Source of Interferon γ in Tumor Immunity. *Journal of Experimental Medicine* 198, 433–442.

Garnett, C.T., Palena, C., Chakraborty, M., Chakraborty, M., Tsang, K.-Y., Schlom, J., and Hodge, J.W. (2004). Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 64, 7985–7994.

Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases: A literature review. *Cancer* 28, 89–98.

Gaugler, M.H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Mouthon, M.A. (1997). Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 72, 201–209.

Gebhardt, T., Wakim, L.M., Eidsmo, L., Reading, P.C., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* 10, 524–530.

Gebhardt, T., Palendira, U., Tschärke, D.C., and Bedoui, S. (2018). Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance. *Immunol Rev* 283, 54–76.

Georgiou, P., Tan, E., Gouvas, N., Antoniou, A., Brown, G., Nicholls, R.J., and Tekkis, P. (2009). Extended lymphadenectomy versus conventional surgery for rectal cancer: a meta-analysis. *The Lancet Oncology* 10, 1053–1062.

Gerard, J.-P. (2006). Preoperative Radiotherapy With or Without Concurrent Fluorouracil and Leucovorin in T3-4 Rectal Cancers: Results of FFCD 9203. *Journal of Clinical Oncology* 24, 4620–4625.

Gérard, J.-P. (2019). Planned organ preservation for early T2-3 rectal adenocarcinoma: A French, multicentre study. *European Journal of Cancer* 16.

Gerard, J.-P., Chapet, O., Nemoz, C., Hartweg, J., Romestaing, P., Coquard, R., Barbet, N., Maingon, P., Mahe, M., Baulieux, J., et al. (2004). Improved Sphincter Preservation in Low Rectal Cancer With High-Dose Preoperative Radiotherapy: The Lyon R96-02 Randomized Trial. *JCO* 22, 2404–2409.

Gérard, J.-P., Myint, A.S., Croce, O., Lindegaard, J., Jensen, A., Myerson, R., Hannoun-Lévi, J.-M., and Marcie, S. (2011). Renaissance of contact x-ray therapy for treating rectal cancer. *Expert Rev. Med. Devices* 10.

Germain, C., Gnjatic, S., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2015). Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* 6, 67.

Ghadimi, B.M. (2005). Effectiveness of Gene Expression Profiling for Response Prediction of Rectal Adenocarcinomas to Preoperative Chemoradiotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 23, 1826–1838.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15, 1170–1178.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pagès, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., et al. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* 21, 3031–3040.

Giralt, J., de las Heras, M., Cerezo, L., Eraso, A., Hermosilla, E., Velez, D., Lujan, J., Espin, E., Rosello, J., Majó, J., et al. (2005). The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 74, 101–108.

Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The Distinct Contributions of Murine T Cell Receptor (TCR) $\gamma\delta^+$ and TCR $\alpha\beta^+$ T Cells to Different Stages of Chemically Induced Skin Cancer. *Journal of Experimental Medicine* 198, 747–755.

Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rödel, C., Cervantes, A., and Arnold, D. (2017). Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 28, iv22–iv40.

Glynne-Jones, R., Hall, M., and Nagtegaal, I.D. (2020). The optimal timing for the interval to surgery after short course preoperative radiotherapy (5 \times 5 Gy) in rectal cancer - are we too eager for surgery? *Cancer Treatment Reviews* 90, 102104.

Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rödel, C., Cervantes, A., and Arnold, D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*.

Goc, J., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2013). Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology* 2, e26836.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8 $^+$ T cells. *Cancer Res* 74, 705–715.

Goedegebuure, R.S.A., Harrasser, M., de Klerk, L.K., van Schooten, T.S., van Grieken, N.C.T., Eken, M., Grifhorst, M.S., Pocorni, N., Jordanova, E.S., van Berge Henegouwen, M.I., et al. (2021). Pre-treatment tumor-infiltrating T cells influence response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 10, 1954807.

Granier, C., Dariane, C., Combe, P., Verkarre, V., Urien, S., Badoual, C., Roussel, H., Mandavit, M., Ravel, P., Sibony, M., et al. (2017). Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1 $^+$ CD8 $^+$ T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 77, 1075–1082.

Groth, A., Klöss, S., von Strandmann, E.P., Koehl, U., and Koch, J. (2011). Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *J Innate*

Immun 3, 344–354.

Group, Q.C. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *The Lancet* 370, 2020–2029.

Guallar-Garrido, S., and Julián, E. (2020). Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. *Immunotargets Ther* 9, 1–11.

Guan, Y., Kraus, S.G., Quaney, M.J., Daniels, M.A., Mitchem, J.B., and Teixeira, E. (2020). FOLFOX Chemotherapy Ameliorates CD8 T Lymphocyte Exhaustion and Enhances Checkpoint Blockade Efficacy in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology* 10, 586.

Guil-Luna, S., Mena, R., Navarrete-Sirvent, C., López-Sánchez, L.M., Khoudri, K., Toledano-Fonseca, M., Mantrana, A., Guler, I., Villar, C., Díaz, C., et al. (2020). Association of Tumor Budding With Immune Evasion Pathways in Primary Colorectal Cancer and Patient-Derived Xenografts. *Front Med (Lausanne)* 7, 264.

Haak, H.E., Maas, M., Trebeschi, S., and Beets-Tan, R.G.H. (2020). Modern MR Imaging Technology in Rectal Cancer; There Is More Than Meets the Eye. *Frontiers in Oncology* 10, 2037.

Habr-Gama, A., Perez, R.O., Nadalin, W., Sabbaga, J., Ribeiro, U., Silva e Sousa, A.H., Campos, F.G., Kiss, D.R., and Gama-Rodrigues, J. (2004). Operative Versus Nonoperative Treatment for Stage 0 Distal Rectal Cancer Following Chemoradiation Therapy: Long-term Results. *Transactions of the ... Meeting of the American Surgical Association CXXII*, 309–316.

Habr-Gama, A., Perez, R.O., Nadalin, W., Nahas, S.C., Ribeiro, U., Silva e Sousa, A.H., Campos, F.G., Kiss, D.R., and Gama-Rodrigues, J. (2005). Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg* 9, 90–99; discussion 99–101.

Habrgama, A., Perez, R., Proscurshim, I., Campos, F., Nadalin, W., Kiss, D., and Gamarodrigues, J. (2006). Patterns of Failure and Survival for Nonoperative Treatment of Stage c0 Distal Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiation Therapy. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 10, 1319–1329.

Habr-Gama, A.M.D., Perez, R.O.M.D., Sabbaga, J.M.D., Nadalin, W.M.D., Sao Juliao, G.P.M.D., and Gama-Rodrigues, J.M.D. (2009). Increasing the Rates of Complete Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Distal Rectal Cancer: Results of a Prospective Study Using Additional Chemotherapy During the Resting Period. *Diseases of the Colon & Rectum* 52, 1927–1934.

Handley, W.S. (1911). Retrospect of Medicine: The Fringes of the Cancer Problem. *Can Med Assoc J* 1, 903–905.

Hanna, N., and Burton, R.C. (1981). Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo. *J Immunol* 127, 1754–1758.

Hanna, C.R., O’Cathail, S.M., Graham, J.S., Saunders, M., Samuel, L., Harrison, M., Devlin, L., Edwards, J., Gaya, D.R., Kelly, C.A., et al. (2021). Durvalumab (MEDI 4736) in combination with extended neoadjuvant regimens in rectal cancer: a study protocol of a randomised phase II trial (PRIME-RT). *Radiat Oncol* 16, 163.

Harter, P., Sehouli, J., Lorusso, D., Reuss, A., Vergote, I., Marth, C., Kim, J.-W., Raspagliesi, F., Lampe, B., Aletti, G., et al. (2019). A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *New England Journal of Medicine* 380, 822–832.

Heald, R.J. (1979). A new approach to rectal cancer. *Br J Hosp Med* 22, 277–281.

Heald, R.J., Husband, E.M., and Ryall, R.D.H. (1982). The mesorectum in rectal cancer surgery—the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 69, 613–616.

Hecht, M., Büttner-Herold, M., Erlenbach-Wünsch, K., Haderlein, M., Croner, R., Grützmann, R., Hartmann, A., Fietkau, R., and Distel, L.V. (2016). PD-L1 is upregulated by radiochemotherapy in rectal adenocarcinoma patients and associated with a favourable

prognosis. *European Journal of Cancer* 65, 52–60.

Hérin, M., Lemoine, C., Weynants, P., Vessière, F., Van Pel, A., Boon, T., Knuth, A., and Devos, R. (1987). Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int. J. Cancer* 39, 390–396.

Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1089–1099.

Hirakawa, S., Brown, L.F., Kodama, S., Paavonen, K., Alitalo, K., and Detmar, M. (2006). VEGF-C–induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 109, 1010–1017.

Houg, D.S., and Bijlsma, M.F. (2018). The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer* 17, 95.

Hu, W., Li, X., Zhang, C., Yang, Y., Jiang, J., and Wu, C. (2016). Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol* 18, 251–258.

Huang, Y., Lou, X., Zhu, Y., Wang, Y., Zhang, L., Liu, H., Wang, C., Zhan, H., Cheng, Z., Tan, W., et al. (2019). Local environment in biopsy better predict the pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Bioscience Reports* 39.

Huh, J.W., Kim, H.R., and Kim, Y.J. (2013). Clinical prediction of pathological complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 56, 698–703.

Huisman, J.F., Schoenaker, I.J.H., Brohet, R.M., Reerink, O., van der Sluis, H., Moll, F.C.P., de Boer, E., de Graaf, J.C., de Vos tot Nederveen Cappel, W.H., Beets, G.L., et al. (2020). Avoiding Unnecessary Major Rectal Cancer Surgery by Implementing Structural Restaging and a Watch-and-Wait Strategy After Neoadjuvant Radiochemotherapy. *Ann Surg Oncol*.

Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., and Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer* 125, 171–180.

Inamori, K., Togashi, Y., Fukuoka, S., Akagi, K., Ogasawara, K., Irie, T., Motooka, D., Kobayashi, Y., Sugiyama, D., Kojima, M., et al. (2021). Importance of lymph node immune responses in MSI-H/dMMR colorectal cancer. *JCI Insight* 6.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–583.

Jacob Bickels, M.D., Yehuda Kollender, M.D., Ofer Merinsky, M.D., and Isaac Meller, M.D. (2002). *Medical Archaeology Coley’s toxin: Historical Perspective*.

Jaffray, D.A. (2012). Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 688–699.

Jakobsen, A., Ploen, J., Vuong, T., Appelt, A., Lindebjerg, J., and Rafaelsen, S.R. (2012). Dose-Effect Relationship in Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: A Randomized Trial Comparing Two Radiation Doses. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics* 84, 949–954.

Jalkanen, S., and Salmi, M. (2020). Lymphatic endothelial cells of the lymph node. *Nature Reviews Immunology*.

Jarnicki, A.G., Lysaght, J., Todryk, S., and Mills, K.H.G. (2006). Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 896–904.

Jass, J.R. (1986). Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *Journal of Clinical Pathology* 39, 585.

Jian, H., Fangrong, S., Haitao, H., Chunhua, L., and Guangbo, Z. (2017). Correction: Th1 high in tumor microenvironment is an indicator of poor prognosis for patients with NSCLC. *Oncotarget* 8, 39936–39936.

Jiang, X., Clark, R.A., Liu, L., Wagers, A.J., Fuhlbrigge, R.C., and Kupper, T.S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227–231.

Jin, J.Y., Hu, C., Xiao, Y., Zhang, H., Ellsworth, S., Schild, S.E., Bogart, J.A., Dobelbower, M.C., Kavadi, V.S., Narayan, S., et al. (2017). Higher Radiation Dose to Immune System is Correlated With Poorer Survival in Patients With Stage III Non-small Cell Lung Cancer: A Secondary Study of a Phase 3 Cooperative Group Trial (NRG Oncology RTOG 0617). *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 99, S151–S152.

Junker, K., Thomas, M., Schulmann, K., Klinke, F., Bosse, U., and Müller, K.M. (1997). Tumour regression in non-small-cell lung cancer following neoadjuvant therapy. Histological assessment. *J Cancer Res Clin Oncol* 123, 469–477.

Kachikwu, E.L., Iwamoto, K.S., Liao, Y.-P., DeMarco, J.J., Agazaryan, N., Economou, J.S., McBride, W.H., and Schae, D. (2011). Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 81, 1128–1135.

Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Putter, H., Steup, W.H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Pahlman, L., Glimelius, B., van Krieken, J.H.J., et al. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *New England Journal of Medicine* 345, 638–646.

Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827.

Karoui, M., Rullier, A., Piessen, G., Legoux, J.L., Barbier, E., De Chaisemartin, C., Lecaille, C., Bouche, O., Ammarguellat, H., Brunetti, F., et al. (2020). Perioperative FOLFOX 4 Versus FOLFOX 4 Plus Cetuximab Versus Immediate Surgery for High-Risk Stage II and III Colon Cancers: A Phase II Multicenter Randomized Controlled Trial (PRODIGE 22). *Annals of Surgery* 271, 637–645.

Kemp, R.A., Black, M.A., McCall, J., Yoon, H.-S., Phillips, V., Anjomshoaa, A., and Reeve, A.E. (2011). T cell subpopulations in lymph nodes may not be predictive of patient outcome in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30, 78.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257.

Klein, G. (1966). Tumor Antigens. *Annual Review of Microbiology* 20, 223–252.

Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 721–728.

Kohrt, H.E., Nouri, N., Nowels, K., Johnson, D., Holmes, S., and Lee, P.P. (2005). Profile of Immune Cells in Axillary Lymph Nodes Predicts Disease-Free Survival in Breast Cancer. *PLoS Medicine* 2, e284.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., et al. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114, 1141–1149.

L J Old, and Boyse, and E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annual Review of Medicine* 15, 167–186.

Ladbury, C.J., Rusthoven, C.G., Camidge, D.R., Kavanagh, B.D., and Nath, S.K. (2019). Impact of Radiation Dose to the Host Immune System on Tumor Control and Survival for

Stage III Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Definitive Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 105, 346–355.

Lambregts, D.M.J., Boellaard, T.N., and Beets-Tan, R.G.H. (2019). Response evaluation after neoadjuvant treatment for rectal cancer using modern MR imaging: a pictorial review. *Insights Imaging* 10, 15.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372, 2509–2520.

Li, J., Yuan, J., Liu, H., Yin, J., Liu, S., Du, F., Hu, J., Li, C., Niu, X., Lv, B., et al. (2016). Lymph nodes regression grade is a predictive marker for rectal cancer after neoadjuvant therapy and radical surgery. *Oncotarget* 7, 16975–16984.

Liska, V., Vycital, O., Daum, O., Novak, P., Treska, V., Bruha, J., Pitule, P., and Holubec, L. (2012). Infiltration of Colorectal Carcinoma by S100+ Dendritic Cells and CD57+ Lymphocytes as Independent Prognostic Factors after Radical Surgical Treatment. *Anticancer Research* 32, 2129–2132.

Liu, F.L., Lin, J.J., Ye, F., and Teng, L.S. (2010). Hand-assisted laparoscopic surgery versus the open approach in curative resection of rectal cancer. *J Int Med Res* 38, 916–922.

Loi, S., Symmans, W.F., Bartlett, J.M., Fumagalli, D., Veer, L.V., Forbes, J.F., Bedard, P., Denkert, C., Zujewski, J., Viale, G., et al. (2011). Proposals for uniform collection of biospecimens from neoadjuvant breast cancer clinical trials: timing and specimen types. *The Lancet Oncology* 12, 1162–1168.

Lopes-Ramos, C., Koyama, F.C., Habr-Gama, A., Salim, A.C.M., Bettoni, F., Asprino, P.F., França, G.S., Gama-Rodrigues, J., Parmigiani, R.B., Perez, R.O., et al. (2015). Comprehensive evaluation of the effectiveness of gene expression signatures to predict complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and guide surgical intervention in rectal cancer. *Cancer Genetics* 208, 319–326.

López-Campos, F., Martín-Martín, M., Fornell-Pérez, R., García-Pérez, J.C., Die-Trill, J., Fuentes-Mateos, R., López-Durán, S., Domínguez-Rullán, J., Ferreiro, R., Riquelme-Oliveira, A., et al. (2020). Watch and wait approach in rectal cancer: Current controversies and future directions. *World J Gastroenterol* 26, 4218–4239.

Lorenzen, S., Biederstädt, A., Ronellenfitsch, U., Reißfelder, C., Mönig, S., Wenz, F., Pauligk, C., Walker, M., Al-Batran, S.-E., Haller, B., et al. (2020). RACE-trial: neoadjuvant radiochemotherapy versus chemotherapy for patients with locally advanced, potentially resectable adenocarcinoma of the gastroesophageal junction - a randomized phase III joint study of the AIO, ARO and DGAV. *BMC Cancer* 20, 1–9.

Lores-Vazquez, B., Pacheco-Carracedo, M., Oliver-Morales, J., Parada-Gonzalez, P., and Gambón-Deza, F. (1996). Lymphocyte subpopulations of regional lymph nodes in human colon and gastric adenocarcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 42, 339–342.

Lund, A.W., Duraes, F.V., Hirosue, S., Raghavan, V.R., Nembrini, C., Thomas, S.N., Issa, A., Hugues, S., and Swartz, M.A. (2012). VEGF-C promotes immune tolerance in B16 melanomas and cross-presentation of tumor antigen by lymph node lymphatics. *Cell Rep* 1, 191–199.

Lv, L., Pan, K., Li, X., She, K., Zhao, J., Wang, W., Chen, J., Chen, Y., Yun, J., and Xia, J. (2011). The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 6, e18219.

Ma, Q., Dieterich, L.C., and Detmar, M. (2018). Multiple roles of lymphatic vessels in tumor progression. *Current Opinion in Immunology* 53, 7–12.

Ma, Y., Kepp, O., Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Aymeric, L., Locher, C., Tesniere, A., Martins, I., Ly, A., Haynes, N.M., et al. (2010). Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Semin Immunol* 22, 113–124.

Maas, M., Beets-Tan, R.G.H., Lambregts, D.M.J., Lammering, G., Nelemans, P.J., Engelen, S.M.E., van Dam, R.M., Jansen, R.L.H., Sosef, M., Leijtens, J.W.A., et al. (2011). Wait-and-See Policy for Clinical Complete Responders After Chemoradiation for Rectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 29, 4633–4640.

Maas, M., Lambregts, D.M.J., Nelemans, P.J., Heijnen, L.A., Martens, M.H., Leijtens, J.W.A., Sosef, M., Hulsewé, K.W.E., Hoff, C., Breukink, S.O., et al. (2015). Assessment of Clinical Complete Response After Chemoradiation for Rectal Cancer with Digital Rectal Examination, Endoscopy, and MRI: Selection for Organ-Saving Treatment. *Ann Surg Oncol* 22, 3873–3880.

Mai, V., and Stine, O.C. (2015). Bowel preparation for colonoscopy: relevant for the gut's microbiota? *Gut* 64, 1504–1505.

Makena, M.R., Ranjan, A., Thirumala, V., and Reddy, A.P. (2018). Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 165339.

Maréchal, R., Vos, B., Polus, M., Delaunoit, T., Peeters, M., Demetter, P., Hendlisz, A., Demols, A., Franchimont, D., Verset, G., et al. (2012). Short course chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in locally advanced rectal cancer: a randomized multicentric phase II study. *Annals of Oncology* 23, 1525–1530.

Marliot, F., Chen, X., Kirilovsky, A., Sbarato, T., Sissy, C.E., Batista, L., Eynde, M.V. den, Haicheur-Adjouri, N., Anitei, M.-G., Musina, A.-M., et al. (2020). Analytical validation of the Immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. *J Immunother Cancer* 8, e000272.

Martins, F., Sofiya, L., Sykiotis, G.P., Lamine, F., Maillard, M., Fraga, M., Shabafrouz, K., Ribí, C., Cairolí, A., Guex-Crosier, Y., et al. (2019). Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 563–580.

Maru, Y. (2015). The lung metastatic niche. *J Mol Med* 93, 1185–1192.

Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., et al. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 207, 553–564.

Matsumura, S., Wang, B., Kawashima, N., Braunstein, S., Badura, M., Cameron, T.O., Babb, J.S., Schneider, R.J., Formenti, S.C., Dustin, M.L., et al. (2008). Radiation-Induced CXCL16 Release by Breast Cancer Cells Attracts Effector T Cells. *The Journal of Immunology* 181, 3099–3107.

Matsutani, S., Shibutani, M., Maeda, K., Nagahara, H., Fukuoka, T., Nakao, S., Hirakawa, K., and Ohira, M. (2018). Significance of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Cancer Science* 109, 966–979.

McCarthy, E.F. (2006). The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop J* 26, 154–158.

McCoy, M.J., Hemmings, C., Anyaegbu, C.C., Austin, S.J., Lee-Pullen, T.F., Miller, T.J., Bulsara, M.K., Zeps, N., Nowak, A.K., Lake, R.A., et al. (2017). Tumour-infiltrating regulatory T cell density before neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer does not predict treatment response. *Oncotarget* 8, 19803–19813.

McLaughlin, M., Patin, E.C., Pedersen, M., Wilkins, A., Dillon, M.T., Melcher, A.A., and Harrington, K.J. (2020). Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 20, 203–217.

Medina-Echeverz, J., Haile, L.A., Zhao, F., Gamrekashvili, J., Ma, C., Métails, J.-Y., Dunbar, C.E., Kapoor, V., Manns, M.P., Korangy, F., et al. (2014). IFN- γ regulates survival and function of tumor-induced CD11b⁺ Gr-1^{high} myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1. *Eur J Immunol* 44, 2457–2467.

Meltzer, A. (1990). Dormancy and breast cancer. *J Surg Oncol* 43, 181–188.

Messaoudene, M., Périer, A., Fregni, G., Neves, E., Zitvogel, L., Cremer, I., Chanal, J., Sastre-Garau, X., Deschamps, L., Marinho, E., et al. (2015). Characterization of the Microenvironment in Positive and Negative Sentinel Lymph Nodes from Melanoma Patients. *PLoS One* *10*, e0133363.

Milinis, K., Thornton, M., Montazeri, A., and Rooney, P.S. (2015). Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Is it needed? *World J Clin Oncol* *6*, 225–236.

Miller, E.D., Robb, B.W., Cummings, O.W., and Johnstone, P.A.S. (2012). The effects of preoperative chemoradiotherapy on lymph node sampling in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* *55*, 1002–1007.

Minsky, B.D. (2019). Emerging trends in the treatment of rectal cancer. *Acta Oncol* *58*, 1343–1351.

Mirbagheri, N., Kumar, B., Deb, S., Poh, B.R., Dark, J.G., Leow, C.C., and Teoh, W.M.K. (2014). Lymph node status as a prognostic indicator after preoperative neoadjuvant chemoradiotherapy of rectal cancer. *Colorectal Disease* *16*, O339–O346.

Mirjolet, C., Charon-Barra, C., Ladoire, S., Arbez-Gindre, F., Bertaut, A., Ghiringhelli, F., Leroux, A., Peiffert, D., Borg, C., Bosset, J.F., et al. (2018). Tumor lymphocyte immune response to preoperative radiotherapy in locally advanced rectal cancer: The LYMPHOREC study. *Oncoimmunology* *7*, e1396402.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pages, F., et al. (2011). Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *Journal of Clinical Oncology* *29*, 610–618.

Mlecnik, B., Bindea, G., Kirilovsky, A., Angell, H.K., Obenauf, A.C., Tosolini, M., Church, S.E., Maby, P., Vasaturo, A., Angelova, M., et al. (2016a). The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* *8*, 327ra26.

Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S.E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., et al. (2016b). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* *44*, 698–711.

Mole, R.H. (1953). Whole Body Irradiation—Radiobiology or Medicine? *BJR* *26*, 234–241.

Molodtsov, A.K., Khatwani, N., Vella, J.L., Lewis, K.A., Zhao, Y., Han, J., Sullivan, D.E., Searles, T.G., Preiss, N.K., Shabaneh, T.B., et al. (2021). Resident memory CD8⁺ T cells in regional lymph nodes mediate immunity to metastatic melanoma. *Immunity* *54*, 2117–2132.e7.

Mukhopadhyay, S., Feldman, M.D., Abels, E., Ashfaq, R., Beltaifa, S., Cacciabeve, N.G., Cathro, H.P., Cheng, L., Cooper, K., Dickey, G.E., et al. (2018). Whole Slide Imaging Versus Microscopy for Primary Diagnosis in Surgical Pathology: A Multicenter Blinded Randomized Noninferiority Study of 1992 Cases (Pivotal Study). *Am J Surg Pathol* *42*, 39–52.

Nagata, N., Tohya, M., Fukuda, S., Suda, W., Nishijima, S., Takeuchi, F., Ohsugi, M., Tsujimoto, T., Nakamura, T., Shimomura, A., et al. (2019). Effects of bowel preparation on the human gut microbiome and metabolome. *Sci Rep* *9*, 4042.

Nagawa, H., Muto, T., Sunouchi, K., Higuchi, Y., Tsurita, G., Watanabe, T., and Sawada, T. (2001). Randomized, controlled trial of lateral node dissection vs. nerve-preserving resection in patients with rectal cancer after preoperative radiotherapy. *Dis Colon Rectum* *44*, 1274–1280.

Nagtegaal, I.D., Marijnen, C.A., Kranenbarg, E.K., Mulder-Stapel, A., Hermans, J., van de Velde, C.J., and van Krieken, J.H.J. (2001). Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has

only a systemic effect—a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer* *1*, 7.

Nagtegaal, I.D., van de Velde, C.J.H., van der Worp, E., Kapiteijn, E., Quirke, P., van Krieken, J.H.J.M., and Cooperative Clinical Investigators of the Dutch Colorectal Cancer Group (2002). Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. *J Clin Oncol* *20*, 1729–1734.

Nam, T.-K., Lee, J.-S., Kim, H.-R., Ahn, S.-J., Song, J.-Y., and Yoon, M.S. (2010). Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by preoperative chemoradiotherapy. *Oncol Lett* *1*, 23–29.

Nearchou, I.P., Lillard, K., Gavriel, C.G., Ueno, H., Harrison, D.J., and Caie, P.D. (2019). Automated Analysis of Lymphocytic Infiltration, Tumor Budding, and Their Spatial Relationship Improves Prognostic Accuracy in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res* *7*, 609–620.

Nersesian, S., Schwartz, S.L., Grantham, S.R., MacLean, L.K., Lee, S.N., Pugh-Toole, M., and Boudreau, J.E. (2020). NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. *Transl Oncol* *14*, 100930.

Ngan, S.Y., Burmeister, B., Fisher, R.J., Solomon, M., Goldstein, D., Joseph, D., Ackland, S.P., Schache, D., McClure, B., McLachlan, S.-A., et al. (2012). Randomized Trial of Short-Course Radiotherapy Versus Long-Course Chemoradiation Comparing Rates of Local Recurrence in Patients With T3 Rectal Cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *JCO* *30*, 3827–3833.

Niazi, M.K.K., Parwani, A.V., and Gurcan, M.N. (2019). Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol* *20*, e253–e261.

Nogué M., Salud A., Vicente P., Arriví A., Roca J.M., Losa F., Ponce J., Safont M.J., Guasch I., Moreno I., et al. (2011). Addition of Bevacizumab to XELOX Induction Therapy Plus Concomitant Capecitabine-Based Chemoradiotherapy in Magnetic Resonance Imaging–Defined Poor-Prognosis Locally Advanced Rectal Cancer: The AVACROSS Study. *The Oncologist* *16*, 614–620.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* *41*, 49–61.

Oba, A., Ho, F., Bao, Q.R., Al-Musawi, M.H., Schulick, R.D., and Del Chiaro, M. (2020). Neoadjuvant Treatment in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology* *10*, 245.

Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ* *14*, 1848–1850.

O’Boyle, S., and Stephenson, K. (2017). More is better: Lymph node harvesting in colorectal cancer. *Am J Surg* *213*, 926–930.

O’Brien, C.L., Allison, G.E., Grimpen, F., and Pavli, P. (2013). Impact of Colonoscopy Bowel Preparation on Intestinal Microbiota. *PLoS One* *8*, e62815.

on behalf of the Rectal Cancer Consortium, Smith, J.J., Chow, O.S., Gollub, M.J., Nash, G.M., Temple, L.K., Weiser, M.R., Guillem, J.G., Paty, P.B., Avila, K., et al. (2015). Organ Preservation in Rectal Adenocarcinoma: a phase II randomized controlled trial evaluating 3-year disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer treated with chemoradiation plus induction or consolidation chemotherapy, and total mesorectal excision or nonoperative management. *BMC Cancer* *15*.

Ott, P.A., Hodi, F.S., and Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin Cancer Res* *19*, 5300–5309.

Overman, M.J., Lonardi, S., Wong, K.Y.M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M.A., Van Cutsem, E., McDermott, R., Hill, A., et al. (2018). Durable Clinical Benefit With

Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 36, 773–779.

Ozpiskin, O.M., Zhang, L., and Li, J.J. (2019). Immune targets in the tumor microenvironment treated by radiotherapy. *Theranostics* 9, 1215–1231.

Padera, T.P., Meijer, E.F.J., and Munn, L.L. (2016). The Lymphatic System in Disease Processes and Cancer Progression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 18, 125–158.

Páez, D., Labonte, M.J., Bohanes, P., Zhang, W., Benhanim, L., Ning, Y., Wakatsuki, T., Loupakis, F., and Lenz, H.-J. (2012). Cancer Dormancy: A Model of Early Dissemination and Late Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res* 18, 645–653.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., et al. (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 353, 2654–2666.

Pages, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27, 5944–5951.

Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102.

Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* 391, 2128–2139.

Paget, S. (1889). THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* 133, 571–573.

Palma, P., Cano, C., Conde-Muiño, R., Comino, A., Bueno, P., Ferrón, J.A., and Cuadros, M. (2014). Expression Profiling of Rectal Tumors Defines Response to Neoadjuvant Treatment Related Genes. *PLOS ONE* 9, e112189.

Peeters, K.C.M.J., Marijnen, C.A.M., Nagtegaal, I.D., Kranenbarg, E.K., Putter, H., Wiggers, T., Rutten, H., Pahlman, L., Glimelius, B., Leer, J.W., et al. (2007). The TME Trial After a Median Follow-up of 6 Years: Increased Local Control But No Survival Benefit in Irradiated Patients With Resectable Rectal Carcinoma. *Annals of Surgery* 246, 693–701.

Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 21, 139–146.

Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplantation Proceedings* 31, 1260–1262.

Penn, I., Halgrimson, C.G., and Starzl, T.E. (1971). De Novo Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients. *Transplant Proc* 3, 773–778.

Perez, K., Safran, H., Sikov, W., Vrees, M., Klipfel, A., Shah, N., Schechter, S., Oldenburg, N., Pricolo, V., Rosati, K., et al. (2017). Complete Neoadjuvant Treatment for Rectal Cancer: The Brown University Oncology Group CONTRE Study. *American Journal of Clinical Oncology* 40, 283–287.

Petitprez, F., Fossati, N., Vano, Y., Freschi, M., Becht, E., Lucianò, R., Calderaro, J., Guédet, T., Lacroix, L., Rancoita, P.M.V., et al. (2019). PD-L1 Expression and CD8+ T-cell Infiltrate are Associated with Clinical Progression in Patients with Node-positive Prostate Cancer. *Eur Urol Focus* 5, 192–196.

Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E.Z., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougoüin, A., et al. (2020). B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* 577, 556–560.

Petrelli, F. (2020). Total Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer: A Systematic Review and

Meta-analysis of Treatment Outcomes. *Annals of Surgery* 271, 440–448.

Pirro, N., Pignodel, C., Cathala, P., Fabbro-Peray, P., Godlewski, G., and Prudhomme, M. (2008). The number of lymph nodes is correlated with mesorectal morphometry. *Surg Radiol Anat* 30, 297–302.

Pirro, N., Sielezneff, I., Ouaisi, M., and Sastre, B. (2009). Que savons-nous du drainage lymphatique du rectum ? *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 33, 138–146.

Postow, M.A., Callahan, M.K., Barker, C.A., Yamada, Y., Yuan, J., Kitano, S., Mu, Z., Rasalan, T., Adamow, M., Ritter, E., et al. (2012). Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *New England Journal of Medicine* 366, 925–931.

Probst, C.P., Becerra, A.Z., Aquina, C.T., Tejani, M.A., Wexner, S.D., Garcia-Aguilar, J., Remzi, F.H., Dietz, D.W., Monson, J.R.T., and Fleming, F.J. (2015). Extended Intervals after Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer: The Key to Improved Tumor Response and Potential Organ Preservation. *Journal of the American College of Surgeons* 221, 430–440.

van Pul, K.M., Fransen, M.F., van de Ven, R., and de Gruijl, T.D. (2021). Immunotherapy Goes Local: The Central Role of Lymph Nodes in Driving Tumor Infiltration and Efficacy. *Frontiers in Immunology* 12, 518.

Punt, S., Fleuren, G.J., Kritikou, E., Lubberts, E., Trimbos, J.B., Jordanova, E.S., and Gorter, A. (2015). Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology* 4, e984539.

Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 4, 627–630.

QUASAR Collaborative Group (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *The Lancet* 370, 2020–2029.

Quezada-Marín, J.I., Lam, A.K., Ochiai, A., Odze, R.D., Washington, K.M., Fukayama, M., Rugge, M., Klimstra, D.S., Nagtegaal, I.D., Tan, P.-H., et al. (2020). Gastrointestinal tissue-based molecular biomarkers: a practical categorisation based on the 2019 World Health Organization classification of epithelial digestive tumours. *Histopathology* 77, 340–350.

Rahma, O.E., Yothers, G., Hong, T.S., Russell, M.M., You, Y.N., Parker, W., Jacobs, S.A., Colangelo, L.H., Lucas, P.C., Gollub, M.J., et al. (2021). Use of Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Initial Results From the Pembrolizumab Arm of a Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* 7, 1225–1230.

Recamier, J. (1829). *Recherches sur le traitement du cancer, par la compression methodique simple ou combinee, sur l’histoire generale de la meme maladie.* par Récamier.

Redelman-Sidi, G., Glickman, M.S., and Bochner, B.H. (2014). The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nature Reviews Urology* 11, 153–162.

Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., Groothuis, T.A., Chakraborty, M., K.Wansley, E., Camphausen, K., Luiten, R.M., de Ru, A.H., Neijssen, J., et al. (2006). Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *Journal of Experimental Medicine* 203, 1259–1271.

Ren, G., Esposito, M., and Kang, Y. (2015). Bone metastasis and the metastatic niche. *J Mol Med* 93, 1203–1212.

Reynders, K., Illidge, T., Siva, S., Chang, J.Y., and De Ruyscher, D. (2015). The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treatment Reviews* 41, 503–510.

Ries, C.H., Cannarile, M.A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L.P., Feuerhake, F., Klaman, I., et al. (2014). Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer*

Cell 25, 846–859.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.

Rouhani, S.J., Eccles, J.D., Tewalt, E.F., and Engelhard, V.H. (2014). Regulation of T-cell Tolerance by Lymphatic Endothelial Cells. *J Clin Cell Immunol* 5, 1000242.

Rullier, E., Rouanet, P., Tuech, J.-J., Valverde, A., Lelong, B., Rivoire, M., Faucheron, J.-L., Jafari, M., Portier, G., Meunier, B., et al. (2017). Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet* 390, 469–479.

Rullier, E., Vendrely, V., Asselineau, J., Rouanet, P., Tuech, J.-J., Valverde, A., de Chaisemartin, C., Rivoire, M., Trilling, B., Jafari, M., et al. (2020). Organ preservation with chemoradiotherapy plus local excision for rectal cancer: 5-year results of the GRECCAR 2 randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 465–474.

Russick, J., Torset, C., Hemery, E., and Cremer, I. (2020). NK cells in the tumor microenvironment: Prognostic and theranostic impact. Recent advances and trends. *Seminars in Immunology* 48, 101407.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.

Saltzman, J.R., Cash, B.D., Pasha, S.F., Early, D.S., Muthusamy, V.R., Khashab, M.A., Chathadi, K.V., Fanelli, R.D., Chandrasekhara, V., Lightdale, J.R., et al. (2015). Bowel preparation before colonoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* 81, 781–794.

Sammour, T., Kahokehr, A., Chan, S., Booth, R.J., and Hill, A.G. (2010). The humoral response after laparoscopic versus open colorectal surgery: a meta-analysis. *J Surg Res* 164, 28–37.

Sanghera, P., Wong, D.W.Y., McConkey, C.C., Geh, J.I., and Hartley, A. (2008). Chemoradiotherapy for Rectal Cancer: An Updated Analysis of Factors Affecting Pathological Response. *Clinical Oncology* 20, 176–183.

Santambrogio, L., Berendam, S.J., and Engelhard, V.H. (2019). The Antigen Processing and Presentation Machinery in Lymphatic Endothelial Cells. *Frontiers in Immunology* 10, 1033.

Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., et al. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38, 187–197.

Sauer, I., and Bacon, H.E. (1952). A new approach for excision of carcinoma of the lower portion of the rectum and anal canal. *Surg Gynecol Obstet* 95, 229–242.

Sauer, R., Fietkau, R., Wittekind, C., Rödel, C., Martus, P., Hohenberger, W., Tschmelitsch, J., Sabitzer, H., Karstens, J.-H., Becker, H., et al. (2003). Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis* 5, 406–415.

Schaue, D., and McBride, W.H. (2010). Links between innate immunity and normal tissue radiobiology. *Radiat Res* 173, 406–417.

Schaue, D., Ratikan, J.A., Iwamoto, K.S., and McBride, W.H. (2012). Maximizing Tumor Immunity With Fractionated Radiation. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 83, 1306–1310.

Schenkel, J.M., Fraser, K.A., and Masopust, D. (2014). Cutting edge: resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 192, 2961–2964.

Schmid, P., Adams, S., Rugo, H.S., Schneeweiss, A., Barrios, C.H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Wright, G.S., et al. (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in

Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*.

Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L.S., and Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 27, 31–39.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.

Sendoya, J.M., Iseas, S., Coraglio, M., Golubicki, M., Robbio, J., Salanova, R., Kujaruk, M., Mikolaitis, V., Rizzolo, M., Ruiz, G., et al. (2020). Pre-Existing Tumoral B Cell Infiltration and Impaired Genome Maintenance Correlate with Response to Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers* 12, 2227.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.

Sharabi, A.B., Lim, M., DeWeese, T.L., and Drake, C.G. (2015). Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *The Lancet Oncology* 16, e498–e509.

Shayan, R., Achen, M.G., and Stacker, S.A. (2006). Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* 27, 1729–1738.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A., and Jemal, A. (2020). Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 145–164.

Sleeman, J.P., and Thiele, W. (2009). Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer* 125, 2747–2756.

Smith, N.J., Bees, N., Barbachano, Y., Norman, A.R., Swift, R.I., and Brown, G. (2007). Preoperative computed tomography staging of nonmetastatic colon cancer predicts outcome: implications for clinical trials. *Br J Cancer* 96, 1030–1036.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 661–668.

Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13, 459–463.

Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C.M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., et al. (2011). A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 2254–2265.

Stearns, M.W., and Deddish, M.R. (1959). Five-year results of abdominopelvic lymph node dissection for carcinoma of the rectum. *Diseases of the Colon & Rectum* 2, 169–172.

Stoll, G., Bindea, G., Mlecnik, B., Galon, J., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Meta-analysis of organ-specific differences in the structure of the immune infiltrate in major malignancies. *Oncotarget* 6, 11894–11909.

Stone, H.B., Peters, L.J., and Milas, L. (1979). Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 63, 1229–1235.

Sun Myint, A., Smith, F.M., Gollins, S.W., Wong, H., Rao, C., Whitmarsh, K., Sripadam, R., Rooney, P., Hershman, M.J., Fekete, Z., et al. (2017). Dose escalation using contact X-ray brachytherapy (Papillon) for rectal cancer: does it improve the chance of organ preservation? *Br J Radiol* 90, 20170175.

Svrcek, M., and Fléjou, J.-F. (2012). Le « tumor budding » ou bourgeonnement tumoral dans les cancers colorectaux. *Cancérologie*.

Szynglarewicz, B., Matkowski, R., Suder, E., Sydor, D., Forgacz, J., Pudełko, M., and

Grzebieniak, Z. (2007). Predictive value of lymphocytic infiltration and character of invasive margin following total mesorectal excision with sphincter preservation for the high-risk carcinoma of the rectum. *Adv Med Sci* 52, 159–163.

Taal, B.G., Van Tinteren, H., and Zoetmulder, F.A.N. (2001). Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer* 85, 1437–1443.

Taieb, J., Tabernero, J., Mini, E., Subtil, F., Folprecht, G., Van Laethem, J.-L., Thaler, J., Bridgewater, J., Petersen, L.N., Blons, H., et al. (2014). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15, 862–873.

Takahashi, Y., Soh, J., Shien, K., Yamamoto, H., Yamane, M., Kiura, K., Kanazawa, S., Yanai, H., and Toyooka, S. (2020). Fibrosis or Necrosis in Resected Lymph Node Indicate Metastasis Before Chemoradiotherapy in Lung Cancer Patients. *Anticancer Res* 40, 4419–4423.

Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13, 739–752.

Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J., and Starkey, J.R. (1980). Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* 284, 622–624.

Tam, S.Y., and Wu, V.W.C. (2019). A Review on the Special Radiotherapy Techniques of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 9.

Tartour, E., Gey, A., Sastre-Garau, X., Lombard Surin, I., Mosseri, V., and Fridman, W.H. (1998). Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 90, 287–294.

Tartour, E., Pere, H., Maillere, B., Terme, M., Merillon, N., Taieb, J., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Lacerda, K., Karadimou, A., et al. (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 30, 83–95.

Teng, F., Mu, D., Meng, X., Kong, L., Zhu, H., Liu, S., Zhang, J., and Yu, J. (2015a). Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) before and after neoadjuvant chemoradiotherapy and its clinical utility for rectal cancer. *American Journal of Cancer Research* 5, 2064.

Teng, F., Meng, X., Kong, L., Mu, D., Zhu, H., Liu, S., Zhang, J., and Yu, J. (2015b). Tumor-infiltrating lymphocytes, forkhead box P3, programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 expressions before and after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Translational Research* 166, 721-732.e1.

Tewalt, E.F., Cohen, J.N., Rouhani, S.J., Guidi, C.J., Qiao, H., Fahl, S.P., Conaway, M.R., Bender, T.P., Tung, K.S., Vella, A.T., et al. (2012). Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood* 120, 4772–4782.

Tham, M., Khoo, K., Yeo, K.P., Kato, M., Prevost-Blondel, A., Angeli, V., and Abastado, J.-P. (2015). Macrophage depletion reduces postsurgical tumor recurrence and metastatic growth in a spontaneous murine model of melanoma. *Oncotarget* 6, 22857–22868.

Thomas, L. (1959). *Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitivity*. Lawrence HS, Editor. New York: Hoeber-Harper.

Thome, J.J.C., Yudanin, N., Ohmura, Y., Kubota, M., Grinshpun, B., Sathaliyawala, T., Kato, T., Lerner, H., Shen, Y., and Farber, D.L. (2014). Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell* 159, 814–828.

Thompson, A.M., and Moulder-Thompson, S.L. (2012). Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of Oncology* 23, x231–x236.

Tohme, S., Simmons, R.L., and Tsung, A. (2017). Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. *Cancer Res* 77, 1548–1552.

Toiyama, Y., Inoue, Y., Saigusa, S., Okugawa, Y., Yokoe, T., Tanaka, K., Miki, C., and Kusunoki, M. (2010). Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22, 272–280.

Topor, B., Acland, R., Kolodko, V., and Galandiuk, S. (2003). Mesorectal Lymph Nodes: Their Location and Distribution Within the Mesorectum. *Diseases of the Colon & Rectum* 46, 779–785.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res* 71, 1263–1271.

Traversari, C., van der Bruggen, P., Van den Eynde, B., Hainaut, P., Lemoine, C., Ohta, N., Old, L., and Boon, T. (1992). Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35, 145–152.

Triki, H., Charfi, S., Bouzidi, L., Ben Kridis, W., Daoud, J., Chaabane, K., Sellami-Boudawara, T., Rebai, A., and Cherif, B. (2019). CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sciences* 231, 116543.

Tsao, H., Cosimi, A.B., and Sober, A.J. (1997). Ultra-late recurrence (15 years or longer) of cutaneous melanoma. *Cancer* 79, 2361–2370.

Turner, M.C., Keenan, J.E., Rushing, C.N., Gulack, B.C., Nussbaum, D.P., Benrashid, E., Hyslop, T., Strickler, J.H., Mantyh, C.R., and Migaly, J. (2019). Adjuvant Chemotherapy Improves Survival Following Resection of Locally Advanced Rectal Cancer with Pathologic Complete Response. *J Gastrointest Surg* 23, 1614–1622.

Twyman-Saint Victor, C., Rech, A.J., Maity, A., Rengan, R., Pauken, K.E., Stelekati, E., Benci, J.L., Xu, B., Dada, H., Odorizzi, P.M., et al. (2015). Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* 520, 373–377.

Valentini, V., Aristei, C., Glimelius, B., Minsky, B.D., Beets-Tan, R., Borrás, J.M., Haustermans, K., Maingon, P., Overgaard, J., Pahlman, L., et al. (2009). Multidisciplinary Rectal Cancer Management: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (EURECA-CC2). *Radiotherapy and Oncology* 92, 148–163.

van der Valk, M.J.M., Hilling, D.E., Bastiaannet, E., Meershoek-Klein Kranenburg, E., Beets, G.L., Figueiredo, N.L., Habr-Gama, A., Perez, R.O., Renehan, A.G., van de Velde, C.J.H., et al. (2018). Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWW): an international multicentre registry study. *Lancet* 391, 2537–2545.

Verjans, R., Bruggink, A.H., Kibbelaar, R., Bart, J., Debernardi, A., Schaaïj-Visser, T.B.M., Willems, S.M., and Van Kemenade, F.J. (2021). The Dutch National TissueArchive Portal enables efficient, consistent, and transparent procurement of diagnostic tissue samples for scientific use. *Cell Tissue Bank*.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.

de Visser, K.E., Korets, L.V., and Coussens, L.M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423.

Vuik, F.E., Nieuwenburg, S.A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M.J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M.F., et al. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut* 68, 1820–1826.

Wang, M., Herbst, R.S., and Boshoff, C. (2021). Toward personalized treatment approaches

for non-small-cell lung cancer. *Nat Med* 27, 1345–1356.

Watanabe, S., Deguchi, K., Zheng, R., Tamai, H., Wang, L.-X., Cohen, P.A., and Shu, S. (2008). Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *J Immunol* 181, 3291–3300.

Webb, T.J., Yuan, W., Meyer, E., and Dellabona, P. (2020). Editorial: NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 11, 1314.

Weiser, M.R., Beets-Tan, R., and Beets, G. (2014). Management of Complete Response After Chemoradiation in Rectal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 23, 113–125.

Wichmann, M.W., Müller, C., Meyer, G., Strauss, T., Hornung, H.M., Lau-Werner, U., Angele, M.K., and Schildberg, F.W. (2002). Effect of preoperative radiochemotherapy on lymph node retrieval after resection of rectal cancer. *Arch Surg* 137, 206–210.

Wichmann, M.W., Hüttl, T.P., Winter, H., Spelsberg, F., Angele, M.K., Heiss, M.M., and Jauch, K.-W. (2005). Immunological effects of laparoscopic vs open colorectal surgery: a prospective clinical study. *Arch Surg* 140, 692–697.

Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol. Ther.* 64, 529–564.

Woon, H.G., Braun, A., Li, J., Smith, C., Edwards, J., Sierro, F., Feng, C.G., Khanna, R., Elliot, M., Bell, A., et al. (2016). Compartmentalization of Total and Virus-Specific Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells in Human Lymphoid Organs. *PLoS Pathog* 12, e1005799.

Yasuda, K., Nirei, T., Sunami, E., Nagawa, H., and Kitayama, J. (2011). Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiat Oncol* 6, 49.

Yoon, N.K., Maresh, E.L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H.R., et al. (2010). Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol* 41, 1794–1801.

Zeng, W.-G., Liang, J.-W., Wang, Z., Zhang, X.-M., Hu, J.-J., Hou, H.-R., Zhou, H.-T., and Zhou, Z.-X. (2015). Clinical parameters predicting pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Chinese Journal of Cancer* 34, 41.

Zhang, J.-P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.-H., Chen, M.-S., Li, L., Wu, C., Li, S.-P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 50, 980–989.

Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2011). Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 151–160.

Zoso, A., Mazza, E.M.C., Bicciato, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Serafini, P., and Inverardi, L. (2014). Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion. *Eur J Immunol* 44, 3307–3319.

Zurlo, I.V., Schino, M., Strippoli, A., Calegari, M.A., Cocomazzi, A., Cassano, A., Pozzo, C., Di Salvatore, M., Ricci, R., Barone, C., et al. (2021). Predictive value of NLR, TILs (CD4+/CD8+) and PD-L1 expression for prognosis and response to preoperative chemotherapy in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* (1997). Improved Survival with Preoperative Radiotherapy in Resectable Rectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 8.

Annexes

Tableau 11. Classification TNM du cancer du rectum

TX	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-rectaux non péritonisés
T4	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral
T4a	Tumeur perforant le péritoine viscéral
T4b	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
NX	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastase dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoral, satellite(s)* dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non- péritonisés péri-coliques ou péri-rectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2	Métastase dans ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux
N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastase dans ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux
• M0	pas de métastase
• M1	présence de métastase (s) à distance
M1a	Métastase(s) localisée(s) à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) autre que régional)
M1b	Métastases dans plus d'un organe
M1c	Métastases dans le péritoine avec ou sans atteinte d'autres organes

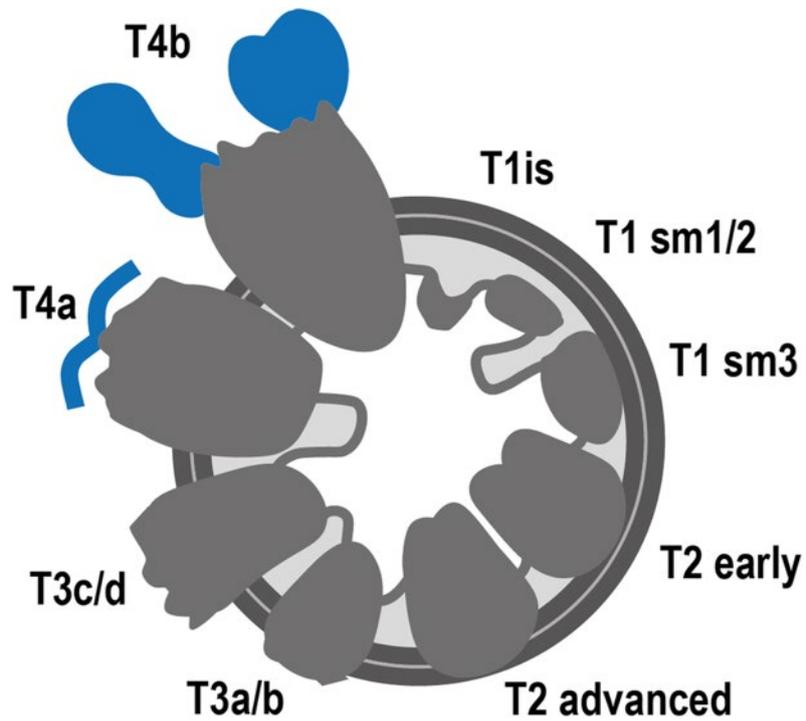


Figure 41. Classification T en IRM : **T1is**: tumeur in situ; **T1sm1/2**: tumeur envahit une partie de la sous-muqueuse; **T1sm3**: envahissement complet de la sous-muqueuse; **T2 early**: envahissement local de la muscularis propria; **T2 advanced**: envahissement complet de la muscularis propria; **T3a**: extension de la tumeur au mésorectum < 1 mm ; **T3b**: extension de la tumeur au mésorectum entre 1 et 5 mm; **T3c**: extension de la tumeur au mésorectum entre 5 et 15 mm; **T3d**: extension de la tumeur au mésorectum > 15 mm; **T4a**: envahissement du péritoine tumeur; **T4b**: envahissement des organes adjacents. D'après Santiago et al. 2020

Ma 3^{ème} année de thèse (Nov 2019- Nov 2020) a été financée par le CARPEM, je pouvais ainsi me libérer à 100% de mes obligations hospitalières sur cette période.

Mais début 2020, nous avons tous vécu une période hors du commun. J'avais entamé depuis Novembre 2019 une collaboration avec l'équipe du Pr Olivier Adotevi dans son équipe INSERM à Besançon afin de caractériser l'infiltrat immunitaire au sein des ganglions de modèles murins de cancer colorectaux traités par radiochimiothérapie en fonction de leur degré de réponse à ce traitement. J'ai suivi la « formation spécifique destinée aux personnes appliquant des procédures expérimentales sur modèles rongeur » et je me suis entraînée à la dissection des ganglions chez la souris grâce au Dr G. Darraze Jeze à la Pitié Salpêtrière. Après 2 séjours dans le laboratoire du Pr Olivier Adotevi à Besançon afin de débiter les expériences, tous les centres de recherches ont fermé. Nous avons tous vécu cette période d'« arrêt sur image ». Je n'ai ainsi malheureusement pas pu faire ce qui était initialement prévu concernant les modèles murins.

Nous avons tous notre part à jouer dans cette épidémie de Covid-19, mon service d'Immunologie à l'Hôpital Georges Pompidou, a ainsi décidé de s'emparer de la thématique du COVID-19. Toutes les forces étaient nécessaires et c'est ainsi que ma thèse a été mise sur « pause » durant cette période afin d'entamer une nouvelle thématique : les désordres immunitaires de la COVID. De cette période « hors du temps », trois articles dont je suis co-signataire ont été publiés et nous avons décidé avec le Pr Franck Pagès de les inclure dans ce manuscrit.

De plus, dès le départ je me suis intéressée au rôle de l'interféron de type I dans le Covid, car des défauts de sécrétion d'interféron de type I avaient été reportés dans les formes graves de SARS et de MERS. Après en avoir discuté avec mon directeur de thèse, le Pr F. Pagès au tout début de l'épidémie, j'ai essayé de suivre mes convictions. J'ai ainsi contacté le Pr Rudragouda Channappanavar (University of Iowa, USA) qui étudie sur modèles animaux les coronavirus (SARS et MERS), nous avons discuté de la possibilité d'un traitement par Interféron chez les patients touchés par le Covid. De fil en aiguille, plusieurs collaborations notamment avec la société Synairgen qui propose une forme nébulisée d'Interféron de type I ont été initiées. Aujourd'hui, l'hôpital Pompidou est un centre d'inclusion de patients dans l'essai de type III de Synairgen proposant aux patients à risque de développer un Covid grave une nébulisation d'interféron.

Dans le service d'Immunologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière, le Dr Clémence Granier a élaboré -en collaboration avec les services de gériatrie et de réanimation- une cohorte de sujets âgés atteints de Covid-19- afin d'étudier par CMF les différences phénotypiques en termes de sénescence des lymphocytes circulants. Nous nous sommes associées et nous avons complété son étude par le suivi des taux de cytokines plasmatiques et présents au niveau de la muqueuse naso-pharyngée -et notamment les interférons de type I et III- chez les patients âgés atteints de différentes formes de Covid-19 (formes réanimatoires, modérées et asymptomatiques). Cela nous a amené à initier des collaborations avec l'Institut Pasteur (Dr Duffy), avec le service de virologie (Dr Péré, Dr Veyer), avec le service de Gériatrie (Pr Paillaud), les réanimations (Pr Diehl), l'unité de recherche clinique de l'hôpital Pitié-Salpêtrière. Nous avons ainsi pu inclure plus de 100 patients dans cette cohorte et nous sommes en cours d'analyses des données collectées.

Cette période COVID est une période qui restera gravée dans nos mémoires tant sur le plan personnel, car nous sommes malheureusement beaucoup à avoir perdus des êtres chers, mais aussi sur le plan professionnel, car nous étions tous « acteurs » à notre échelle.

Article Covid n°1 :

L'incidence des atteintes rénales aiguës est élevée dans les infections à COVID-19. Les étiologies de ces lésions pourraient être secondaires à une nécrose tubulaire aiguë ou à un processus complexe d'activation du complément conduisant à une microangiopathie thrombotique (MAT).

Nous avons analysé l'ensemble des patients adressés au laboratoire pour atteinte rénale de type syndrome hémolytique et urémique (SHU) dans le cadre d'une infection à COVID-19.

De manière intéressante, tous les patients explorés présentaient des anomalies au niveau des protéines de régulation du complément. La caractérisation moléculaire a mis en évidence la présence de variants pathogènes au niveau des gènes du complément précédemment décrit comme associés aux formes atypique de SHU.

Ainsi, la COVID-19 pourrait être un nouveau facteur déclenchant de SHU atypique médié par le complément.



American Society of Hematology
2021 L Street NW, Suite 900,
Washington, DC 20036
Phone: 202-776-0544 | Fax 202-776-0545
editorial@hematology.org

COVID-19 as a potential trigger of complement-mediated atypical HUS.

Tracking no: BLD-2021-012752R3 - CORRECTION

Fadi Fakhouri (UNIL, Switzerland) Véronique FREMEAUX-BACCHI (INSERM, France) Carine El-Sissy (APHP, France) Gilles Kaplanski (INSERM, France) Mickaël Bobot (Assistance Publique - Hôpitaux De Marseille, France) Raphaël Cauchois (AP-HM, France) Hélène Dobosiewicz (APHP, France) Gilbert zanetta (CHU Dijon, France) Christiane Mousson (university hospital dijon, France) Jean-Pierre Venetz (CHUV, Switzerland) Salima Sadallah (CHUV, France) Coralie Poulain (CHU Amiens, France) Paula Vieira-martins (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Service d'Immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges,) Antonin Saldman (APHP, France) Manuel Pascual (University Hospital of Lausanne (CHUV),) Marie koubi (APHM, France) Laurent Daniel (Aix-Marseille Université, France) Samuel Rotman (UNIVERSITY HOSPITAL LAUSANNE (CHUV), Switzerland)

Abstract:

Conflict of interest: COI declared - see note

COI notes: GK received fees from SOBI and Roche for invited lectures. VF-B has received fees from Alexion Pharmaceuticals, Roche, BioCryps and Apellis for invited lectures and/or board membership and is the recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals. FF has received consultancy and/or speaker honoraria from Roche, Alexion, Apellis, Achillion, Novartis and Alnylam.

Preprint server: No;

Author contributions and disclosures: CES, VF-B and FF reviewed the data and drafted the manuscript. CES, PVM, AS, SS and VF-B performed the complement work-up. SR and LD analysed the kidney biopsies. All the authors were involved in the management of the patients. All authors read, commented and revised the manuscript before approval.

Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: Emails to the corresponding author.

Clinical trial registration information (if any):

-

COVID-19 as a potential trigger of complement-mediated atypical HUS.

Carine El Sissy^{1,2}, Antonin Saldman^{1,2}, Gilbert Zanetta³, Paula Vieira Martins¹, Coralie Poulain⁴, Raphaël Cauchois⁵, Gilles Kaplanski^{5,6}, Jean-Pierre Venetz⁷, Mickaël Bobot⁸, Hélène Doboszewicz⁹, Laurent Daniel¹⁰, Marie Koubi⁶, Salima Sadallah¹¹, Samuel Rotman¹², Christiane Mousson³, Manuel Pascual⁷, Véronique Frémeaux-Bacchi^{1,2,13}, and Fadi Fakhouri¹⁴.

1) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Immunologie, Paris, France.

2) Paris University, Paris, France

3) Department of Nephrology-Intensive Care, University Hospital, Dijon, France.

4) Department of Nephrology and Transplantation, Amiens University Hospital, Amiens, France.

5) Hôpitaux de Marseille, CHU de la Conception, Service de Médecine Interne et immunologie clinique, Marseille, France.

6) Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Aix-Marseille Université and C2VN, Inserm U1263, Inrae 1260, Marseille, France.

7) Transplantation Center, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

8) Hôpitaux de Marseille, Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, CHU de la Conception, Marseille, France.

9) Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

10) Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de La Timone, AP-HM, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

11) Service of Immunology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland.

12) Service of Clinical Pathology, Lausanne University Hospital, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

13) Inflammation, Complement and Cancer Team, Cordeliers Research Center, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) S1138, Paris, France

14) Service of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

Running head: COVID-19 and HUS.

Word counts: Text, 1297.

Table count: 2.

Reference count: 22.

Corresponding author:

Fadi Fakhouri

Service of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland.

E mail: fadi.fakhouri@unil.ch

Telephone: +41 213141129

To the Editor:

Endothelial cell (EC) injury has emerged as a hallmark of infection due to acute respiratory coronavirus 2 (SARS-Cov2)¹⁻³. Complement activation or dysregulation is another notable feature of COVID-19^{4,5}, and elevated plasma levels of sC5b-9, a marker of activation of the complement terminal pathway, have been reported in up to 2/3 of COVID-19 patients⁶, and correlate with disease severity^{4,6}.

Complement dysregulation is also a well-established pathogenic mechanism of a rare form of renal thrombotic microangiopathy (TMA), the atypical haemolytic uremic syndrome (aHUS), triggered by complement-induced EC damage⁷.

To date, renal TMA has been very rarely documented in the COVID-19 setting^{8,9}. We report on five patients with COVID-19-associated renal TMA, among whom four tested patients carried complement genetic susceptibility factors for aHUS.

Patients with COVID-19-associated renal TMA were identified using the databases of the French HUS Registry and the Complement reference Centre in Lausanne (Switzerland). COVID-19 infection was diagnosed in all cases, based on a positive polymerase-chain reaction (PCR) test for SARS-CoV-2 in oropharyngeal swab samples. Renal TMA was defined by at least three of the following criteria: a) thrombocytopenia (platelet count < 150 G/L), b) mechanical hemolytical anaemia (Hb < 10 g/dL, lactate dehydrogenase serum level > upper limit of normal (ULN), undetectable haptoglobin, presence of schistocytes on blood smear), c) acute kidney injury (serum creatinine and/or proteinuria/creatininuria > ULN for age or an increase > 15% compared to baseline) and d) features of TMA in kidney biopsy.

Measurement of plasma C3, C4, CH50, Factor H (FH) and I (FI), sC5b-9 and CD46 expression on granulocytes and tests for anti-FH antibodies were performed as previously

described¹⁰. Screening for variants and complex rearrangements in complement factor H (*CFH*), complement factor I (*CFI*), membrane-cofactor protein (*MCP*), *C3* and *Factor B* genes was performed using next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification, as previously described¹⁰. All patients gave informed consent for genetic testing.

Five adult patients with COVID-19-associated renal TMA were identified in five French and Swiss nephrology, renal transplantation and internal medicine units (Table 1 and Supplemental Figure S1). None had a personal or familial history of aHUS. Three patients were renal transplant recipients and the cause of their end-stage kidney failure was focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), IgA nephropathy (n=1) and nephroangiosclerosis (n=1). They presented with a COVID-19-associated renal TMA, 3.5-24 months after renal transplantation. At TMA onset, they were receiving tacrolimus (n=3) and everolimus (n=1) and none had donor specific antibodies. All patients had mild respiratory symptoms of COVID-19 and only one required low-grade oxygen therapy. The interval between COVID-19 diagnosis and TMA diagnosis ranged from 0-30 days. Patients 1, 3 and 4 presented with severe hypertension (systolic 163-212 mmHg; diastolic 92-130 mmHg). In all cases, renal dysfunction was severe (serum creatinine, 2.3-10 mg/dl) and three patients required haemodialysis. Thrombocytopenia was profound with a platelet count ≤ 50 G/L in four patients. Three patients had extra-renal TMA manifestations: neurological symptoms (confusion, central facial palsy) in patient 2 and intestinal involvement (pain, diarrhoea) in patients 3 and 4, (documented by intestinal biopsy disclosing capillary thrombi in patient 3). Renal biopsy performed in three patients during the acute phase disclosed typical features of TMA (illustrative images are provided in Supplemental Figure S2). In patient 3, a biopsy of the kidney transplant performed three weeks after TMA resolution showed duplication/wrinkling of the glomerular basement membrane. In all biopsies, no significant immune deposits were detected. All patients had detectable (>20%) ADAMTS13 activity and

PCR for Shigatoxin in stool was negative in tested patients 2-4. No patients had evidence of disseminated intravascular coagulation, with normal fibrinogen, prothrombin and partial thromboplastin time. Tacrolimus trough levels were 20, 9.2 and 5.7 microg/L in patients 2, 4 and 5, respectively.

Complement work-up performed at the time of TMA (Table 2) showed increased plasma C3 and C4 levels in all patients (probably as part of the inflammatory response) and mildly increased sC5b-9 plasma level in one patient. FH and FI plasma levels were decreased in one patient. Anti-FH antibodies were detected in two patients. In three out the four patients for whom DNA samples were available, a pathogenic rare variant was detected: one *CFH* variant which is known to be associated to a decreased plasma FH levels in vivo, one *CFI* variant associated to a decreased FI synthesis documented in vitro¹¹, and one *C3* variant associated to an impaired C3 regulation¹². **An additional patient carried, in homozygosity, the haplotype H3 in the *CFH* gene (tgtgt), an established risk factor for aHUS⁷.**

Two patients underwent plasma exchanges with fresh frozen plasma, while three were treated with eculizumab. Patient 4 received two infusions of rituximab for anti-FH antibodies. At the last known follow-up (1-6 months), two patients remained dialysis-dependent, two renal transplant recipients regained their baseline renal function and a third one had a decreased function of the renal transplant.

Data on COVID-19-associated TMA are scarce^{9,13,14} (Supplemental Table S1). We here report the first series of renal TMA in COVID-19 patients, which includes extensive complement work-up. The first remarkable finding is the sharp contrast between mild respiratory symptoms but severe renal (and in three patients extra-renal) TMA. Therefore, COVID-19-related morbidity was mainly due to TMA rather than to the pulmonary involvement. Three of the patients in the present series and two from previously published

cases are renal transplant recipients. Underlying kidney graft (vascular) damage and tacrolimus/everolimus use and very high trough levels (particularly in patient 2), may have contributed to trigger TMA in the renal graft.

The second remarkable finding is the detection in three tested patients of complement gene variants associated to an altered regulation of the complement alternative pathway, and thus to an increased risk of complement-mediated EC injury. An additional tested patient had the at-risk haplotype (H3) in the *CFH* gene, which predisposes to aHUS. Interestingly, the only previously reported patient with COVID-19-associated renal TMA and tested for complement gene variants, was found to carry a pathogenic rare variant in the *C3* gene and an at-risk haplotype in the *MCP* gene⁹. Thus, to date, all five reported patients with COVID-19-associated renal TMA, who underwent genetic testing, carry a constitutional complement dysregulation. These findings require confirmation in larger series. Noteworthy, two patients were positive for anti-FH antibodies, but the pathogenic relevance of these autoantibodies is unclear, and their presence may reflect the stimulation of the immune system due to COVID-19, rather than a causal role in the TMA.

The discussion of the role of systemic complement activation has been one of the central issues in the management of COVID-19 patients^{6,15-19}. Limited preliminary reports suggested a potential benefit of C5 blockade in severe forms of COVID-19^{6,15}, but two prospective studies did not show any clear benefit of C5 or C5a blockade in this setting^{20,21}. However, the patients presented here had mild pulmonary COVID-19 manifestations and absent or moderate markers of systemic complement activation. These findings suggest that TMA in our patients resulted predominantly from intra-renal complement activation and ensuing EC damage, associated to a genetic dysregulation of the complement alternative pathway in at least four patients – i.e. a clinical and genetic pattern of renal TMA similar to the one reported in complement-mediated aHUS. These similarities suggest that HUS is not a unique manifestation of COVID19, but rather that COVID-19 is a newly identified potential

infectious trigger for aHUS, in accordance with previous data on complement-mediated aHUS precipitated by viral infections, mostly influenza strains²². The awareness of a potential association of COVID-19 with complement-mediated aHUS, may help improve patients' management. The use of anti-complement therapies should be considered in this form of HUS associated to COVID-19, to potentially limit kidney damage. However, the limited number of patients in the present series preclude any firm conclusions, and additional data are required.

In conclusion, COVID-19 is a potential newly identified trigger for complement-mediated aHUS. The identification of such association has important clinical implications and additional data are required.

Authorship Contributions:

CES, VF-B and FF reviewed the data and drafted the manuscript. CES, PVM, AS, SS and VF-B performed the complement work-up. SR and LD analysed the kidney biopsies. All the authors were involved in the management of the patients. All authors read, commented and revised the manuscript before approval.

Acknowledgment:

We are grateful to Dr Carole Gengler (Service of Clinical Pathology, Lausanne University Hospital, Switzerland) for her assistance in reviewing the kidney pathological data.

Disclosure of Conflicts of Interest:

GK received fees from SOBI and Roche for invited lectures.

VF-B has received fees from Alexion Pharmaceuticals, Roche, BioCryps and Apellis for invited lectures and/or board membership and is the recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals.

FF has received consultancy and/or speaker honoraria from Roche, Alexion, Apellis, Achillion, Novartis and Alnylam.

References:

1. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 2020;383(2):120-128. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432.
2. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020;395(10234):1417-1418. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
3. Guervilly C, Burtey S, Sabatier F, et al. Circulating Endothelial Cells as a Marker of Endothelial Injury in Severe COVID -19. *J Infect Dis* 2020;222(11):1789-1793. DOI: 10.1093/infdis/jiaa528.
4. Sinkovits G, Mezo B, Reti M, et al. Complement Overactivation and Consumption Predicts In-Hospital Mortality in SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol* 2021;12:663187. DOI: 10.3389/fimmu.2021.663187.
5. Yu J, Yuan X, Chen H, Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood* 2020;136(18):2080-2089. DOI: 10.1182/blood.2020008248.
6. Peffault de Latour R, Bergeron A, Lengline E, et al. Complement C5 inhibition in patients with COVID-19 - a promising target? *Haematologica* 2020;105(12):2847-2850. DOI: 10.3324/haematol.2020.260117.
7. Fakhouri F, Zuber J, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2017;390(10095):681-696. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30062-4.
8. Jhaveri KD, Meir LR, Flores Chang BS, et al. Thrombotic microangiopathy in a patient with COVID-19. *Kidney Int* 2020;98(2):509-512. DOI: 10.1016/j.kint.2020.05.025.
9. Mat O, Ghisdal L, Massart A, et al. Kidney Thrombotic MicroAngiopathy after COVID-19 associated with C3 gene mutation. *Kidney Int Rep* 2021. DOI: 10.1016/j.ekir.2021.03.897.
10. Fremeaux-Bacchi V, Sellier-Leclerc AL, Vieira-Martins P, et al. Complement Gene Variants and Shiga Toxin-Producing Escherichia coli-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Retrospective Genetic and Clinical Study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019;14(3):364-377. DOI: 10.2215/CJN.05830518.
11. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, et al. Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 2010;77(4):339-49. DOI: 10.1038/ki.2009.472.
12. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2013;45(11):1366-70. DOI: 10.1038/ng.2741.
13. Bascunana A, Mijaylova A, Vega A, et al. Thrombotic Microangiopathy in a Kidney Transplant Patient With COVID-19. *Kidney Med* 2021;3(1):124-127. DOI: 10.1016/j.xkme.2020.09.014.
14. Jespersen Nizamic T, Huang Y, Alnimri M, Cheng M, Chen LX, Jen KY. COVID-19 Manifesting as Renal Allograft Dysfunction, Acute Pancreatitis, and Thrombotic Microangiopathy: A Case Report. *Transplant Proc* 2020. DOI: 10.1016/j.transproceed.2020.10.048.
15. Annane D, Heming N, Grimaldi-Bensouda L, et al. Eculizumab as an emergency treatment for adult patients with severe COVID-19 in the intensive care unit: A proof-of-concept study. *EClinicalMedicine* 2020;28:100590. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100590.
16. Gavriilaki E, Brodsky RA. Severe COVID-19 infection and thrombotic microangiopathy: success does not come easily. *Br J Haematol* 2020;189(6):e227-e230. DOI: 10.1111/bjh.16783.
17. Noris M, Benigni A, Remuzzi G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. *Kidney Int* 2020;98(2):314-322. DOI: 10.1016/j.kint.2020.05.013.
18. Gavriilaki E, Asteris PG, Touloumenidou T, et al. Genetic justification of severe COVID-19 using a rigorous algorithm. *Clin Immunol* 2021;226:108726. DOI: 10.1016/j.jclim.2021.108726.
19. Carvelli J, Demaria O, Vely F, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature* 2020;588(7836):146-150. DOI: 10.1038/s41586-020-2600-6.

20. Chouaki Benmansour N, Carvelli J, Vivier E. Complement cascade in severe forms of COVID-19: Recent advances in therapy. *Eur J Immunol* 2021. DOI: 10.1002/eji.202048959.
21. Vlaar APJ, de Bruin S, Busch M, et al. Anti-C5a antibody IFX-1 (vilobelimab) treatment versus best supportive care for patients with severe COVID-19 (PANAMO): an exploratory, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Rheumatol* 2020;2(12):e764-e773. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30341-6.
22. Bitzan M, Zieg J. Influenza-associated thrombotic microangiopathies. *Pediatr Nephrol* 2018;33(11):2009-2025. DOI: 10.1007/s00467-017-3783-4.

Pt	Gender, Age	NK/RT (nephropathy/ time from RT)	Time from COVID-19 diagnosis to TMA	At TMA diagnosis						Kidney biopsy	COVID-19 treatment	TMA treatment	F-up	Outcome
				SCr (mg/dL)	Plt (G/L)	Hb (g/dL)	Hapt. (g/L)	LDH (xULN)	Puria (g/L)					
1	M, 66y	NK	0d	10 (HD)	50	9.2	<0.3	>ULN	NA	Glomerular and arteriolar thrombi and EC detachment. Mild ATN.	-	-	3M	HD
2	M, 71y	RT (NAS / 18M)	12d	2.3	16	6.9	<0.3	1.7	1	Kidney biopsy performed 3w after TMA resolution. Glomerulosclerosis. GBM duplication.	Oxygen (3L/min)	PE (n=4) Eculizumab (day 4; n=3) Temporary discontinuation of tacrolimus/everolimus.	1M	SCr 1.7 mg/dL (baseline values)
3	M, 35y	NK	30d	1.9/7.9 (HD)	11	9.7	<0.3	9	Oliguria	Glomerular and arteriolar thrombi. Mild ATN.	-	PE (n=11) Eculizumab (day 13; n=1)	3M	HD
4	F, 26y	RT (FSGS / 3.5M)	0d	7.2 (HD)	22	7.2	<0.3	>ULN	NA	-	-	PE (n=3) Eculizumab (day 21; ongoing) Temporary tacrolimus discontinuation. Rituximab (n=2)	4M	SCr 4.2 mg/dL Eculizumab continued.
5	F, 38y	RT (IgAN / 24M)	10d	3.2	103	10.4	<0.3	1.6	0.8	Extensive EC detachment from GBM. Mesangiolysis.	-	Decrease in tacrolimus dosage.	6M	SCr 1.8 mg/dL (baseline values)

Table 1: Characteristics of five patients with COVID-19 associated renal thrombotic microangiopathy (TMA). **Abbreviations:** Pt, patient. NK, native kidneys. RT, renal transplantation. M, male, F, female, y, years. D, days. M, months. NAS, nephroangiosclerosis. FSGS, focal segmental glomerulosclerosis. IgAN, IgA nephropathy. ULN, upper limit of normal. F-up, follow-up. SCr, serum creatinine. Plt, platelet count. Hb, haemoglobin. Hapto, haptoglobin. LDH, lactate dehydrogenase. Puria, proteinuria. HD, hemodialysis. PE, plasma exchange. ATN, acute tubular necrosis. EC, endothelial cell. GBM, glomerular basement membrane. F-up, follow-up. NA, not available.

Pt	Time from COVID-19 diagnosis (days)	Time from TMA diagnosis (days)	C3 (mg/l)	C4 (mg/l)	sC5b-9 (ng/mL)	FH (%)	FI (%)	CD46 (MFI)	Ani FH Ab (AU)	CFHR1-CFHR3 copy number	Complement genetics	Complement gene variant classification
1	13	3	840	301	761	70	100	12.3	Negative	1	<i>CFH</i> c.2266T>A p.Ser756Thr	Pathogenic (Reduced FH plasma level)
2	13	1	1750	332	248	144	147	ND	Negative	1	<i>C3</i> c.463A>C p.Lys155Gln	Pathogenic (confers resistance to cofactor activity) ¹²
	54	42	1040	187	322	109	130	17	Negative			
3	34	3	1320	415	303	91	66	10.3	Negative (sample collected after PE)	0	<i>CFI</i> c.1246A>C p.Ile416Leu	Pathogenic (Reduced FI plasma level ; Not detected in supernatants and around 25% expression of WT in lysates) ¹¹
	108	77	1160	461	1094*	94	86	13.8	Positive (4130)			
	167	136	1050	357	570	112	66	ND	Positive (686)			
4	19	19	1220	454	ND	ND	ND	ND	Positive (1554)	2	<i>CFH</i> homozygous tgtgt haplotype	aHUS at-risk haplotype
	42	42	1470	507	345	130	161	ND	Positive (1171)			
	122	122	1210	430	ND	ND	ND	ND	Positive (516)			
5	0	0	1270	550	136	120	120	ND	Negative	ND	ND	ND

Table 2: Complement work-up performed in five patients with COVID 19-associated-renal thrombotic microangiopathy (TMA).

Abbreviations: Pt, patient. FH, factor H. FI, factor I. MFI, mean fluorescence intensity. CFHR, complement factor H-related protein. *CFH*, complement factor H gene. *CFI*, complement factor I. ND: not determined. PE, plasma exchange. Normal range: C3: 615-1250 mg/L; C4: 93-380 mg/L; FH 70-130 %; FI 70-130 %. CD46: 13-19 MFI; sC5b9 < 300 ng/ml. * the patient had several complications related to a peri-renal hematoma that occurred after kidney biopsy.

Article COVID n°2 :

Messages principaux :

Cette étude prospective monocentrique ayant inclus 51 patients consécutifs ayant présenté une infection COVID-19 à partir de Mars 2020 avait comme objectif principal d'évaluer l'impact de différents paramètres immunitaires (explorés par cytométrie, Luminex pour le dosage du taux de cytokines et chimiokines) sur les principales fonctions vitales (hépatiques, rénales, endothéliales, pulmonaires) en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) des patients.

Un IMC anormal (> 25) a été observé chez 72,6 % des patients et été associé à un taux plus élevé d'hospitalisation en unité de soins intensifs ($p = 0,044$).

Une association significative entre le taux des cytokines pro-inflammatoires et les dysfonctionnements hépatiques, rénaux et endothéliaux a été observée uniquement chez les patients souffrant d'obésité (IMC > 30).

Les signes précoces d'atteinte pulmonaire (opacité en verre dépoli) étaient corrélés aux cytokines inflammatoires uniquement chez les patients de poids normal.

Les lésions pulmonaires étaient corrélées à l'IMC mais indépendantes des taux de cytokines.

RESEARCH ARTICLE

Differential association between inflammatory cytokines and multiorgan dysfunction in COVID-19 patients with obesity

Marie-Agnès Dragon-Durey^{1,2,3,4,5}, Xiaoyi Chen^{5,6,7}, Amos Kirilovsky^{5,8}, Nadine Ben Hamouda^{1,2}, Carine El Sissy^{1,2,3,5,8}, Jules Russick^{4,5}, Etienne Charpentier^{2,9}, Yannick Binois^{2,10}, Florence Marliot^{1,2,3,5,8}, Maxime Meylan^{4,5}, Clémence Granier^{1,2,3,11}, Hélène Pere^{2,3,11,12}, Antonin Saldmann^{1,2,3,11}, Bastien Rance^{2,3,6,7,13}, Anne Sophie Jannot^{2,3,6,7,13}, Stéphanie Baron^{2,3,14}, Mouna Chebbi^{2,3,14}, Antoine Fayol^{2,3,15}, Nathalie Josseaume^{4,5}, Claire Rives-Lange^{2,3,16}, Pierre-Louis Tharaux^{2,3,11}, Bernard Cholley^{2,3,17}, Jean-Luc Diehl^{2,3,17,18}, Jean-Benoît Arlet^{2,3,19}, Michel Azizi^{2,3,20}, Alexandre Karras^{2,3,10}, Sébastien Czernichow^{2,3,16}, David M. Smadja^{2,3,18,21}, Jean-Sébastien Hulot^{2,3,11,15}, Isabelle Cremer^{4,5}, Eric Tartour^{1,2,3,11}, Elie Mousseaux^{2,3,9}, Franck Pagès^{1,2,3,5,8*}

1 Laboratory of Immunology, 2 Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France, 3 Université de Paris, Paris, France, 4 INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Team Inflammation, Complement, and Cancer, Paris, France, 5 Sorbonne Université, Cordeliers Research Center, Paris, France, 6 INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Team Information Sciences to Support Personalized Medicine, Paris, France, 7 Laboratory of Information Sciences to support Personalized Medicine, Paris, France, 8 INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Team Integrative Cancer Immunology, Paris, France, 9 Department of Radiology, 10 Department of Nephrology, 11 INSERM, Paris Cardiovascular Center / PARCC, UMR 970, Paris, France, 12 Laboratory of Virology, 13 Biostatistics and Public Health Department, 14 Department of Physiology, 15 Clinic Investigation Center 1418, 16 Department of Nutrition, 17 Department of Intensive Medicine, Reanimation, 18 INSERM UMR-S1140, Team Innovative Therapies in Haemostasis, Paris, France, 19 Department of Internal Medicine, 20 Department of Vascular Medicine, 21 Department of Hematology

☯ These authors contributed equally to this work.

* franck.pages@aphp.fr



OPEN ACCESS

Citation: Dragon-Durey M-A, Chen X, Kirilovsky A, Ben Hamouda N, El Sissy C, Russick J, et al. (2021) Differential association between inflammatory cytokines and multiorgan dysfunction in COVID-19 patients with obesity. PLoS ONE 16(5): e0252026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026>

Editor: Aleksandar R. Zivkovic, Heidelberg University Hospital, GERMANY

Received: January 26, 2021

Accepted: May 8, 2021

Published: May 26, 2021

Copyright: © 2021 Dragon-Durey et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information files](#).

Funding: The funding resources were Université de Paris, The Cancer Research for Personalized Medicine (CARPEM), National Institute of Health and Medical Research (INSERM), and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP). Study sponsors had no role in study design, data collection, analysis, interpretation, or writing of the

Abstract

To investigate the mechanisms underlying the SARS-CoV-2 infection severity observed in patients with obesity, we performed a prospective study of 51 patients evaluating the impact of multiple immune parameters during 2 weeks after admission, on vital organs' functions according to body mass index (BMI) categories. High-dimensional flow cytometric characterization of immune cell subsets was performed at admission, 30 systemic cytokines/chemokines levels were sequentially measured, thirteen endothelial markers were determined at admission and at the zenith of the cytokines. Computed tomography scans on admission were quantified for lung damage and hepatic steatosis (n = 23). Abnormal BMI (> 25) observed in 72.6% of patients, was associated with a higher rate of intensive care unit hospitalization (p = 0.044). SARS-CoV-2 RNAemia, peripheral immune cell subsets and cytokines/chemokines were similar among BMI groups. A significant association between inflammatory cytokines and liver, renal, and endothelial dysfunctions was observed only in patients with obesity (BMI > 30). In contrast, early signs of lung damage (ground-glass opacity) correlated with Th1/M1/inflammatory cytokines only in normal weight patients. Later

report; and in the decision to submit the paper for publication. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: HP reports personal fees from MSD, Janssen, and Biomerieux. ET reports research grants from Servier and Vaxcel; reports honorarium fees from BMS and Merck-MSD; reports honorarium fees for participation on advisory boards from BMS and Astra-Zeneca. PLT reports honorarium fees for participation on advisory boards for Retrophin Inc not related to this work. JBA reports consultancy/expert testimony and honoraria from Novartis and Pfizer. BC reports receiving consulting fees and honoraria for lectures at symposia from Edwards Life Sciences, Orion Pharma, Amomed, and Nordic Pharma. MZ reports research grants from the French Ministry of Health, Quantum Genomics, and the European Horizon 2020 program; reports grant support and nonfinancial support from ReCor Medical and Idorsia; and reports personal fees from CVRx. JSH reports grants from Bioserinity, Sanofi, Servier and Novo Nordisk. J.S.H. reports speaker, advisory board or consultancy fees from Amgen, Astra Zeneca, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Novartis, Novo Nordisk. SC reports personal fees from Novonordisk, Lilly, Kabi, Janssen-Gilag, Servier, outside the submitted work; reports other from MyGoodLife. FP reported receiving grants from Bristol-Myers and Squibb and HailoDx outside the submitted work; participation in Scientific Advisory Boards & Meetings for Bristol-Myers Squibb, Roche, Janssen, Merck, and Gilead. DMS received consulting fees or travels expenses from Boehringer Ingelheim, Léo Pharma, Aspen and Carmat. None of them are related to the work described here. M-ADD reported having received speaker fees from BMS, Gilead and Roche outside the submitted work. The remaining authors declared no conflict of interest. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

lesions of pulmonary consolidation correlated with BMI but were independent of cytokine levels. Our study reveals distinct physiopathological mechanisms associated with SARS-CoV-2 infection in patients with obesity that may have important clinical implications.

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), first identified on December 2019, is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) [1, 2]. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) sometimes associated with multiorgan failure is observed in a large proportion of COVID-19 patients [3]. The pathogenesis of severe forms of COVID-19 is characterized by hyperinflammatory syndrome, i.e. a cytokine storm [4]; with overproduction of inflammation-related molecules such as interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), and ferritin [5].

If low socioeconomic status [6] has been reported as risk factors for being infected, severe form of COVID-19 is mainly observed in patients of advanced age; with the 14.8%-20.2% fatality rate for adults older than 80 years [7]. However, it also affects younger male patients with preexisting moderate comorbidities i.e. type II diabetes (33.8%), high blood pressure (56.6%), and overweight (41.7%), in US patients requiring hospitalization [8]. The association between high body mass index (BMI) and the need for invasive mechanical ventilation has been emphasized by studies from different countries [9–12]. This view is endorsed by a position statement concerning the prevention and management of patients with obesity infected by SARS-CoV-2 [13]. Obesity is considered as a state of excessive fat accumulation caused by a disruption of energy balance. It is marked by enhanced pro-inflammatory factors in blood and infiltration of immune cells in white adipose tissue. Imbalance in the expression of pro and anti-inflammatory adipokines secreted by adipose tissue contributes to the development of obesity-linked complications [14], e.g. insulin resistance and type II diabetes, atherosclerosis, and non-alcohol fatty liver disease (NAFLD) [15]. The interleukin (IL)-1-family cytokine members and tumor necrosis factor alpha (TNF α) are key inflammatory cytokines involved in fatty liver diseases [16, 17]. In addition, other cytokines, such as MCP-1, IL-6, IL-8, IL-18, RANTES and Il-10 are also associated to fatty liver [18, 19]. Pro-inflammatory responses in adipose microenvironment activate endothelial cells, which upregulate cell adhesion markers such as P and E-selectins [20] favoring infiltration of immune cells. Signs of liver dysfunction [21], acute kidney injury [22], and endothelium activation [23] have been reported in critically ill patients with COVID-19, however their association with obesity and inflammatory disorders remains elusive.

In the present study, we analyzed prospectively the association between the COVID-19-induced cytokines storm and vital organs, i.e. the lung, liver, and kidney in 51 severe patients according to their BMI and examined whether the severity of the SARS-CoV-2 infection in overweight patients could be related to distinct cytokine profiles and/or a differential impact of inflammatory cytokines on multiorgan dysfunction.

Materials and methods

Patients

This prospective observational cohort study included 51 consecutive adult patients (≥ 18 years old) with available samples admitted to Georges Pompidou European Hospital (Paris, France)

since March 23rd 2020. All patients were diagnosed with COVID-19, i.e. positive for SARS-CoV-2 nucleic acid on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays of nasopharyngeal swab specimens, in accordance with the World Health Organization (WHO) COVID-19 technical guidance (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330854>). Only critical cases of pneumonia defined as patients with respiratory rate > 30 breaths/min, severe respiratory distress, or SpO₂ < 90% on room air at admission were included in this study. On admission, all patients required oxygen and 36 an intensive care unit (ICU) admission with invasive mechanical ventilation. Five patients received corticosteroids at admission and 17 anti-IL6R during hospitalization. This study received approval from the hospital institutional review board (CERAPHP.5—Comité d’Ethique de la Recherche, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, registration number of the committee: N° IRB #00011928, N° approval: 2020-CVD-03). All patients provided written informed consent for study participation prior to inclusion. Patients included in the present study were adult and informed that their medical data could be used for research purpose in accordance with the General Data Protection Regulation (EU 2016/679).

Data collection

Epidemiological, demographic, clinical, laboratory, treatment, and outcome data were extracted from patients’ electronic medical records and collected in the dedicated HEGP-REDCap™ database, which has been registered under the MR004 CNIL procedure. All data were reviewed by physicians (JSH, JLD), radiologists (EM, EC), virologist (HP), hematologist (DMS), immunologists (MADD, ET, FP), and biostatisticians (ASJ, BR, XC, MM, AK).

Routine laboratory tests

Routine laboratory tests on admission and during follow-up included the levels of liver enzymes: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase, and total bilirubin (TBIL). Hepatic steatosis index (HSI) was calculated by adding an ALT/AST ratio to BMI, with two points added to the algorithm for diabetes and two for females [22]. Kidney parameters included baseline creatinine values, the peak value of serum creatinine during follow-up (creatinine Max), the urine albumin/creatinine ratio (ACR), the urine protein/creatinine ratio (PCR), and the urinary concentration of sodium (UNa) and potassium (UK) from spot urine samples collected during the initial 48-h following admission.

Computed tomography (CT) examination and analysis. Twenty-three patients had available chest CT scan at admission (15 patients in conventional hospitalization unit and eight in ICU). Visual assessment of lung injuries was performed independently of care by two expert radiologists blinded to all clinical and biology data (EM, ET). Lung lobes were assessed for the presence of either ground-glass opacity (hazy areas of increased attenuation without obscuration of the underlying vasculature; GGO) or consolidation (homogeneous opacification with obscuration of the underlying vasculature), or both in all patients [24, 25]. The extent was further evaluated by the number of affected lobes (0 to 5). In case of discordance, a consensus was reached by the two experts before calculating the final visual GGO and consolidation scores. As previously described [26], hepatic steatosis was screened in all CTs by estimating the absolute value difference in attenuation between liver and spleen (CTL-S). A Threshold CTL-S value of -3.2 was used to define the presence of hepatic steatosis. A coronal height measurement of the hepatic hilum at the dome level was finally performed in all patients at CT.

Serum SARS-CoV-2 nucleic acid (RNAemia). SARS-CoV-2 RNA was extracted from plasma (140 μ L) collected at the zenith of cytokines concentrations, using QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN[®], Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 RNAemia was quantified by droplet-based Crystal Digital PCR[™] (Stilla Technologies, Villejuif, France) on the Naica[™] System (Stilla Technologies, Villejuif, France) using the commercial RT-PCR amplification kit (Novel Coronavirus (2019-nCoV) Digital PCR Detection Kit, Apexbio[™], Beijing, China) following the manufacturer's instructions. Plasma samples with one of the two ORF1 or N genes or both genes detected were considered as positive samples and results were automatically analyzed using "Crystal reader" (Stilla) and "Crystal Miner" software (Stilla) based on the most amplified gene positive droplets. SARS-CoV-2 RNA concentrations (cp/mL) were finally calculated considering the extracted volume of plasma.

Flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells collected at admission were stained for CD3, DC-SIGN (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) CD8, CD40, HLA-DR (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD14, CD16, CD19, CD56, CD86, CD209 (BD Biosciences), CD163 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), and Live/Dead Fixable Yellow (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) (details in [S1 Table](#)). Data were acquired on a Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed were using Diva software (BD Biosciences). The Excyted pipeline was used to normalize and cluster the data (<https://github.com/maximemeylan/Excyted>). Intensity values of events gated from live cells were normalized using the Logicle transformation. Unsupervised clustering and Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) were computed with 10,000 events for each sample using $k = 30$ [27].

Cytokines and chemokines measurements. The levels of 26 cytokines/chemokines (FGF2, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, VEGF, IFN- γ , IL-1 β , TGF β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10) and two immune-related molecules (IL-1ra, sCD25) were measured by Luminex technology (Bio-Plex, Bio-Rad, 27-Plex Assays panel, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions, in the patients plasma collected at days 1 (admission), 3, 6, 9, and 14. In patients treated with anti-IL6R therapy (17/51), only samples before immunotherapy were analyzed. Plasma samples from 18 adult blood donors collected during the same period were used as controls. Plasma HO-1 and Neopterin concentrations were determined at day 1 by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Abcam, The Netherlands and IBL International, Germany, respectively) according to the user manuals.

Endothelial markers measurements. Soluble VCAM-1, E-selectin, P-selectin, VEGF-A, PlGF, basic-FGF, VEGFR-2, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endoglin were quantified at admission on the day of the cytokine peak in PPP with a Human Magnetic Luminex Assay from R&D systems (Lille, France). Data were assessed with the Bio-Plex 200 using the Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Circulating endothelial cells were isolated from EDTA blood samples collected at day 14 by immunomagnetic separation with mAb CD146-coated beads and stained with the fluorescent probe acridine orange, as previously described [28].

Statistics

The association between BMI categories and patient clinical characteristics was assessed by the chi-squared test and Fisher's exact test for categorical parameters or the Kruskal-Wallis test for continuous parameters. The p-value for trend was computed from the Spearman's test for continuous parameters or the Mantel-Haenszel linear-by-liner association test for categorical parameters. For all pairwise comparisons the Wilcoxon-Mann-Whitney test was used followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. In each BMI group, the

median ratios between patients and the concentrations of cytokines in healthy donors were displayed on each axes of a radar chart using the `radarchart` function from the `fmsb` package. The correlations between patient clinical parameters and cytokine concentrations were assessed through the Pearson correlation test except for lung damages analysis where the Spearman's rank correlation coefficient was computed and visualized in heatmaps. For all boxplots, the center was drawn through the median of the measurement, and the lower and upper bounds of the box corresponded to the first and third quartile. Whiskers beyond these points represented 1.5 times the interquartile range. All analyses were performed with the statistical software R version 3.6.3 using `gplots`, `ggplot2`, `ggpubr`, and `fmsb` packages. A *p* value less than 0.05 was considered as significant.

Results

Clinical and biological characteristics

We prospectively collected data regarding clinical symptoms and outcomes for 51 hospitalized patients with confirmed COVID-19. Baseline clinical characteristics are shown in [Table 1](#).

In total, 36 and 7 patients required the ICU interventions on admission and during follow-up, respectively. The mean BMI for all patients was 28.4 ± 5.2 kg/m². Fourteen (27.5%) patients presented with normal weight (BMI ≤ 25), 24 (47.1%) with overweight ($25 < \text{BMI} < 30$), and 13 (25.5%) with obesity (BMI ≥ 30 ; [Table 1](#)). The mean duration from onset of clinical signs to admission was identical among BMI groups (7 days; range 2–16; *p* = 0.283). Patients who required ICU admission presented with a higher BMI than non-ICU patients (29.3 ± 0.80 versus 25.8 ± 1.28 ; *p* = 0.048); only one patient with BMI ≥ 30 did not require ICU care. Patients with BMI ≥ 30 tended to be younger than those with normal weight (BMI ≤ 25 ; 64 versus 58 years; *p* trend = 0.069). Six (46.2%) patients with BMI ≥ 30 died during hospitalization and these patients were significantly younger than those who died and had BMI ≤ 25 ($60 (\pm 15)$ versus $78 (\pm 9)$ years, *p* = 0.041). Hypertension and diabetes were the most common comorbidities (54.9% and 27.5%, respectively, [Table 1](#)). Diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, and cardiac disease other than arterial hypertension were mainly observed in patients with BMI ≥ 30 (*p* = 0.024, *p* = 0.032, and *p* = 0.029, respectively, [Table 1](#)). When removing COPD patients from the analysis, the WHO scale remains correlated with BMI (*p* = 0.033, [S2 Table](#)). No difference for the plasmatic level of C-reactive protein, D-Dimers, troponin, and ferritin was observed at admission between BMI groups. Neutrophils to lymphocytes and CD4 to CD8 ratios did not differ between the BMI groups ([S3 Table](#)).

Immune profiles and BMI categories

On admission, 19 of 30 analyzed cytokines/chemokines or immune-related molecules were significantly increased in blood of patients with COVID-19 compared to controls (all *p* adjusted = 0.05 to < 0.001 , [S4 Table](#)). Thirteen of these correlated with the severity of respiratory distress, as evaluated by the WHO scale ([S1 Fig](#)). The immune landscape combined nine pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF α , IL-8, IFN γ , MCP-1, MIP1 α , and G-CSF) together with T helper type 2 or macrophage type 2 cytokines with anti-inflammatory properties (i.e. IL-10, IL-4 and HO-1; [S1 Fig](#)). The cytokine levels on admission were not influenced by sex except for IL-15 ([S2 Fig](#)), nor by BMI assessed as a continuous variable ([S5 Table](#)) or by category (BMI ≤ 25 , $25 < \text{BMI} < 30$, or BMI ≥ 30 ; [Fig 1A](#), HSI < 30 or > 36 , [S3 Fig](#)).

Strong similarity for the immune orientations (e.g. pro versus anti-inflammatory) was observed in patients according to BMI categories ([Fig 1B](#)). No difference was observed at the zenith for each cytokine measured from day 1 to day 14 between patients groups classified according to BMI ([S3 Fig](#)). Of note, patients receiving corticosteroids at admission (*n* = 5) had

Table 1. Demographic and clinical characteristics.

	All N = 51	Body Mass Index			p overall	p trend
		< 25 n = 14	25 < BMI < 30 n = 24	≥ 30 n = 13		
Sex (%)					0.637	0.579
Female	12 (23.5)	2 (14.3)	7 (29.2)	3 (23.1)		
Male	39 (76.5)	12 (85.7)	17 (70.8)	10 (76.9)		
Age, years	60.0 (53.0–70.5)	64.5 (59.2–75.2)	59.0 (53.8–68.0)	58.0 (49.0–68.0)	0.174	0.069
Time from clinical signs to admission, days	7.0 (6.0–8.5)	7.00 (6.2–7.7)	7.00 (6.0–7.2)	7.0 (7.0–10.0)	0.571	0.524
ICU required on admission (%)					0.526	0.258
No	15 (29.4)	6 (42.9)	6 (25.0)	3 (23.1)		
Yes	36 (70.6)	8 (57.1)	18 (75.0)	10 (76.9)		
ICU required during hospitalization (%)					0.084	0.044
No	8 (15.7)	5 (35.7)	2 (28.3)	1 (7.7)		
Yes	43 (84.3)	9 (64.3)	22 (97.1)	12 (92.3)		
Death (%)					0.109	0.897
No	35 (68.6)	8 (57.1)	20 (83.3)	7 (53.8)		
Yes	16 (31.4)	6 (42.9)	4 (16.7)	6 (46.2)		
Comorbidities						
Diabetes (%)					0.053	0.024
No	37 (72.5)	12 (85.7)	19 (79.2)	6 (50.0)		
Yes	14 (27.5)	2 (14.3)	5 (20.8)	6 (50.0)		
AHT (%)					0.782	0.833
No	23 (45.1)	6 (42.9)	12 (50.0)	6 (46.2)		
Yes	28 (54.9)	8 (57.1)	12 (50.0)	7 (53.8)		
Cardiac disease other than AHT (%)					0.12	0.032
No	44 (86.3)	10 (71.4)	21 (87.5)	13 (100.0)		
Yes	7 (13.7)	4 (28.6)	3 (12.5)	0 (0.0)		
AHT, diabetes, or other cardiac disease (%)					0.197	0.291
No	18 (35.3)	5 (35.7)	11 (45.8)	2 (15.4)		
Yes	33 (64.7)	9 (64.3)	13 (54.2)	11 (84.6)		
COPD (%)					0.069	0.029
No	47 (92.2)	14 (100.0)	23 (95.8)	10 (76.9)		
Yes	4 (7.8)	0 (0.0)	1 (4.17)	3 (23.1)		
Cancer (%)					0.432	0.116
No	48 (94.1)	12 (85.7)	23 (95.8)	13 (100.0)		
Yes	3 (5.9)	2 (14.3)	1 (4.2)	0 (0.0)		
Tabacco use (%)					1	1
No	27 (90.0)	7 (87.5)	13 (92.9)	7 (87.5)		
Yes	3 (10.0)	1 (12.5)	1 (7.1)	1 (12.5)		
Therapy						
Corticotherapy^A (%)					1.000	0.950
No	46 (90.2)	13 (92.9)	21 (87.5)	12 (92.3)		
Yes	5 (11.9)	1 (7.7)	3 (15.8)	1 (10.0)		
Anti-IL-6R (Sarilumab)^B (%)					0.597	0.345
No	34 (66.7)	11 (78.6)	15 (62.5)	8 (61.5)		

(Continued)

Table 1. (Continued)

	All	Body Mass Index			p overall	p trend
		< 25	25 < BMI < 30	≥ 30		
	N = 51	n = 14	n = 24	n = 13		
Yes	17 (33.3)	3 (21.4)	9 (37.5)	5 (38.5)		

ICU = Intensive care unit, COPD = Chronic obstructive pulmonary disease, AHT = arterial hypertension

^A Patients received corticotherapy at admission and during hospitalization.

^B Patients received anti-IL6R treatment during hospitalization, none received it at admission.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.t001>

cytokine levels similar to other patients ($p > 0.05$ for each, Wilcoxon test, S4 Fig). Cytokine assays post-therapy anti-IL6R were excluded from analysis. Characterization of peripheral blood mononuclear cells according to BMI categories using polychromatic flow cytometry showed no difference for percentages and absolute numbers of total T cells, CD4 T lymphocytes, CD8 T lymphocytes, B lymphocytes, and NK-T cells (S5 Fig). A decrease trend for the absolute number of NK cells and subsets of monocytes was observed for increasing BMI categories (S5A Fig). Uniform Manifold Approximation and Projection representation of the immune cell landscape (Fig 1C) revealed very similar patterns between BMI subgroups with no significant difference among clusters (S5B Fig). RNAemia measured at the zenith was identical among BMI groups (Fig 1D). Altogether, the severity of COVID-19 in patients with obesity was neither associated with an increased production or a distinct pattern of cytokines or immune cells nor with a higher SARS-COV2 viremia.

Relationship between cytokine profiles and the COVID-19 severity according to BMI

The severity of respiratory distress correlated with the BMI levels (Fig 2A).

Patients with mechanical ventilation and $pO_2/FIO_2 < 150$, $spO_2/FIO_2 < 200$, or vasopressors (WHO score 8), and vasopressors, dialysis, or extracorporeal membrane oxygenation (WHO score 9) presented with a significantly higher BMI as compared to those with 6–7 WHO score (i.e. requiring oxygen by NIV or high flow or mechanical ventilation and $pO_2/FIO_2 > 150$ or $spO_2/FIO_2 > 200$; $p = 0.037$) and those without oxygen therapy, oxygen by mask, or nasal prongs (4–5 WHO score; $p = 0.018$). If we remove patients presenting with COPD from the analysis, the correlation between BMI and WHO progression scale remains significant (p trend = 0.033, S2 Table).

The BMI was correlated with the extent of consolidation ($r = 0.56$; $p = 0.012$), but not with GGO ($r = 0.01$; $p = 0.96$; Fig 2B) as assessed by CT when this examination performed at admission was available ($n = 19$). No association between the cytokine's levels and the extent of consolidation and GGO was observed in patients with a high BMI (Fig 2C and 2D). Contrarily, a positive correlation was observed between the extent of GGO and cytokines involved in the Th1 immune orientation (IFN γ , IL-12) or inflammation (IL-6, IL-8, TNF α , IL-17a) in patients with low BMI (Fig 2D). Thus, pulmonary damages in BMI-high patients are distinguished by a higher propensity to make condensation and a lesser influence of cytokines.

Obesity is a positive risk factor for NAFLD. Computed tomography identified nine (out of 23; 39.1%) COVID-19 patients with CT_{L-5} attenuation values reflecting hepatic steatosis (Fig 3A) and 12 (out of 23; 52.2%) patients with liver dimensions compatible with hepatomegaly.

In accordance, the biological HSI > 36 , reflecting NAFLD, was observed in 43.1% of patients (22/51; Fig 3B) and leptin, produced by fat cells, was increased in blood of patients

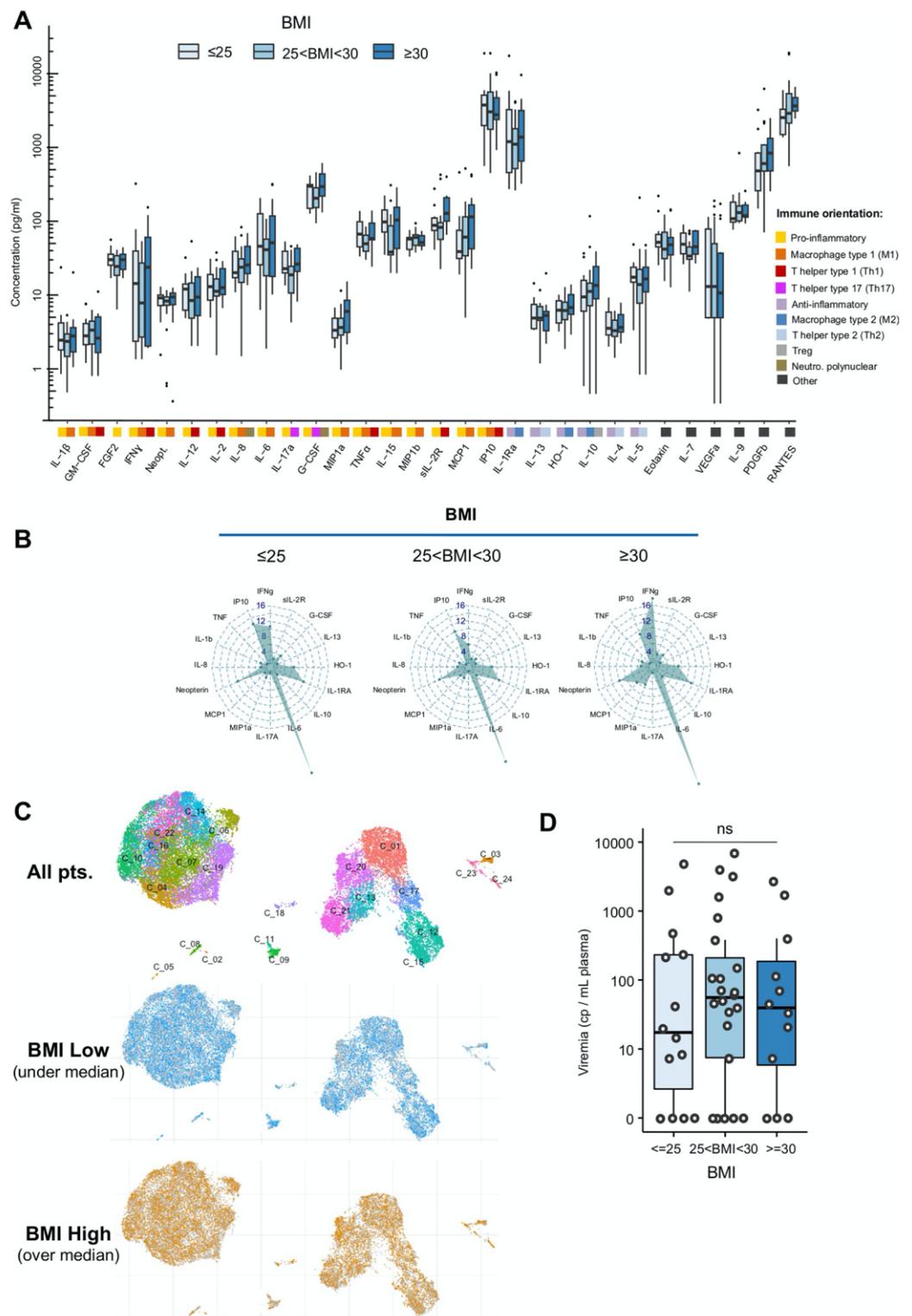


Fig 1. (A) Box plots illustrating the concentration of cytokines according to the BMI levels in COVID-19 patients with BMI < 25, 25 < BMI < 30, and BMI > 30. The colored squares associated with each cytokine illustrate the different orientations of the immune response (n = 42 patients). (B) Radar plots illustrating the fold increase of selected cytokines in patients with BMI ≤ 25 (n = 11), 25 < BMI < 30 (n = 19), and BMI ≥ 30 (n = 12), as compared to healthy donors (n = 18). (C) Characterization of peripheral blood mononuclear cells according to the BMI categories (above and below

the median BMI of 26.8, n = 29) using polychromatic flow cytometry and Uniform Manifold Approximation and Projection representation of the 24 clusters identified. Each C stands for one of the 24 « Cluster » automatically identified and defined by the software. Each cluster corresponds to a group of cells with comparable phenotype i.e that express similar levels of the different markers (at their surface or intracellular) (D) Box plots comparing the SARS-CoV-2 RNAemia measured at the zenith of the cytokines levels, in patients (n = 50) according to the BMI levels (BMI ≤ 25, 25 < BMI < 30, and BMI ≥ 30). Wilcoxon-Mann-Whitney test used for pairwise comparisons in Fig 1D followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction in Fig 1A.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g001>

with obesity (p = 0.012; Fig 3B). The severity of ARDS correlated with HSI (the WHO scale: 8–9 versus 4–5 p = 0.042; Fig 3B), as previously observed with BMI. At admission, 62.7% (n = 32/51) of patients presented with mild liver dysfunction (i.e. abnormalities in ALT, AST, TBIL, and/or GGT; S1 Table). No difference of cytokines levels was observed between patients

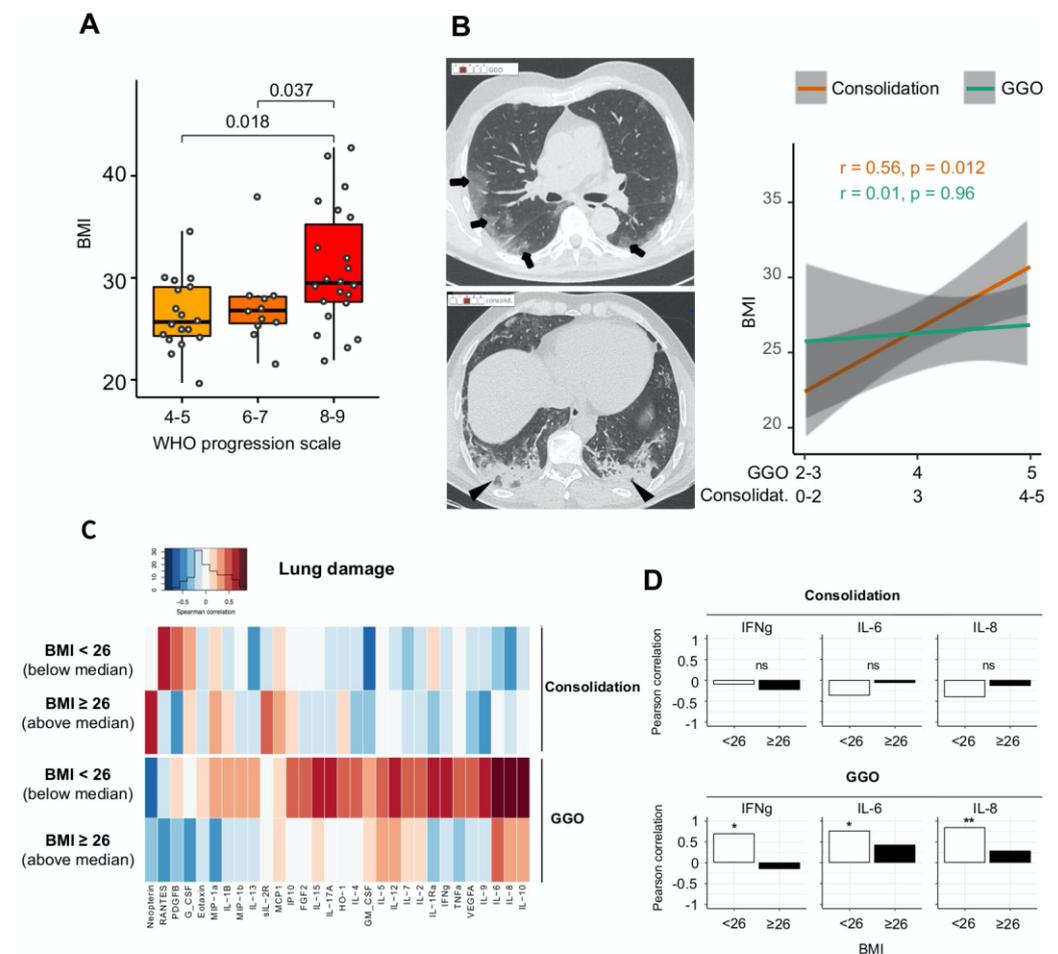


Fig 2. (A) Left part: box plots illustrating BMI in COVID-19 patients (n = 50) according to the level of respiratory distress (the WHO scale). Wilcoxon-Mann-Whitney test used for pairwise comparisons. (B) Left part: High-resolution axial computed tomography (CT) images of two patients show ground glass opacity (GGO; arrows) with a low score #2 and consolidation (arrowheads) with a moderate score #3. Right part: The correlations between the consolidation scale, GGO scale, and BMI. R for the Kendall rank correlation coefficient. (C) The Spearman correlation heatmap depicting the negative (blue), positive (red), and no (white) correlation between consolidation or the GGO extent evaluated based on chest CT images and the blood cytokines levels in COVID-19 patients (n = 19) according BMI below or above 26, i.e. the median BMI of patients with available CT (D) Bar plots showing the Spearman rank correlation coefficient of IFNγ, IL-6, and IL-8 with consolidation (top) or the GGO extent (bottom) according to the BMI levels (n = 19; * p < 0.05; ** p < 0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g002>

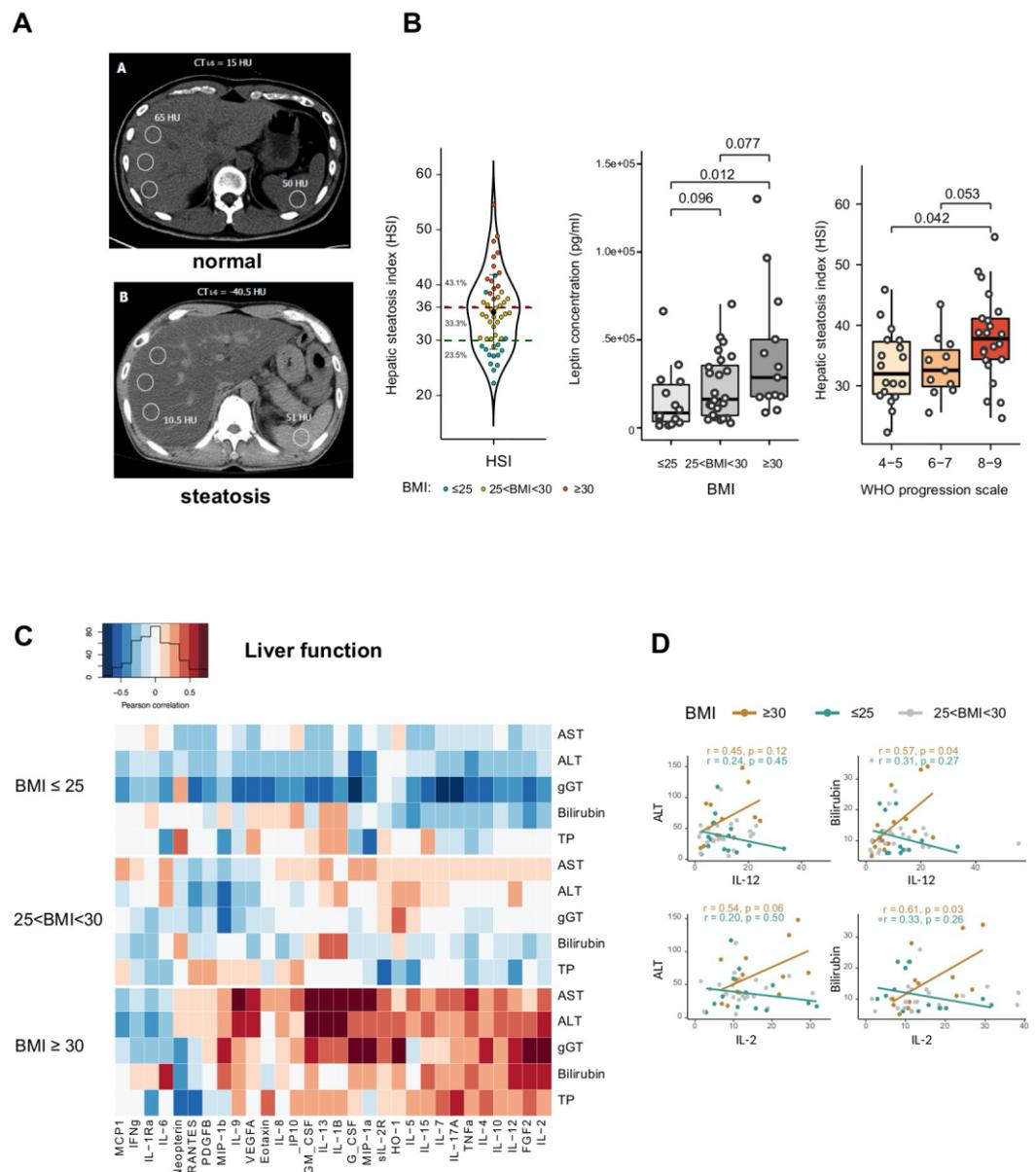


Fig 3. (A) Axial computed tomography images showing normal (up) and low attenuation (down) values of the liver parenchyma reflecting steatosis (n = 23). (B) Left panel: violin plot representing the biological hepatic steatosis index (HSI) according to BMI (≤ 25 in green, 25 < BMI < 30 in yellow, ≥ 30 in red). Middle panel: Box plots depicting the plasma leptin levels of patients (n = 51) according to BMI (BMI ≤ 25, 25 < BMI < 30, BMI ≥ 30). Wilcoxon-Mann-Whitney test used for pairwise comparisons. Right panel: Box plots representing the HSI levels according to severity of pulmonary distress (the WHO scale). (C) The Pearson correlation heatmap depicts the negative (blue), positive (red), and no (white) correlation between markers of liver dysfunction (AST, ALT, gGT, TBIL, and TP) and the blood cytokines levels in patients (n = 51) according to BMI (BMI ≤ 25, 25 < BMI < 30, BMI ≥ 30). (D) Linear regression curves estimated between ALT, total bilirubin, and plasma concentration of IL-1β, IL-12 and IL-2 in non-overweight patients (BMI ≤ 25, in light blue) and in patients with obesity (BMI ≥ 30, in dark blue). Patients with 25 < BMI < 30 are presented in grey.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g003>

with low (<30) and high (>36) HSI (S6 Fig). However, of all patients, a significant positive correlation between liver function tests at admission and 5/7 inflammatory cytokines, 6/11 M1 cytokines, and 4/7 Th1 cytokines was observed only in those with obesity (Fig 3C). Correlation plots of IL12 and IL-2 with ALT and TBIL are illustrated in Fig 3D. Altogether, COVID-19

patients with obesity frequently had imaging and biological signs of steatosis and a correlation was observed between liver dysfunction and inflammatory cytokines.

Overall, 58% of the total cohort (30/51 patients), showed kidney function impairment with increased serum creatinine on admission or during hospitalization (S3 Table). Peak level of serum creatinine during follow-up was higher in patients with BMI ≥ 30 (267 versus 114 $\mu\text{m}/\text{L}$ in patients with BMI ≤ 25 ; overall $p = 0.008$, S3 Table). Most of inflammatory cytokines levels at admission correlated with the peak creatinine during hospitalization (e.g. IL-6 [$r = 0.24$; $p = 0.0092$], IFN γ [$r = 0.48$, $p < 0.001$], TNF α [$r = 0.39$; $p < 0.001$], and sIL2R [$r = 0.5$, $p < 0.001$]; Fig 4A).

This association was reinforced in patients with obesity (Fig 4A). Nine proinflammatory cytokines compatible with M1 polarization (IL-8, FGF, sIL-2R, GM-CSF, TNF α , MIP1 α , G-CSF, IFN γ , and MIP1 β) correlated with renal dysfunction (i.e. peak of serum creatinine), but also with the ratio urine albumin/creatinine to protein/creatinine (ACR/PCR), reflecting glomerular involvement (Fig 4B).

Relationship between cytokine profiles and endothelial biomarkers according to BMI

Multiorgan dysfunction in patients with obesity could be related to endothelial damage under cytokine disorders. We measured plasmatic endothelial markers at the zenith of inflammatory cytokines cumulation. Increased levels of endoglin, E and P-selectin, angiopoietin 2, and PIGF were observed in patients with BMI ≥ 30 (Fig 5A and S3 Table).

Concomitantly, markers of endothelial dysfunction correlated with cytokines levels of the Th1 immune orientation (IFN γ , TNF α), inflammation (IL-17a, MIP1 α , G-CSF, TNF α , MIP1 β , and IFN γ), and/or M1 activation (IL-6, IFN γ , TNF α , IP10, MIP1 α , and MCP1), mostly in patients with obesity (Fig 5B). IL-8, a cytokine also produced by activated endothelial cells, was highly correlated with these inflammatory cytokines.

Overall, a correlation between distinct cytokine patterns and organ dysfunction was revealed in patients with obesity as compare to non-overweight patients (Fig 6).

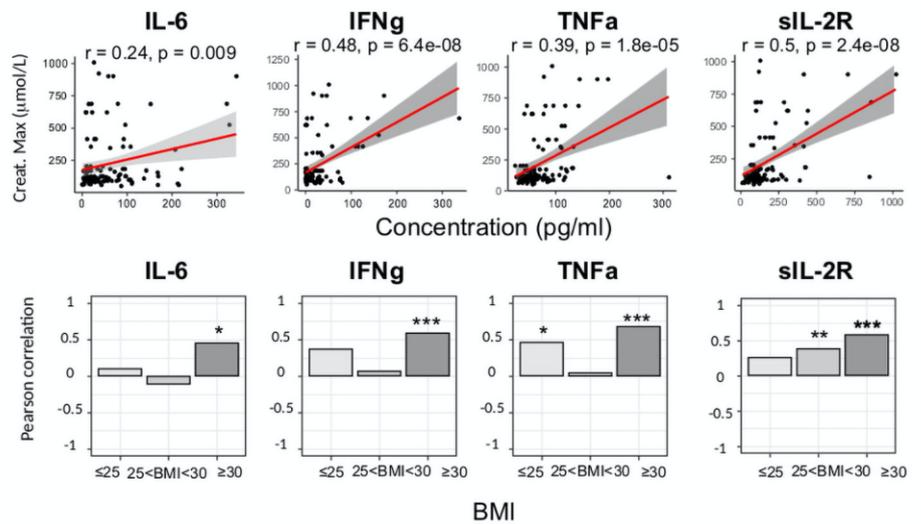
This interaction did not appear to apply to lung damage. Contrarily, in normal weight patients, Th1/M1/inflammatory cytokines correlated with lung damage (i.e. GGO), with no obvious signs of liver, renal, or endothelial functions damage (Fig 6).

Discussion

Our study reveals distinct physiopathological mechanism associated with severe COVID-19 in patients with obesity. An association between inflammatory cytokines and liver, renal, and endothelial dysfunctions was revealed in patients with obesity. The severity of lung damage (i.e. consolidation at CT scans) correlated with BMI, but was independent of the cytokine levels. Contrarily, in normal weight patients, Th1/M1/inflammatory cytokines correlated with the early signs of lung damage (GGO), but without any obvious liver, renal, or endothelial dysfunction. This could have significant implications for monitoring and treatment of SARS-COV2 infected patients. We did not observe significant difference between the BMI groups of biomarkers previously reported as reflects of COVID-19 inflammatory immune response such as neutrophils to lymphocytes or CD4 to CD8 ratios [29, 30].

In patients with obesity, overproduction of cytokines evokes a preexisting chronic inflammation, since adipocytes secretion of pro-inflammatory molecules (e.g. MCP-1, IL-6, IL-18, TNF- α , IL-1 β) together with a decrease of anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10) has been reported [31]. We did not observe any obvious difference in cytokine overproduction or immune orientation between obese and normal-weight patients in accordance with previous

A



B

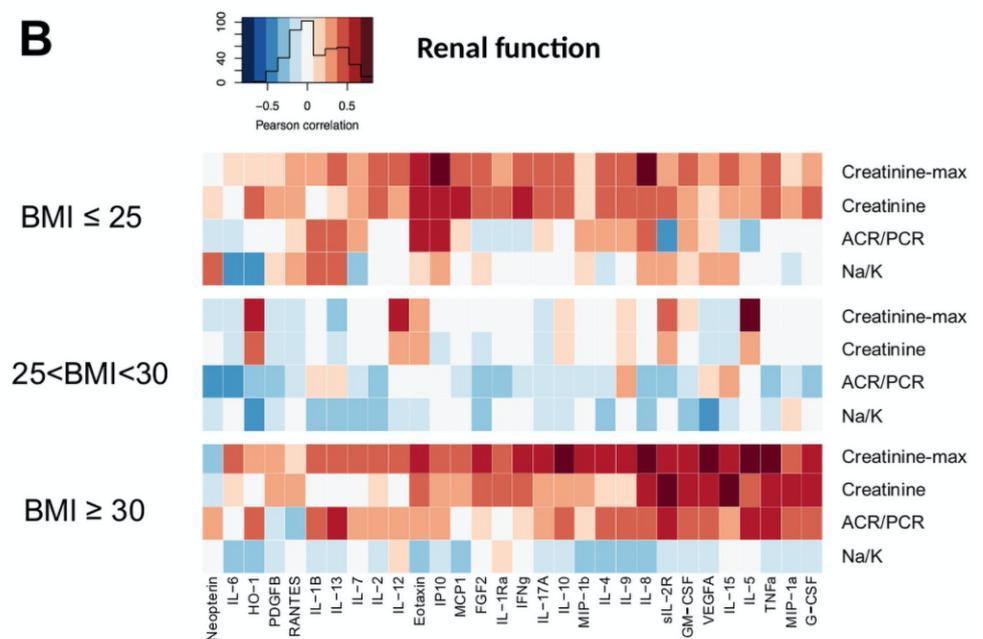


Fig 4. (A) Top panel: Linear regression curves between plasma concentration of IL-6, IFN γ , TNF α , GM-CSF, and the maximum level of creatinine. Bottom panel: bar plots showing the coefficient of the Spearman correlation of IL-6, IFN γ , TNF α , and GM-CSF with the maximum level of creatinine according to BMI (BMI \leq 25, 25 < BMI < 30, BMI \geq 30; *p < 0.05; **p < 0.01, ***p < 0.001). (B) The Spearman correlation heatmap depicts the negative (blue), positive (red), and no (white) correlation between markers of kidney dysfunction (i.e. maximum creatinine, creatinine, the albumin/creatinine ratio with protein/creatinine, the Na/K ratio, and the blood cytokines levels according to BMI (BMI \leq 25, 25 < BMI < 30, BMI \geq 30).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g004>

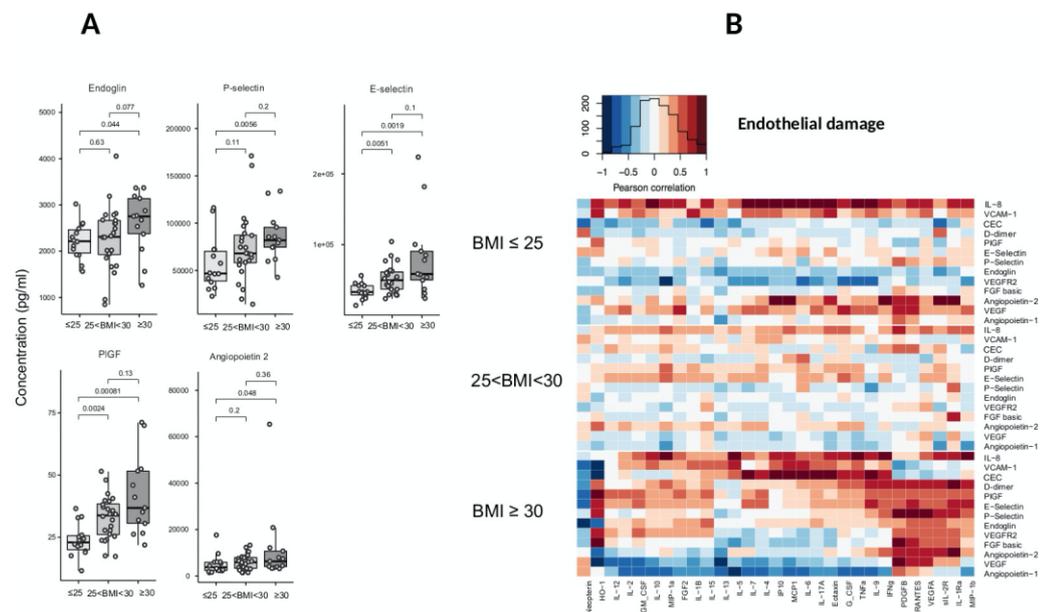


Fig 5. (A) Box plots illustrating the plasma levels of endothelial activation markers (IL-8, endoglin, E and P-selectins, PIGF, Ang-2) according to BMI (BMI ≤ 25, 25 < BMI < 30, BMI ≥ 30). (B) The Spearman correlation heatmap depicts the negative (blue), positive (red), and no (white) correlation between plasma markers of endothelial activation and the blood cytokines levels in COVID-19 patients (n = 38) according to BMI (BMI < 25, 25 < BMI < 30, BMI > 30).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g005>

observation [32]. A differential impact of inflammatory cytokines on liver, lung, kidney, and vascular/endothelial functions, involved in disease prognosis [33], was therefore assumed. The incidence of acute respiratory distress syndrome is increased in patients with obesity [34, 35] and the effects of increased inflammatory cytokines are suspected. Here we showed that consolidation at CT scan was clearly independent of the cytokine levels, but positively associated with BMI. Contrarily, a strong correlation was observed between inflammatory cytokines and the extent of GGO in normal-weight patients. This observation suggests distinct pathogenesis of pulmonary lesions in COVID-19 patients and their relationship with systemic inflammation-related disorders. This field is of particular importance since anti-IL-6 receptor treatments, which attempt to reduce hyperinflammation and attenuate lung damage have shown variable levels of the efficacy in COVID19 patients [36–38].

The liver is a potential target for SARS-CoV-2 [39]. Hepatic dysfunction, seen in 14%–53% of patients with SARS-CoV-2 infection, is associated with severe disease [40]. Liver dysfunction could be related to uncontrolled immune reaction, cytopathic effect of the virus, and/or drug induced liver injury. SARS-Cov2 RNAemia was identical in all BMI groups as previously observed [41]. A significant correlation between liver dysfunction (AST, ALAT, TBIL, and prothrombin time) and inflammatory cytokines was solely observed in patients with obesity suggesting a preexisting liver abnormalities/sensitivity to cytokines such as TNF α involved in many forms of liver injury [16].

Acute kidney injury (AKI) has been reported to occur in 36.6% of COVID19 patients and in temporal association with respiratory failure. The mortality rate for AKI is 35% [22]. The causes of kidney involvement could be multifactorial. Besides cardio-renal syndrome, virus particles are observed in renal endothelial cells [42], tubular epithelium, and podocytes through an angiotensin converting enzyme 2-dependent pathway [43], suggesting a direct contribution of viremia to AKI. Furthermore, hyperinflammation, macrophage activation and

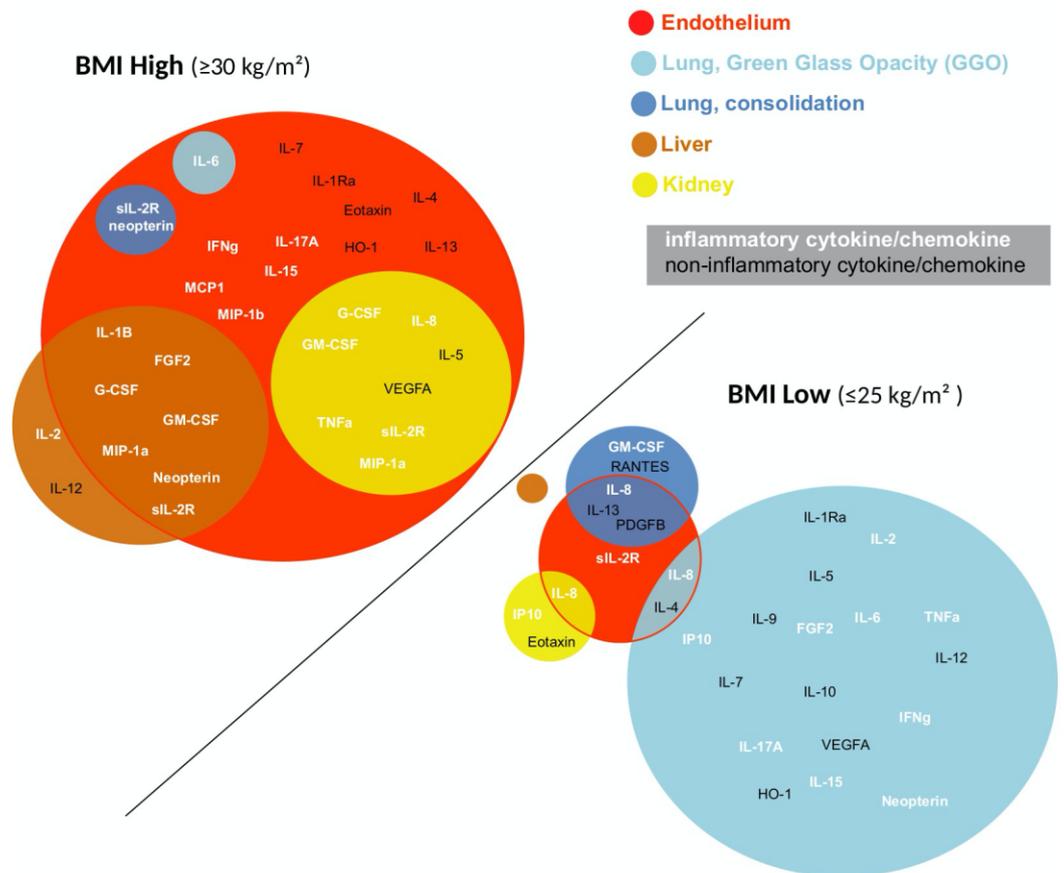


Fig 6. Diagram representing the cytokines correlated with multiorgan damage of endothelial vessels, lung (consolidation and GGO), liver, and kidney in patients with obesity (BMI ≥ 30) as compared to normal-weight patients (BMI < 25). Inflammatory cytokines are illustrated in white and noninflammatory in black.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252026.g006>

microthrombi in the context of endotheliitis have been suspected to contribute to AKI. We did not evidence correlation between viremia and the extent of AKI ($r = 0.14$, $p = 0.35$), arguing against a significant impact of SARS-CoV-2 viremia on kidney function. We showed an association between many inflammatory cytokines and kidney dysfunction, the greater part of which may be produced by activated type 1 macrophages. This association was strengthened in patients with BMI ≥ 30 .

Endothelial dysfunction has been reported as a main physiopathological feature in COVID-19, revealed by different histopathological studies [44, 45] and partially explained by the high endothelial expression of angiotensin converting enzyme 2, the SARS-CoV-2 receptor [46]. Moreover, human obesity is associated with vascular endothelial dysfunction due to oxidative stress, inflammation, and the enzymatic pathways involving perivascular adipose tissue and vasculature [17, 47, 48]. Consistent with these studies, we observed a positive correlation between markers associated with endothelial dysfunction and BMI, suggesting that endotheliitis may occur more frequently in patients with obesity. Accordingly, the levels of numerous inflammatory cytokines were associated with endothelial dysfunction in patients with obesity. It can be hypothesized that patients with obesity are more susceptible to the SARS-CoV-2 infection of endothelial cells and/or have sensitized endothelium more prone to microvascular lesions under inflammatory cytokines. Strikingly, dysfunction of kidney and liver in patients

with obesity involved a common subset of cytokines to that observed with endothelial dysfunction, suggesting physiopathological similarities. Hyperinflammation observed in patients without obesity did not correlate with biological signs of endothelial dysfunction, but was strongly associated with the early signs of lung damage, evidenced by the occurrence of GGO on CT scans.

There are limitations to our study. First, the small number of studied patients leading to low statistical power, however, an extensive immune exploration allowed us to confirm the trends observed. Second, all patients presented with a severe form of the disease. A controlled group composed of patients who received home care or of high-risk patients who benefited from an early extensive immunomonitoring before the emergence of ARDS would have provided important information to decipher mechanisms initiating the cytokinic storm. However, our results showing a comparable cytokine landscape and viremia among different BMI groups and a differential impact of hyperinflammation on vital organs functions in patients with obesity, the latter possibly due to a higher endothelial susceptibility, may help to better identify and manage patients who are at higher-risk for severe form of COVID-19.

Supporting information

S1 Table. Description of the antibodies used in flow cytometry experiments.

(PDF)

S2 Table. Respiratory distress of patients without COPD.

(PDF)

S3 Table. Biological characteristics.

(PDF)

S4 Table. Cytokine levels in healthy donors and patients at admission.

(PDF)

S5 Table. Cytokine levels at admission and correlation to BMI (as continuous variable).

(PDF)

S1 Fig. Box plots illustrating a significant increase of the cytokines concentration in COVID-19 patients (n = 15) according to the level of respiratory functional status (the WHO scale). The cytokines levels of healthy donors (n = 18) are shown. The colored squares associated with each cytokine illustrate the different orientations of the immune response.

(*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

(PDF)

S2 Fig. Box plots illustrating the concentration of cytokines at admission according to the sex of COVID-19 patients (n = 42). Wilcoxon-MannWhitney tests used for pairwise comparisons followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. * P value <0.05.

(PDF)

S3 Fig. Box plots illustrating the zenith (maximum concentration) of each cytokine measured from day 1 to day 14, according to the BMI levels in COVID-19 patients (n = 51).

Wilcoxon-Mann-Whitney tests used for pairwise comparisons followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. * Pvalue <0.05.

(PDF)

S4 Fig. Box plots illustrating the concentration of cytokines according to corticosteroids administration to COVID-19 patients (n = 51). Wilcoxon Mann-Whitney test used for

pairwise comparisons followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. (PDF)

S5 Fig. (A). Percentage and absolute number (mean \pm standard deviation) of lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, NK-T cells, T lymphocytes, CD4 and CD8 T cell subsets; classical, intermediate and non-classical, CD163 and CD163 monocytes. **(B)** Bar plots representing the percentage of different clusters identified by Excyted pipeline in COVID-19 patients according to the BMI categories (above and below the median BMI of 26.8). Exact p value is reported if significant. (PDF)

S6 Fig. Box plots illustrating the concentration of cytokines according to HSI levels in COVID-19 patients (n = 51). Wilcoxon-Mann-Whitney test used for pairwise comparisons followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. (PDF)

S7 Fig. Box plots illustrating the concentration of cytokines according to the sex, age, arterial hypertension, diabetes, COPD among BMI > 30 COVID-19 patients. Wilcoxon-Mann-Whitney tests used for pairwise comparisons followed by the Benjamini Hochberg test for multiple testing correction. (PDF)

S1 Data.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Fremeaux-Bacchi Veronique for expert advice concerning immune analyses and to acknowledge Magdalena Benetkiewicz (Sc.D.) for the editorial assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Marie-Agnès Dragon-Durey, Franck Pagès.

Data curation: Marie-Agnès Dragon-Durey, Xiaoyi Chen, Etienne Charpentier, Yannick Binois, Florence Marliot, Maxime Meylan, Clémence Granier, Hélène Pere, Antonin Saldmann, Bastien Rance, Anne Sophie Jannot, Stéphanie Baron, Mouna Chebbi, Antoine Fayol, Nathalie Josseume, Claire Rives-Lange, Pierre-Louis Tharaux, Bernard Cholley, Jean-Luc Diehl, Jean-Benoît Arlet, Michel Azizi, Alexandre Karras, Sébastien Czernichow, David M. Smadja, Jean-Sébastien Hulot, Isabelle Cremer, Eric Tartour, Elie Mousseaux, Franck Pagès.

Formal analysis: Xiaoyi Chen, Amos Kirilovsky, Bastien Rance, Anne Sophie Jannot.

Funding acquisition: Franck Pagès.

Investigation: Nadine Ben Hamouda, Carine El Sissy, Jules Russick, Etienne Charpentier, Yannick Binois, Florence Marliot, Maxime Meylan, Clémence Granier, Hélène Pere, Antonin Saldmann, Bastien Rance, Anne Sophie Jannot, Stéphanie Baron, Mouna Chebbi, Antoine Fayol, Nathalie Josseume, Claire Rives-Lange, Pierre-Louis Tharaux, Bernard Cholley, Jean-Luc Diehl, Jean-Benoît Arlet, Michel Azizi, Alexandre Karras, Sébastien Czernichow, David M. Smadja, Jean-Sébastien Hulot, Isabelle Cremer, Eric Tartour, Elie Mousseaux, Franck Pagès.

Methodology: Xiaoyi Chen, Amos Kirilovsky, Nadine Ben Hamouda, Franck Pagès.

Project administration: Franck Pagès.

Resources: Franck Pagès.

Supervision: Marie-Agnès Dragon-Durey, Franck Pagès.

Validation: Marie-Agnès Dragon-Durey, Xiaoyi Chen, Amos Kirilovsky, Nadine Ben Hamouda, Carine El Sissy, Jules Russick, Etienne Charpentier, Yannick Binois, Florence Marliot, Maxime Meylan, Clémence Granier, Hélène Pere, Antonin Saldmann, Bastien Rance, Anne Sophie Jannot, Stéphanie Baron, Mouna Chebbi, Antoine Fayol, Nathalie Josseaume, Claire Rives-Lange, Pierre-Louis Tharoux, Bernard Cholley, Jean-Luc Diehl, Jean-Benoît Arlet, Michel Azizi, Alexandre Karras, Sébastien Czernichow, David M. Smadja, Jean-Sébastien Hulot, Isabelle Cremer, Eric Tartour, Elie Mousseaux, Franck Pagès.

Visualization: Xiaoyi Chen, Amos Kirilovsky, Franck Pagès.

Writing – original draft: Marie-Agnès Dragon-Durey, Franck Pagès.

Writing – review & editing: Marie-Agnès Dragon-Durey, Xiaoyi Chen, Amos Kirilovsky, Nadine Ben Hamouda, Carine El Sissy, Jules Russick, Etienne Charpentier, Yannick Binois, Florence Marliot, Maxime Meylan, Clémence Granier, Hélène Pere, Antonin Saldmann, Bastien Rance, Anne Sophie Jannot, Stéphanie Baron, Mouna Chebbi, Antoine Fayol, Nathalie Josseaume, Claire Rives-Lange, Pierre-Louis Tharoux, Bernard Cholley, Jean-Luc Diehl, Jean-Benoît Arlet, Michel Azizi, Alexandre Karras, Sébastien Czernichow, David M. Smadja, Jean-Sébastien Hulot, Isabelle Cremer, Eric Tartour, Elie Mousseaux, Franck Pagès.

References

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z> PMID: 32123347
2. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579: 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> PMID: 32015507
3. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2020; 8: 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5) PMID: 32105632
4. Chatenoud L, Ferran C, Reuter A, Legendre C, Gevaert Y, Kreis H, et al. Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. *N Engl J Med.* 1989; 320: 1420–1421. <https://doi.org/10.1056/NEJM198905253202117> PMID: 2785642
5. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 2020; 395: 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7) PMID: 32007143
6. Nayak A, Islam SJ, Mehta A, Ko Y-A, Patel SA, Goyal A, et al. Impact of Social Vulnerability on COVID-19 Incidence and Outcomes in the United States. *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.20060962> PMID: 32511437
7. Onder G, Rezza G, Brusaferro S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA.* 2020 [cited 16 Jul 2020]. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4683> PMID: 32203977
8. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet.* 2020; 395: e30–e31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30304-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30304-4) PMID: 32032529

9. Czernichow S, Beeker N, Rives-Lange C, Guerot E, Diehl J-L, Kalsahian S, et al. Obesity doubles mortality in patients hospitalized for SARS-CoV-2 in Paris hospitals, France: a cohort study on 5795 patients. *Obesity* (Silver Spring). 2020. <https://doi.org/10.1002/oby.23014> PMID: 32815621
10. Simonnet A, Chelboun M, Poissy J, Raverdy V, Noulette J, Duhamel A, et al. High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity* (Silver Spring). 2020; 28: 1195–1199. <https://doi.org/10.1002/oby.22831> PMID: 32271993
11. Caussy C, Wallet F, Laville M, Disse E. Obesity is Associated with Severe Forms of COVID-19. *Obesity* (Silver Spring). 2020; 28: 1175. <https://doi.org/10.1002/oby.22842> PMID: 32314861
12. Gao F, Zheng KI, Wang X-B, Sun Q-F, Pan K-H, Wang T-Y, et al. Obesity Is a Risk Factor for Greater COVID-19 Severity. *Diabetes Care*. 2020; 43: e72–e74. <https://doi.org/10.2337/dc20-0682> PMID: 32409499
13. Frühbeck G, Baker JL, Busetto L, Dicker D, Goossens GH, Halford JCG, et al. European Association for the Study of Obesity Position Statement on the Global COVID-19 Pandemic. *Obes Facts*. 2020; 13: 292–296. <https://doi.org/10.1159/000508082> PMID: 32340020
14. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921> PMID: 21252989
15. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology*. 2018; 68: 349–360. <https://doi.org/10.1002/hep.29721> PMID: 29222917
16. Kugelmas M. Cytokines and NASH: A pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology*. 2003; 38: 413–419. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50316> PMID: 12883485
17. Niederreiter L, Tilg H. Cytokines and fatty liver diseases. *Liver Research*. 2018; 2: 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.03.003>
18. Lambrecht J, Tacke F. Controversies and Opportunities in the Use of Inflammatory Markers for Diagnosis or Risk Prediction in Fatty Liver Disease. *Front Immunol*. 2020; 11: 634409. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.634409> PMID: 33633748
19. Srinivas AN, Suresh D, Santhekadur PK, Suvarna D, Kumar DP. Extracellular Vesicles as Inflammatory Drivers in NAFLD. *Front Immunol*. 2020; 11: 627424. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.627424> PMID: 33603757
20. Singh M, Benencia F. Inflammatory processes in obesity: focus on endothelial dysfunction and the role of adipokines as inflammatory mediators: We reviewed obesity-induced metabolic and immunological changes at the level of vasculature and emphasize on the importance of adipokines. *International Reviews of Immunology*. 2019; 38: 157–171. <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1638921> PMID: 31286783
21. Boettler T, Newsome PN, Mondelli MU, Maticic M, Cordero E, Cornberg M, et al. Care of patients with liver disease during the COVID-19 pandemic: EASL-ESCMID position paper. *JHEP Reports*. 2020; 2: 100113. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100113> PMID: 32289115
22. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL, et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney International*. 2020; 98: 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.006> PMID: 32416116
23. Korakas E, Ikonomidis I, Kousathana F, Balampanis K, Kountouri A, Raptis A, et al. Obesity and COVID-19: immune and metabolic derangement as a possible link to adverse clinical outcomes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2020; 319: E105–E109. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00198.2020> PMID: 32459524
24. Liang T, Liu Z, Wu CC, Jin C, Zhao H, Wang Y, et al. Evolution of CT findings in patients with mild COVID-19 pneumonia. *Eur Radiol*. 2020 [cited 22 May 2020]. <https://doi.org/10.1007/s00330-020-06823-8> PMID: 32291502
25. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology*. 2020; 295: 200463. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200463> PMID: 32077789
26. Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 7392–7402. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7392> PMID: 24966609
27. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *arXiv:180203426 [cs, stat]*. 2020 [cited 30 Oct 2020]. <http://arxiv.org/abs/1802.03426>
28. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israël-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, et al. Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation*. 2009; 119: 374–381. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.808246> PMID: 19139384

29. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect*. 2020; 81: e6–e12. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.002> PMID: 32283162
30. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020; 221: 1762–1769. <https://doi.org/10.1093/infdis/jaa150> PMID: 32227123
31. Cordeiro A, Costa R, Andrade N, Silva C, Canabrava N, Pena MJ, et al. Does adipose tissue inflammation drive the development of non-alcoholic fatty liver disease in obesity? *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2020; S2210740119302220. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.10.001> PMID: 32044284
32. Kooistra EJ, de Nooijer AH, Claassen WJ, Grondman I, Janssen NAF, Netea MG, et al. A higher BMI is not associated with a different immune response and disease course in critically ill COVID-19 patients. *Int J Obes (Lond)*. 2021; 45: 687–694. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00747-z> PMID: 33495522
33. Favalaro EJ, Lippi G. Recommendations for Minimal Laboratory Testing Panels in Patients with COVID-19: Potential for Prognostic Monitoring. *Semin Thromb Hemost*. 2020; 46: 379–382. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709498> PMID: 32279286
34. Gong MN, Bajwa EK, Thompson BT, Christiani DC. Body mass index is associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Thorax*. 2010; 65: 44–50. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.117572> PMID: 19770169
35. Kang A, Sukkar L, Hockham C, Jun M, Young T, Scaria A, et al. Risk Factors for Incident Kidney Disease in Older Adults: an Australian Prospective Population-Based Study. *Intern Med J*. 2020. <https://doi.org/10.1111/imj.15074> PMID: 33012112
36. Hermine O, Mariette X, Tharaux P-L, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, et al. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized With COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6820> PMID: 33080017
37. Gupta S, Wang W, Hayek SS, Chan L, Mathews KS, Melamed ML, et al. Association Between Early Treatment With Tocilizumab and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6252> PMID: 33080002
38. Salvarani C, Dolci G, Massari M, Merlo DF, Cavuto S, Savoldi L, et al. Effect of Tocilizumab vs Standard Care on Clinical Worsening in Patients Hospitalized With COVID-19 Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6615> PMID: 33080005
39. Jothimani D, Venugopal R, Abedin MF, Kaliamoorthy I, Rela M. COVID-19 and the liver. *J Hepatol*. 2020; 73: 1231–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.006> PMID: 32553666
40. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*. 2020; 130: 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244> PMID: 32217835
41. Bermejo-Martin JF, González-Rivera M, Almansa R, Micheloud D, Tedim AP, Domínguez-Gil M, et al. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit Care*. 2020; 24: 691. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03398-0> PMID: 33317616
42. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395: 1417–1418. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5) PMID: 32325026
43. Su H, Yang M, Wan C, Yi L-X, Tang F, Zhu H-Y, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. 2020; 98: 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.04.003> PMID: 32327202
44. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Deigendesch H, Frank S, et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology*. 2020. <https://doi.org/10.1111/his.14134> PMID: 32364264
45. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020; S1473309920304345. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30434-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30434-5) PMID: 32526193
46. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020; 46: 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9> PMID: 32125455

47. Graupera M, Claret M. Endothelial Cells: New Players in Obesity and Related Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 2018; 29: 781–794. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.003> PMID: 30266200
48. Viridis A, Masi S, Colucci R, Chiriaco M, Uliana M, Puxeddu I, et al. Microvascular Endothelial Dysfunction in Patients with Obesity. *Curr Hypertens Rep.* 2019; 21: 32. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0930-2> PMID: 30949772

Article Covid n°3 :

L'objectif principal de cette étude menée sur 36 patients hospitalisés atteints de COVID-19 (moyenne d'âge = 62 ans) était de distinguer et de caractériser les profils immunitaires présents chez les patients atteints de COVID-19 en fonction de la gravité de la maladie (9 patients hospitalisés en réanimation vs 27 patients en hospitalisation classique, ne nécessitant pas une assistance ventilatoire). Une cohorte contrôle de 10 donneurs sains a également été constituée.

Une analyse approfondie des paramètres immunitaires incluant des analyses de cytométrie en flux, le dosage de cytokines plasmatiques et des données transcriptomiques des cellules mononuclées du sang circulant a été initiée. Les variables cliniques reflétant les atteintes multi-organes (poumon, foie, rein, cardiovasculaire) ont également été collectées.

Principales observations :

- Présence d'un profil immunitaire spécifique chez les patients COVID-19 en comparaison aux donneurs sains, avec une forte hétérogénéité parmi les patients hospitalisés atteints de COVID-19, tant en termes de populations immunitaires que d'état d'activation : lymphopénie T et B, absence de différence en termes de lymphocytes NK et NKT, profil phénotypique des monocytes évoquant une sur-activation phénotypique ou réponse anti-inflammatoire compensatrice (CD16^{HI}, CD40^{HI}, CD163^{HI}, HLA-DR^{LO}).
- Identification d'une signature immunitaire permettant d'identifier 2 groupes de patients : i/ patients présentant une réponse de type adaptative et ii/ patients présentant une réponse innée avec un dysfonctionnement de la réponse adaptative
- Les patients du groupe 2 avaient un IMC (indice de masse corporelle) plus élevé par rapport au groupe 1, ils présentaient également une présentation clinique plus sévère de la maladie avec 88% des décès totaux présents dans ce groupe.
- Confirmation de cette signature immunitaire sur des données transcriptomiques d'une base de données publique (GSE157103) : les patients du groupe 2 avaient un moins bon devenir clinique que les patients du groupe 1.
- Élaboration d'un "SARS-Score" permettant une classification précise des patients.

- Enfin, après validation de la signature sur des données publiques, nous avons utilisé des outils *in silico* pour proposer une médecine personnalisée en COVID-19, qui pourrait correspondre spécifiquement à chaque groupe de patients.



Immune Signature Linked to COVID-19 Severity: A SARS-Score for Personalized Medicine

Jules Russick¹, Pierre-Emmanuel Foy¹, Nathalie Josseaume¹, Maxime Meylan¹, Nadine Ben Hamouda^{2,3,4}, Amos Kirilovsky^{2,3,4}, Carine El Sissy^{2,3,4}, Eric Tartour⁵, David M. Smadja^{6,7}, Alexandre Karras^{8,9}, Jean-Sébastien Hulot^{10,11}, Marine Livrozet^{10,11}, Antoine Fayol^{10,11}, Jean-Benoit Arlet^{9,12}, Jean-Luc Diehl^{13,14}, Marie-Agnès Dragon-Durey^{1,2,3,4}, Franck Pagès^{2,3,4} and Isabelle Cremer^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Kensuke Miyake,
The University of Tokyo, Japan

Reviewed by:

Martyn Andrew French,
University of Western Australia,
Australia
Venkata Bollimpelli,
Emory University, United States

*Correspondence:

isabelle.cremer@sorbonne-
universite.fr
orcid.org/0000-0002-0963-1031

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 27 April 2021

Accepted: 28 June 2021

Published: 12 July 2021

Citation:

Russick J, Foy P-E, Josseaume N, Meylan M, Hamouda NB, Kirilovsky A, Sissy CE, Tartour E, Smadja DM, Karras A, Hulot J-S, Livrozet M, Fayol A, Arlet J-B, Diehl J-L, Dragon-Durey M-A, Pagès F and Cremer I (2021) Immune Signature Linked to COVID-19 Severity: A SARS-Score for Personalized Medicine. *Front. Immunol.* 12:701273. doi: 10.3389/fimmu.2021.701273

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université de Paris, Team Inflammation, Complement and Cancer, Paris, France, ² Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, Université de Paris, Paris, France, ³ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université de Paris, Team Integrative Cancer Immunology F-75006, Paris, France, ⁴ Sorbonne Université, Paris, France, ⁵ Department of Immunology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France, ⁶ Université de Paris, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, Hematology Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation) Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre-Université de Paris (APHP-CUP), Paris, France, ⁷ F-CRiN iNOVTE, Saint-Etienne, France, ⁸ Department of Nephrology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France, ⁹ Department of Nephrology, Université de Paris, Paris, France, ¹⁰ Université de Paris, INSERM, PARCC, Paris, France, ¹¹ CIC1418 and DMU CARTE, AP-HP, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France, ¹² Department of Internal Medicine, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France, ¹³ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Paris, France, ¹⁴ Intensive Care Unit and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

SARS-CoV-2 infection leads to a highly variable clinical evolution, ranging from asymptomatic to severe disease with acute respiratory distress syndrome, requiring intensive care units (ICU) admission. The optimal management of hospitalized patients has become a worldwide concern and identification of immune biomarkers predictive of the clinical outcome for hospitalized patients remains a major challenge. Immunophenotyping and transcriptomic analysis of hospitalized COVID-19 patients at admission allow identifying the two categories of patients. Inflammation, high neutrophil activation, dysfunctional monocytic response and a strongly impaired adaptive immune response was observed in patients who will experience the more severe form of the disease. This observation was validated in an independent cohort of patients. Using *in silico* analysis on drug signature database, we identify differential therapeutics that specifically correspond to each group of patients. From this signature, we propose a score—the SARS-Score—composed of easily quantifiable biomarkers, to classify hospitalized patients upon arrival to adapt treatment according to their immune profile.

Keywords: COVID-19, immunologic profile, personalized medicine/personalized health care, score, therapeutic strategy

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, has affected over 118 million people and is responsible for 2.6 million deaths since the beginning of the pandemic (WHO, March, 11 2021). The clinical evolution of patients with SARS-CoV-2 infection is highly variable between individuals, ranging from asymptomatic state for the majority of patients to severe symptoms. Approximately 10 to 20% patients require hospitalization and intensive care units (ICU) admission mainly for acute respiratory distress syndrome (ARDS) or multi-organ failure (1, 2). Some factors increase the risk of COVID-19 severity comprising old age, male gender and cardiovascular comorbidities—diabetes, obesity and hypertension (3).

In severe COVID-19 patients, profound dysregulated immune responses have been described, characterized by strong systemic inflammation leading to acute injury of several organs including the lungs, the kidney and the heart (4–9). Severe or fatal COVID-19 is indeed associated with elevated innate pro-inflammatory immune cytokines in peripheral blood including interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, or C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL-10) (7, 10) and alterations of both innate and adaptive immunity (11–13). Patients with COVID-19 have profoundly impaired induction of types I and III IFNs, that lead to untuned antiviral response and viral persistence (14). Dysfunctional type I IFN immunity have been attributed to either inherited intrinsic genetic defects in double-stranded RNA sensor TLR3 and interferon regulatory factor 7 (IRF7) (15), or to the production of neutralizing auto-Abs against type I IFNs (16) in respectively, 3.5 and 10.2% of life-threatening COVID-19 patients. Severe dysfunctions in neutrophils and monocyte populations (17–20), lymphopenia and uncoordinated responses of the three arms of SARS-CoV-2 specific adaptive immunity (CD4⁺, CD8⁺ T cell responses and B cell antibody production) were reported in patients with acute COVID-19, particularly in patients >65 years old (21, 22).

While COVID-19 severity is associated with immune disorders, there is a lack of robust biomarkers that identify at admission groups of hospitalized patients who will experience poor clinical outcome. In addition, several immunomodulators (dexamethasone and anti-IL-6R) are currently proposed to patients, with controversies with respect to their efficacy and there is no consensus about the use of these immunomodulatory drugs (23–27). The use of dexamethasone for up to 10 days was however shown to reduce 28-day mortality compared to usual care in patients needing oxygen or receiving invasive mechanical ventilation at randomization (28).

The aim of the present study was to segregate and characterize hospitalized COVID-19 patients based on their immune profile. We therefore performed an extensive analysis of immune parameters on a cohort of hospitalized COVID-19 patients, integrating flow cytometry, transcriptomic data, and multiple clinical variables reflecting organ damages. We identified two groups of patients based on immune gene expression, that segregate with disease severity. We propose a combined association of easily quantifiable biomarkers, called “SARS-Score” that allow an accurate classification of the patients.

Finally, after validation of the signature on public data, we used *in silico* tools to propose a personalized medicine in COVID-19, that could specifically correspond to each group of patients.

MATERIALS AND METHODS

Patient's Cohort

A prospective observational cohort study of 36 adult patients (≥18 years old) with available samples admitted in the Georges Pompidou European Hospital (Paris, France) since March 2020 was analyzed in this study. All patients were diagnosed with COVID-19, i.e. positive for SARS-CoV-2 nucleic acid on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays of nasopharyngeal swab specimens, in accordance with the World Health Organization (WHO) COVID-19 technical guidance (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330854>). On admission, all patients required oxygen and 27 were admitted in the ICU with the need of invasive mechanical ventilation. This study was approved by the medical ethic committee (CERAPHP-5 approval number 00011928). Patients included in the present study, or their relatives, were informed that their medical data could be used for research purposes in accordance with the General Data Protection Regulation (EU 210 2016/679). Clinical and biological variables were obtained at admission, reflecting lung, liver, renal and cardiac function and hemostasis (Supplementary Table 6).

For each patient, the day after admission, blood was collected in PAXgene tubes (Promega, Madison, WI, USA) for further RNA extraction, or in citrate tubes for flow cytometry analyses. Plasma was frozen for assay of cytokine levels, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and frozen for further flow cytometry analysis. Samples from non-infected control subjects were purchased from the French Blood Establishment.

Flow Cytometry

Thawed cells were stained with live/dead for viability (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), monoclonal antibodies (mAbs) directed against CD3, CD209 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD14, CD16, CD19, CD56, CD86, CD299 (BD Biosciences), CD8, CD40, HLA-DR (BioLegend, San Diego, CA, USA) and CD163 (Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany), for 30' at 4°C in PBS and 10% FCS medium. Staining was acquired on Fortessa X20 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FlowJo software.

The unsupervised analysis was done using Excyted pipeline (<https://github.com/maximemeylan/Excyted>). Intensity values of events gated from live cells were normalized using the Logicle transformation. Unsupervised clustering and Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) were computed with 10,000 events for each sample using $k = 30$.

Luminex

Plasma cytokines were measured by Luminex technology (Bio-Plex, Bio-Rad, 27-Plex Assays panel, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions.

RNA Extraction

Total RNA was purified from frozen PBMCs of COVID-19 patients using the Maxwell 16 LEV simplyRNA Cells Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Cell pellets were dispersed in the chilled 1-Thioglycerol/Homogenization Solution. Total RNA was eluted in a low volume of 50 μ l, RNA quality and quantity were estimated on a NanoChip (Total Eukaryote RNA Assay Nano II Kit, Qiagen, Düsseldorf, Germany) by capillary electrophoresis (BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Samples with a RIN \geq 8 were considered suitable for Reverse Transcription and Real-Time PCR experiments.

Reverse Transcription

Reverse-transcriptions were carried out on the entire RNA sample in a 20 μ l total reaction volume with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (PN 4368814, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Concentration of cDNA was estimated with a Qubit 3.0 Fluorometer (Q33216, ThermoFisher).

Semi-Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Real-time PCR were performed with 40 ng of cDNA using the 2 \times TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) and 20 \times Taqman[®] Gene Expression Assay for the detection of human targets TLR3, TLR7, RIG-I, and MDA-5. Reactions took place in a Hard-Shell 384-well PCR plate (Biorad, Hercules, CA, USA) in a 10 μ l total reaction volume. Detection and semi-quantification of gene expression were performed on a CFX384 Touch[™] Real-Time PCR Detection Instrument (Biorad). Technical triplicates were carried out. Semi-quantitative real-time PCR results were analyzed with the dedicated CFX Manager software (Biorad). Data standardization was carried out using the Ct obtained for the Human GAPDH housekeeping gene. The Δ Ct were used to evaluate the differential expressions by estimation of the Fold Change.

nCounter[®] Gene Expression

The kit used for the Gene Expression analysis was the nCounter[®]Cancer Immune[™] Panel (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). A master mix was created by adding 70 μ l of hybridization buffer to cancer immune reporter code set tube. Hybridization step was performed in the nCounter 12-well Notched Strip Tubes. The following components were added respectively: 8 μ l of MasterMix, 100 ng of RNA in a volume of 5 μ l, 2 μ l of capture probe set. The tubes were immediately incubated 21 h in a pre-heated 65°C thermal cycler. Once removed from the thermal cycler, hybridization reactions were immediately processed with the nCounter Prep-station for purification step and immobilization in a cartridge. Finally, data collection was carried out in the nCounter[®] Digital Analyzer (FOV555).

Nanostring nCounter Data Analysis

Quality control of nCounter data was performed with the nSolver software developed by NanoString Technologies.

Samples with insufficient detection limit were excluded from the analysis. A hierarchical clustering was performed on the normalized nCounter data using Euclidean distance and the Ward method. Normalization was performed with the package NanoStringNorm (29). The nCounter data embed positives (6), negatives (8) and housekeeping genes (30) required to normalize data. The package gplots was used to generate a heatmap showing the hierarchical clustering and the relative genes expression. Principal component analysis on normalized nCounter data was performed with the package factoextra.

Differential gene expression analysis based on NanoString nCounter data was performed using the Nanostringdiff package version 1.20.0 (available from Bioconductor) (31). The normalization procedure and the identification of differentially expressed genes between groups were done using methods provided by the package. The adjusted p-values (q-values) were calculated using the Benjamini and Hochberg procedure (false discovery rate). Genes with q-value <0.05 and a fold change greater than 2 (log₂ fold change >1) or less than -2 (log₂ Fold change <-1) have been identified as overexpressed genes or underexpressed genes respectively. Volcano plot showing the results was generated with the package EnhancedVolcano.

Gene Enrichment Analysis

Enrichment analysis was performed using the package EnrichR downloaded from CRAN (32, 33). For tissue and cell signatures we used The Human Genome Atlas. For biological process and pathway signatures we used KEGG 2019 and Gene Ontology Biological Process 2018. For drug signatures we used DsigDB and signatures from the GEO Drug perturbation. Signatures were ordered according to the q-values and only the more significant signatures were considered relevant (q-values <0.05).

Public RNAseq Data (GSE157103)

In order to confirm our results on a larger cohort, we downloaded the TPM normalized RNA seq data from the GSE157103 dataset (34). The data include transcriptomic data from 100 COVID-19 patients (whole blood) and corresponding clinical annotations.

Statistical Analyses

The statistical analysis was performed using R 4.0.2 and appropriate packages available from CRAN or Bioconductor. For quantitative variables, we used the Mann-Whitney-Wilcoxon test to compare the distribution between two groups. For correlation analysis, we used the Spearman method. Correlation coefficient and p-values was calculated with the package hmisc and correlogram was generated with the package corplot.

RESULTS

COVID-19 Patient Clinical Characteristics, Immunophenotyping and Gene Expression Signature

We analyzed a prospective cohort of 36 hospitalized COVID-19 patients (mean age of 62 years) with a clinical course ranging

from moderate to severe disease, with nine patients hospitalized in the general ward and 27 needing ICU admission (**Supplementary Table 1**). We extensively collected clinical and routine laboratory tests on admission reflecting lung, liver, renal, cardiovascular functions and hemostasis.

We first compared the immune profiles of COVID-19 patients to those of 10 healthy donors (controls) by flow cytometry analysis of PBMCs (gating strategy shown in **Supplementary Figure 1**). We found lymphopenia with a decrease of both T and B cells numbers in COVID-19 patients, as previously reported (21), while no difference in NK and NKT cells (**Supplementary Figure 2A**). Monocytes, are not different in numbers, but display high expression of CD16, CD40, CD163 and a low expression of HLA-DR compared to healthy donors meaning either an over-activated phenotype or a compensatory anti-inflammatory response as CD86 is not upregulated in COVID patients (**Supplementary Figures 2B, C**). The expression level of the viral sensors TLR3, TLR7, DDX58 coding for RIG-I and interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) coding for MDA-5 were highly variable among patients (**Supplementary Figure 2D**). TLR7 was the sole sensor significantly overexpressed in COVID-19 patients as compared to controls.

The most important difference being observed for monocytes, we performed an unsupervised analysis of the flow cytometry data on CD14⁺ cells. We identified 19 clusters (**Supplementary Figure 3A**) of which 16 are significantly differentially represented between the control group and COVID-19 patients (eight clusters more abundant and eight less abundant), and showing different expression profiles of monocytes markers as shown in the heatmap representation (**Supplementary Figure 3B**). For each COVID-19 patient, we then correlated the percentages of each differentially represented cluster with the levels of cytokines and chemokines that were evaluated by luminex assay, markers of blood vessels and of organs dysfunctions and viral sensors expression. We found that over-represented clusters are correlated with inflammatory cytokines and chemokines (IL-6, IL-18, sIL-6Ra, sTNFR1, CXCL10, CCL2 and eotaxin) and markers of vessel inflammation, whereas a negative correlation was found between the under-expressed clusters and these inflammatory molecules (**Supplementary Figure 3C**).

Altogether, these data showed a distinct immune profile of COVID-19 patients as compared to healthy donors with a strong heterogeneity among hospitalized COVID-19 patients, both in terms of immune populations, activation status and viral sensors expression.

Immune Signature Identifies Two Groups of COVID-19 Patients

Hierarchical clustering of transcriptomic analysis of 730 immune related genes from PBMC of COVID-19 patients with available samples ($n = 25$) at admission and of 10 healthy donors, revealed a complete segregation between controls and patients, except for one patient who developed a moderate disease (WHO score = 4) with a short non-ICU hospitalization (**Figure 1A**). Overall, 35% of the immune related genes explored were differentially

expressed between patients and controls, with 178 genes overexpressed and 80 genes under-expressed (**Supplementary Tables 2 and 3**).

Strikingly, hospitalized COVID-19 patients segregated into two groups 1 and 2 (**Figure 1A**). Principal component analysis of transcriptomic features of whole blood at the onset of hospitalization revealed that group 1 (blue) was closer to healthy controls than group 2 (red) (**Figure 1B**). Delay between the onset of symptoms and sample collection (performed day 2 of hospitalization) was identical in the two groups (9.5 and 9.9 days for groups 1 and 2, respectively, P -value = 0.3672), indicating that transcriptomic differences were not due to temporal discrepancies. Seventy genes (i.e. signature A) and 45 genes (i.e. signature B) were significantly over-expressed and under-expressed, respectively, in group 2, as compared to group 1 patients (**Figure 1C** and **Supplementary Tables 4, 5**). Using the Venn-diagram representation, we identified that among the 39 genes differentially expressed between group 1, group 2 and controls, 34 belong to the group 2 and only four to the group 1, which confirms that group 2 is characterized by a specific gene expression signature. Moreover, we also showed that group 2 display the most important difference in number of genes differentially expressed between all COVID patients, or each group and controls (**Figure 1D**). Genes up-regulated in group 2 belong to signatures of myeloid cells, neutrophil activity, inflammatory response, TLR and type I IFN signaling pathways, and inhibition of T cell proliferation (i.e. arginase 1, PDL1, PDL2 and CD276/B7-H3), (**Figure 1E** and **Supplementary Table 4**). At the opposite, genes involved in CD8 and NK cell function, T cell activation, T helper (Th) differentiation, co-stimulatory receptors (TNFRSF4 (OX40), ICOSLG (ICOS ligand), TNFRSF18 (GITR) and TNFRSF11A (RANK)), and antigen presentation, were down-regulated in group 2 (signature B; **Figure 1F** and **Supplementary Table 5**). These results are compatible with the coexistence of patients with a distinct immune profile: (i) adaptive immune response triggering (i.e. group 1), (ii) exacerbated myeloid and innate responses, with dysfunctional adaptive immune response (i.e. group 2).

Clinical Outcome in Patient's Groups According to Immune Signature

Patients of group 2 did not differ from group 1 for age and diabetes, but have a higher body mass index compared to group 1 (**Supplementary Table 6**). The severity of respiratory distress in each group was estimated by the WHO score. Patients without oxygen therapy, oxygen by mask, or nasal prongs had a 4–5 WHO score, whereas patients requiring oxygen by NIV or high flow, mechanical ventilation or extracorporeal membrane oxygenation (reflecting a severe lung damage) had >6 WHO score. Strikingly, almost all patients (15/16; 94%) from group 2 had severe respiratory distress (>6 WHO score) as compared to 25% (2/8) in group 1 ($P = 0.0013$) (**Figure 2A**). Differential biological variables between the two groups, reflecting other vital organs and tissues (i.e. liver, kidney, heart and blood vessels) (**Supplementary Table 6**) were investigated. Among them Hepatic Steatosis Index (HSI) and prothrombin ratio (% PR)

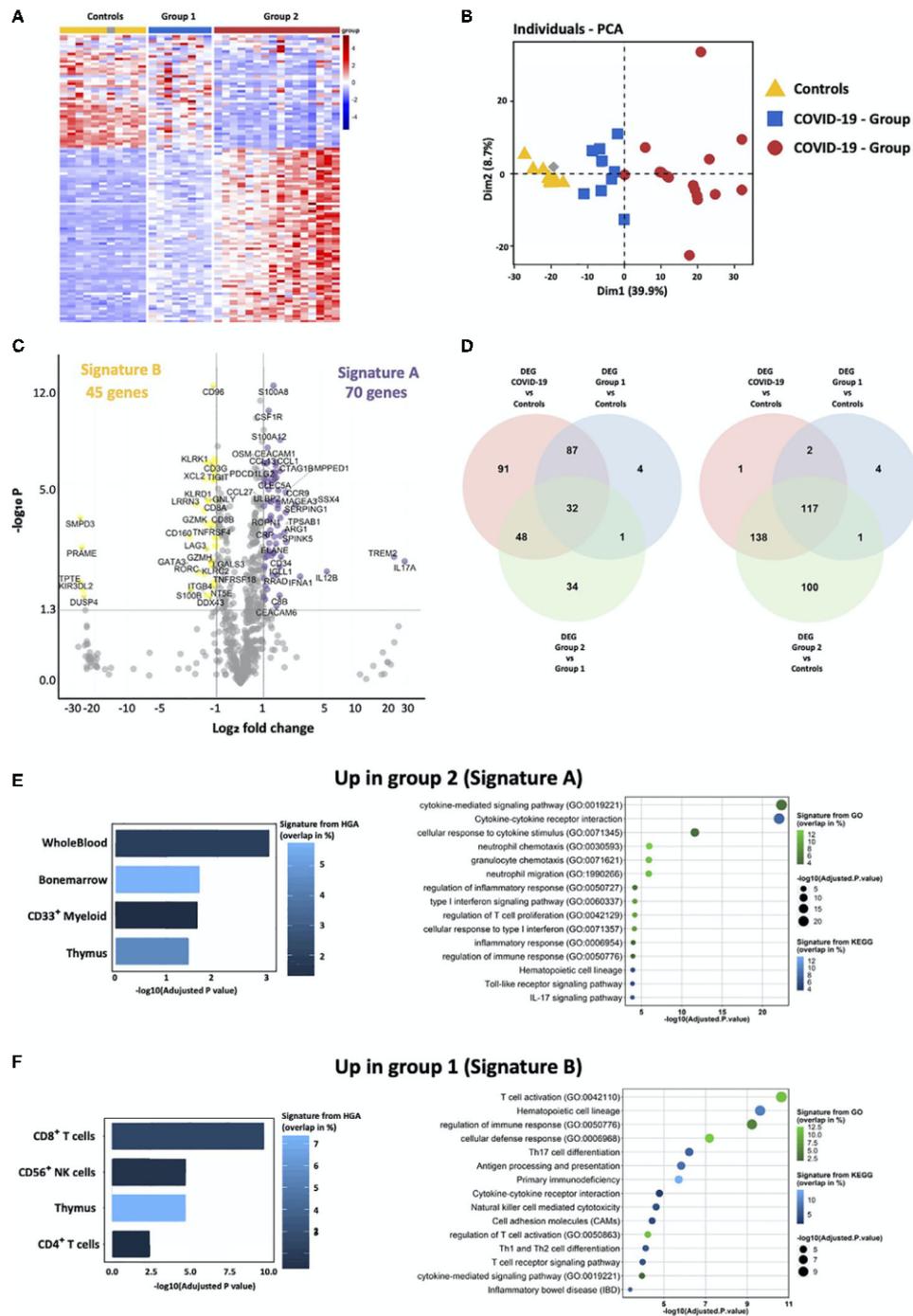


FIGURE 1 | Transcriptomic immune gene signature identifies two groups of COVID-19 patients. **(A)** Heatmap representation showing relative expression of immune genes by COVID-19 and controls reveals the presence of two groups of patients: group 1 (blue) and group 2 (red). **(B)** Principal component analysis of COVID-19 and controls shows that group 1 is intermediate between controls and group 2 COVID-19 patients. **(C)** Volcano Plot showing differentially expressed genes between group 2 and group 1. X axis displays fold changes between the two groups and Y axis displays the $-\log_{10}(p \text{ value})$. Differentially overexpressed genes (Signature A—highlighted in purple) and under-expressed genes (Signature B—highlighted in yellow) by group 2 as compared to group 1 patients were characterized by fold changes superior/inferior to 2 and with a significant p value (<0.05). **(D)** Venn diagrams showing common differentially expressed genes between group 1, group 2 and controls. **(E, F)** Enrichment analysis of genes of the signatures A and B (respectively up-regulated and down-regulated in group 2) using EnrichR and three different datasets. The histogram shows the first five more significant enriched signatures from The Human Genome Atlas (HGA) corresponding to tissue and cell signatures. The bubble plot shows the first 15 more significant enriched signatures from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) and Gene Ontology Biological process (GO), corresponding to biological pathway signatures. Signatures are ordered according to adjusted p-values, the color graduation shows the percentage of genes overlapping between the datasets signature and our own signature.

reflecting liver damage, urinary Na^+ and Na^+/K^+ reflecting kidney injury, troponin for cardiac damage, and E-selectin and placental growth factor (PIGF) reflecting the vessel status were significantly different in group 2 patients as compared to group 1 (**Figure 2B**). Overall, multi-organ failure, potentially exacerbated by endothelium damage and thrombosis was more pronounced in group 2 patients. Finally, 88% (7/8) of death belongs to group 2 (**Figure 2A**), underlying distinct clinical outcome associated with differential immune patterns of patients' groups.

We then compared the immune populations between both groups of COVID-19 patients. The group 2 was characterized by increased total leucocytes counts, with a profound lymphopenia, a decreased proportion of CD8^+ T cells and increased proportion of CD4^+ T cells, a decrease in NK cells and an increase of neutrophils (**Figure 2C**). In addition, group 2 patients presented with higher plasma level of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α , soluble TNF receptor 2 (sTNFR2)), of IL-4 and IL-7, and of anti-inflammatory heme oxygenase 1 (HMOX1) (**Figure 2D** and **Supplementary Table 7**). These data confirmed a higher inflammatory response, neutrophilia and reduced NK and T cell responses in group 2, whereas group 1 had a profile favoring an adaptive immune response. Of note, group 2 patients displayed a higher expression of TLR3 on PBMC (with no difference for TLR7, RIG-I and MDA-5) (**Figure 2D**).

Immune Gene Signature Identifies a Similar Group of Severe Patients in Public Cohort

In order to confirm our results, gene signatures A and B, on which we based the definition of patient's groups with distinct prognosis, we investigated an independent public cohort of 100 hospitalized COVID-19 patients, with available RNAseq (GSE157103) and clinical data sets. All the genes of the signature were not detected in the dataset, so we first verified whether the expressed genes of each signature were co-expressed in this public cohort dataset and performed a gene enrichment analysis to show that we keep the same enrichment signature. (**Supplementary Figure 4A**). This analysis confirmed that genes of the signature A correspond to myeloid and neutrophil signatures, complement and coagulation and negative regulation of T cell responses, whereas genes of the signature B correspond mainly to positive regulation of immune responses (antigen presentation, T and NK cell activation) (**Supplementary Figure 4B**).

Hierarchical clustering showed that gene signatures A and B segregated two groups of patients, as observed in our previous cohort (**Figure 3A**). Patients of group 2 compared to group 1 had higher comorbidity (Charlson score), longer duration of hospitalization, were more often hospitalized in ICU with higher ICU severity scores (APACHE II and SOFA), and required more often invasive mechanical ventilation (**Figure 3A**).

We finally calculated, for each patient, the correlation between the mean expression of signatures A and B and clinical and biological data related to severity of the disease. Interestingly, patients expressing signature B had no invasive mechanical ventilation and were not hospitalized in ICU, suggesting a milder form of COVID-19 infection (**Figure 3B**).

Biological markers of inflammation (CRP and fibrinogene) and of tissue injury (lactate), were also significantly correlated with the mean expression of signature A, which correspond to group 2 patients (**Figure 3C**).

These data confirm that the immune signatures, determined the second day of hospitalization, were able to classify patients and predict distinct clinical evolution.

Identification and Validation of a SARS-Score

We then searched for a minimal combination of immune gene signature and of clinical biomarkers which would make it possible to determine which patients are most at risk to evolve into a poor clinical outcome. To obtain the minimal combination of genes, we selected the ones for which the expression was the most discriminant between groups 1 and 2 (**Figure 4A**). We thus identified seven genes (CEACAM1, S100A8, S100A12, CSF1R, TLR5, CD59 and CD96) with less than 10% of distribution overlap between the two groups of patients. In parallel, we determined among clinical data, a combination of eight clinical variables that are easily obtainable in routine. To create a stringent score, we defined for each clinical biomarker, a threshold corresponding to a classification in group 1 or 2 (**Figure 4B**). These thresholds correspond to the extreme quartiles (first and last 25%) of the total distribution among the cohort. Combined together, these biomarkers constitute a powerful score, called SARS-Score, that could be useful to guide therapeutic management of severe patients.

We validated clinical part of this score on another cohort of 51 COVID-19 hospitalized patients (from HEGP hospital) and were able to classify 48 of them in group 1 or 2 (**Figure 4C**). We confirmed that group 2 patients of this cohort are characterized by a high WHO score (96.6% >6 for group 2, 10.5% >6 for group 1); $p = 9.6e-09$, ICU hospitalization (100% in ICU for group 2, 31.6% for group 1; $p = 1.24e-07$), high rate of death (41% for group 2, 21% for group 1; $p = 0.12$) (**Supplementary Figure 5**).

Identification of Potential Therapeutic Targets

We then investigated which drugs could be beneficial for each group of patients. To this end, we performed a drug-set enrichment analysis using EnrichR and drug signature databases (DsigDB (35) and GEO). Those databases include genes differentially expressed after drug treatment which induced a phenotype of interest by its action on known or unknown (off-target effects) targets, resulting in modification of gene expression. The objective of this approach is to identify drugs that would induce the downregulation of signature A (**Figure 5A**) and the upregulation of signature B (**Figure 5B**). Most of the drugs identified with this approach were immunomodulatory drugs. We found two inhibitors of cytokines: Tocilizumab (anti-IL-6 receptor) and Etanercept (anti-TNF- α receptor), glucocorticoids (dexamethasone, prednisolone and hydrocortisone), anti-inflammatory (aspirin, curcumin and parthenolide) and immunosuppressive (tacrolimus and mycophenolate) drugs. We also identify repurposed drugs with immunomodulatory properties like imatinib, thalidomide,

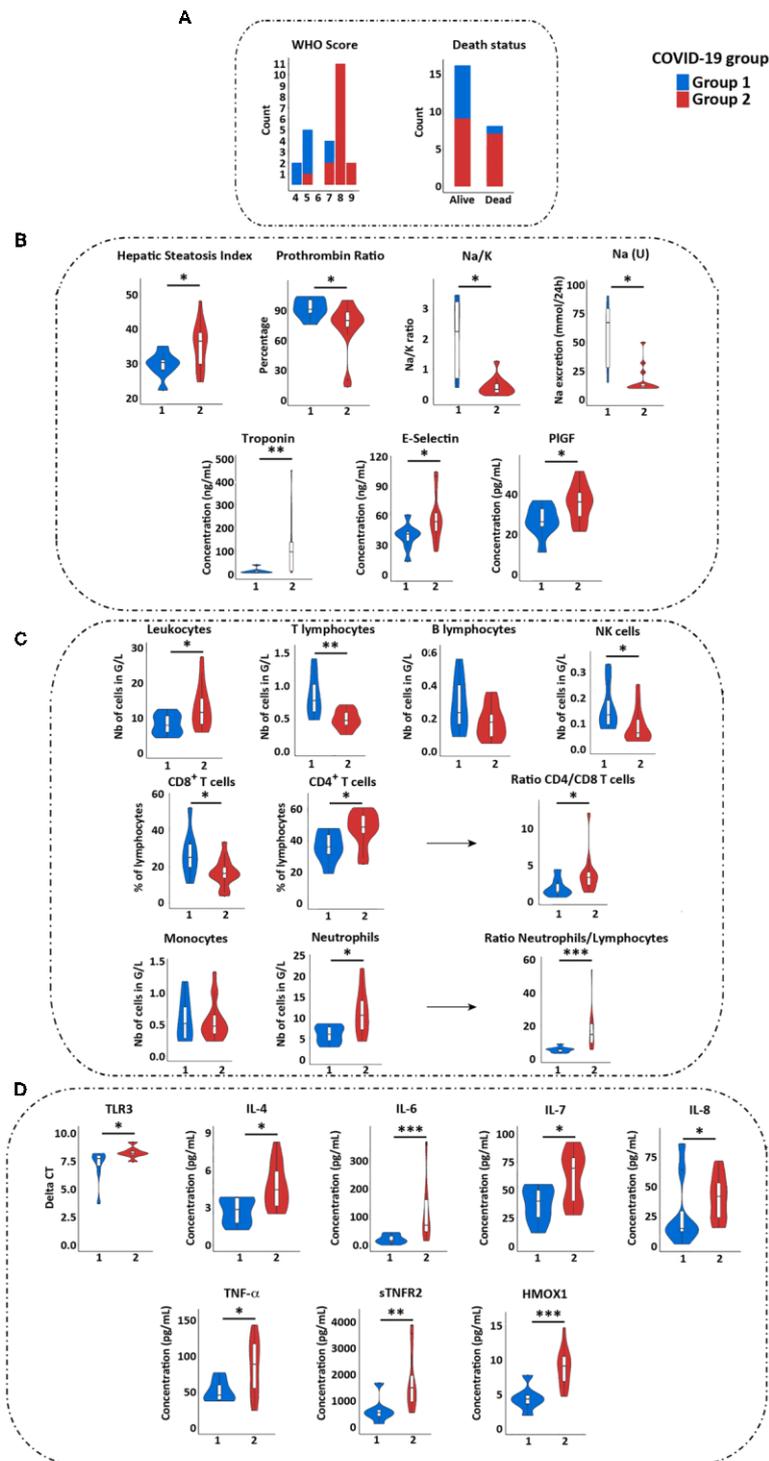


FIGURE 2 | Immune and clinical characteristics of groups 1 and 2 COVID-19 patients. **(A)** Comparison of WHO score, of need for ICU hospitalization and of death status between group 1 (blue) and 2 (red) patients. **(B)** Comparison of clinical values reflecting liver (HSI and prothrombin ratio), renal [Na/K and Na (U)], cardiac function (troponin), and blood vessels (E-selectin and PIGF) between groups 1 and 2 patients. Only the values showing significant differences between the two groups are shown. **(C)** Comparison of immune cells quantification in groups 1 and 2 patients. **(D)** Comparison of TLR3 expression and cytokines quantification in two groups of patients (by Luminex assay). Statistical analyses were performed by Wilcoxon test using GraphPad software. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ICU, Intensive Care Unit; PIGF, Placental Growth Factor.

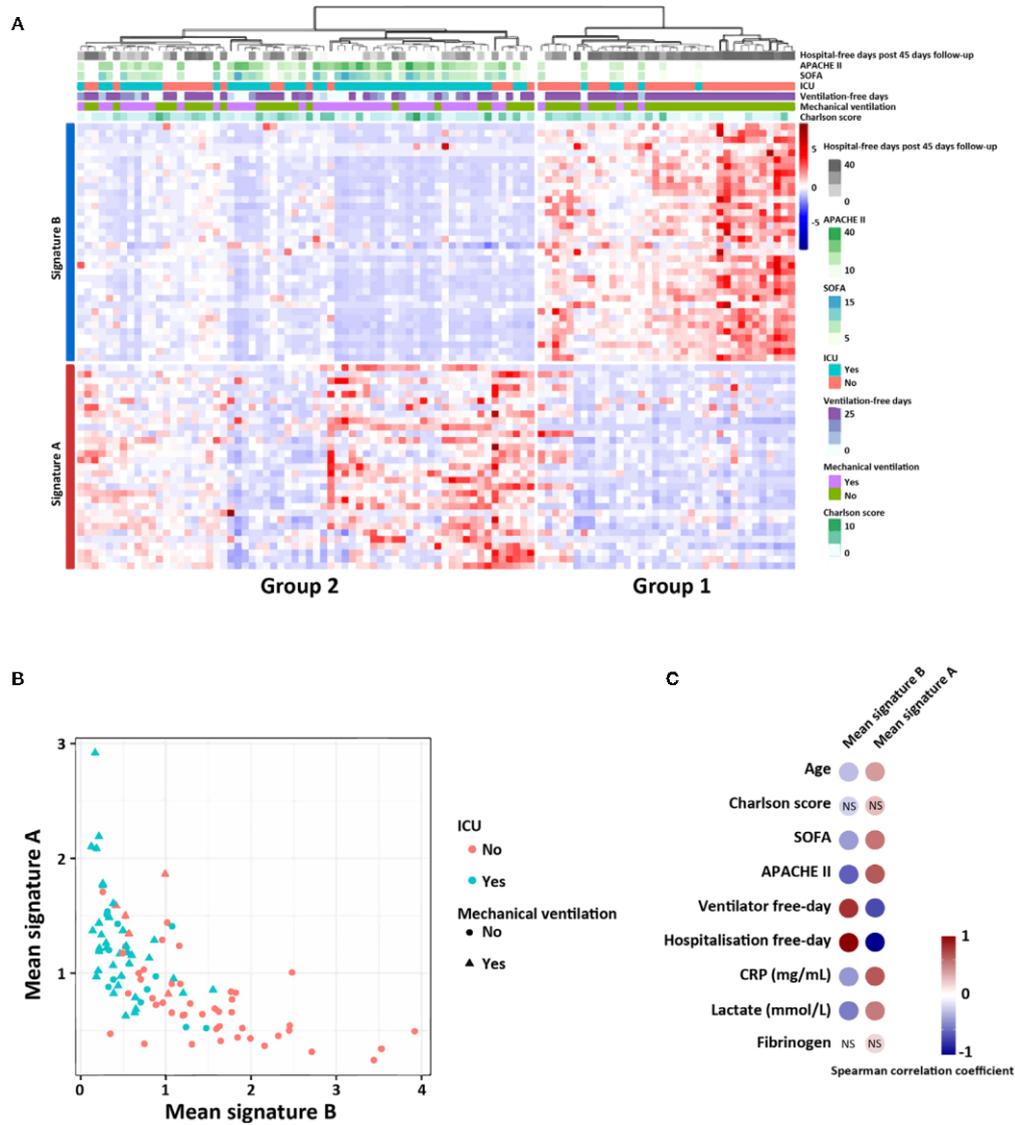


FIGURE 3 | Signatures A and B identify two groups of patients in a public COVID-19 patient cohort (RNAseq data). **(A)** Heatmap showing relative expression of the gene signature and hierarchical clustering of COVID-19 patients with clinical and biological annotation. **(B)** Mean expression of the signatures A and B according to type of service hospitalization (ICU or not) and the need of mechanical ventilation (yes or not). **(C)** Significant correlation between the mean expression of—signatures A and B with the different clinical scores and biological values. Correlations were determined with the spearman correlation coefficient. NS, not significant.

isotretinoin, atorvastatin, vemurafenib and rosiglitazone. Interestingly, most of these drugs are being tested in clinical trials (Table 1) but further investigations are needed to confirm a potential benefit effect in COVID-19 patients. Nevertheless, these results highlight the importance of administering immunomodulatory therapies specifically to patients of group 2.

DISCUSSION

While immune characterization of the severe COVID-19 patients is now quite precise, notably dysregulated responses with a strong inflammation and a defect of IFN response (36, 37),

a few immunologic studies on predictive factors of the clinical outcome and drug selection have been made (38, 39).

Different molecules of interest were pointed out that could be targeted in severe COVID-19 patients. A multi-omics analysis identified 219 molecules highly correlated with COVID-19 status and severity, involved in complement system activation, dysregulated lipid transport and neutrophil activation, vessel damage and blood coagulation (34). The chemokine CXCL10 has also been identified as a plasma biomarker of impaired CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in acute COVID-19 (22), and S100A8 and S100A9 alarmins, known to be released by myeloid cells in inflammatory situations, are biomarkers of monocytes and neutrophil subsets alterations (20). Finally, a recent study

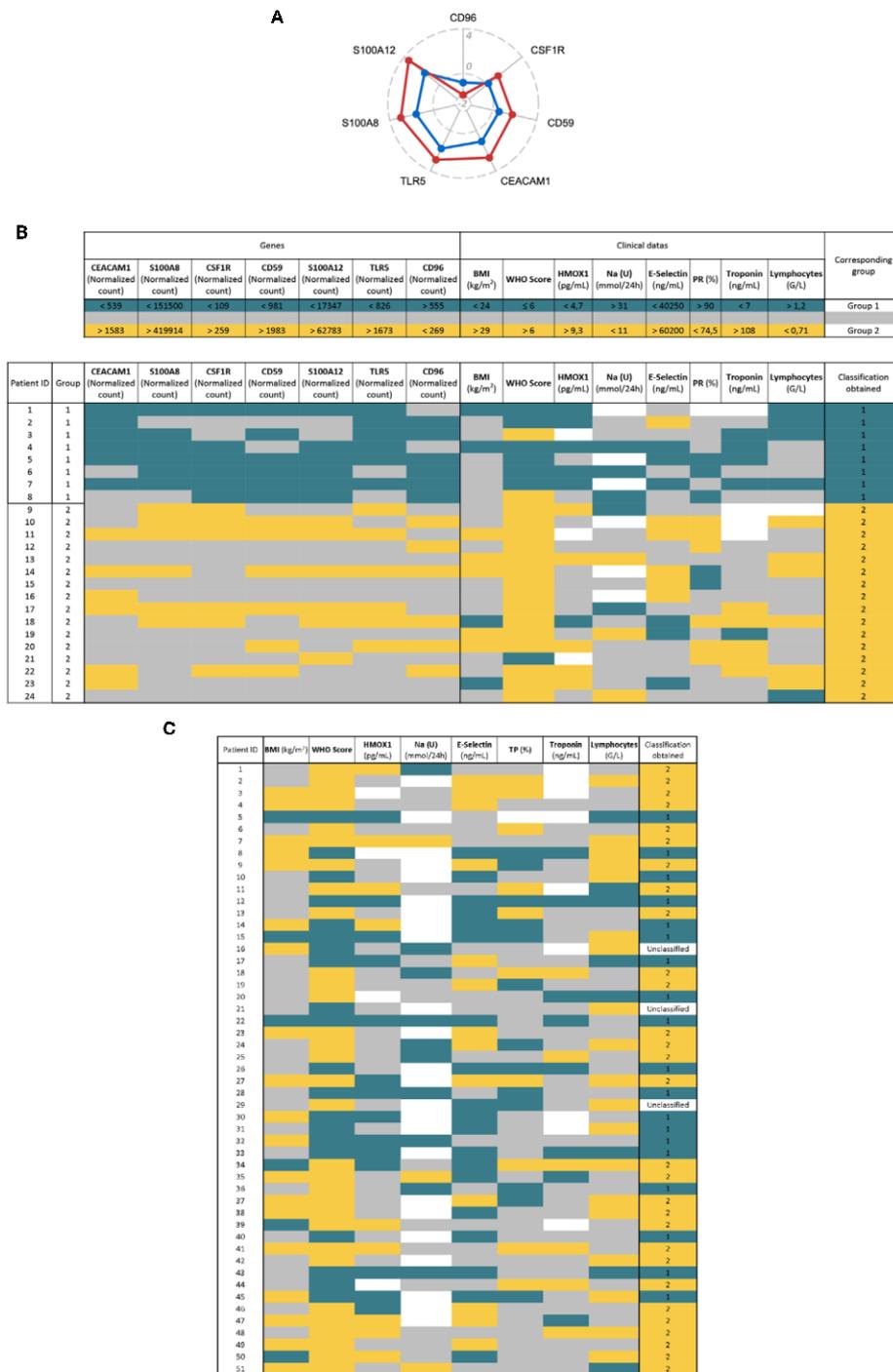


FIGURE 4 | Definition of a SARS-Score for hospitalized patients and proposal of therapeutic agents. **(A)** Radar plot showing biomarkers from the signatures. We selected the genes with less than 10% of distribution overlap between the two groups of patients. The data shown are the log2 fold change of the mean of group 1 (blue) or group 2 (red) relative to controls. **(B)** The SARS-Score is composed of seven genetic (left) and eight clinical variables (right). For each variable, the upper part of the table displays the thresholds defined to classify patients in group 1 (blue) or 2 (yellow). These thresholds correspond to the first (25%) and last quartile (75%) of the total distribution, except for the WHO score which corresponds to the threshold between mild and severe disease (WHO Score = 6). The lower part of the table shows the application of the SARS-Score on our cohort. The blue and yellow cells correspond to values allowing a classification in group 1 or 2, respectively. Gray cells represent values that do not allow classification and white cells correspond to missing values. The final score (column "classification obtained") is obtained by adding up the number of each colored cell. **(C)**, Application of the clinical part of the SARS-Score on 51 COVID-19 patients. The color code and the thresholds used are the same as in **(B)**. Patients having more blue or yellow cells are classified as "group 1" or "group 2", respectively. Patient having the same number of blue and yellow cells are considered as "Unclassified".

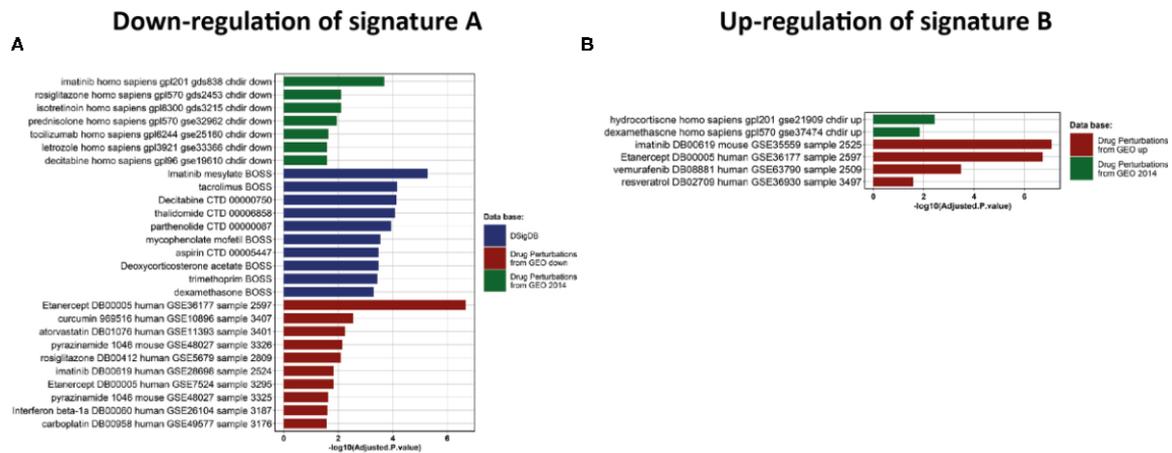


FIGURE 5 | Drug discovery and clinical assays. **(A, B)** Enrichment analysis of drug signatures from DsigDB and GEO drug perturbations to down-regulate Signature A or up-regulate signature B, respectively.

revealed that a combination of 12 biomarkers, including CCL2, IL-15, soluble ST2 (sST2), NGAL, sTNFRSF1A, ferritin, IL-6, S100A9, MMP-9, IL-2, sVEGFR1 and IL-10, was associated with mortality (38). As observed in previous studies (18, 21), our cohort of patients exhibit a profound lymphopenia and alterations of the myeloid compartment, with an increase of circulating “dysfunctional” CD14⁺CD163⁺ and CD14⁺HLA⁻DR^{low} monocytes as compared to controls. The immune gene signature shows an enrichment in innate myeloid immune profile, complement and coagulation cascades—consistent with the complement activation and hemostasis troubles described in COVID-19 (34)—and in neutrophil activation and degranulation—in line with neutrophils count and neutrophil extracellular traps (NETs) that were reported to be associated with COVID-19 severity (40). Altogether, these first results confirmed that despite a small number of patients, our cohort exhibited similar immune characteristics compared with previous published cohorts of severe COVID-19 patients.

The need of robust predictive biomarkers of COVID-19 severity led us to deeply characterize the immune signature of hospitalized COVID-19 patients at admission to search for early immune specificities that are linked to later multi-organ failure and severity of the disease. We have observed a strong heterogeneity among hospitalized COVID-19 patients and found two distinct groups. These two sub-groups of hospitalized Covid-19 patients were characterized by a distinct immune gene signature, and clinical outcome.

The group 1 is closer to the control group whereas the group 2 is more distant. Indeed, compared to group 1, the group 2 overexpresses a signature linked to myeloid immune response, cytokine mediated signaling pathways including type I IFN, and neutrophils chemotaxis and under-expresses a signature linked to NK and CD8⁺ T cell responses, T cell activation, Th17 response and antigen presenting pathways. Conflicting results have been reported for the role of type I IFN in COVID-19 patients: while type I IFNs are essential to control the disease in

the early steps of infection, it seems to exacerbate inflammation during severe disease (41).

Interestingly, we also found an over-expression in the group 2 of alarmins (S100A8 and S100A12) that have been shown to be specifically linked with neutrophil recruitment in fatal coronavirus infections (18, 20, 42). Of note, if pro-inflammatory cytokines were correlated with monocytes clusters more abundant in COVID-19 patients, they were not different between groups 1 and 2. This is probably due to the small number of patients in each group.

Dramatically, when we compared the clinical data between the two groups, the group 2 was more severe than the group 1, showing a strong correlation between immune signatures and the severity of the disease. Indeed, the group 2 was characterized by a multi-organ failure (as indicated by the SOFA score) and an increased mortality rate: 44% of the group 2, and only 12% in the group 1. Of note, the only patient from group 1 who died suffered from recurrent breast cancer.

To assess whether segregation of hospitalized severe patients was still found in an independent larger cohort, we applied our immune signatures A and B on a public database of 100 hospitalized COVID-19 patients (GSE157103). Again, the patients expressing the signature A at admission were more often admitted in ICU, needed more frequently invasive mechanical ventilation and their comorbidity (Charlson) and severity (SOFA and APACHE II) scores were higher than patients expressing the signature B. This result confirms the strength of the correlation between our immune profiles and the clinical severity of the disease.

Finally, knowing that our immune signature could be predictive of the clinical outcome of COVID-19, we created a score, the SARS-Score, to classify the patients with easy obtainable clinical data and highly specific genes. We propose a score, composed of eight clinical parameters reflecting multi-organ failure and seven genes from our transcriptomic analysis, after their validation at the protein level. Applied to our cohort,

TABLE 1 | Clinical trials using drugs that could down-regulate the signature A and up-regulate the signature B (last update: June 16, 2021).

Therapeutics	Drugs	Clinical trial (numbers)	Results	Population of COVID-19 patients	Ref	
Glucocorticoids	Dexamethasone	Yes (58)	Clinical benefit	In combination with standard care, increase of ventilator-free days	All patients	NCT04327401
	Prednisolone	Yes (41)	Controversial	Early administration decrease death rate and ventilator dependence	Severe	NCT04323592
				Early short administration improves clinical outcomes	Moderate and severe	NCT04374071
				May prolong virus shedding	Severe	NCT04273321
Hydrocortisone	Yes (10)	No result published	Early short administration don't reduce mortality	All patients	NCT04343729	
Inhibitors of cytokines	Etanercept	No	No clinical trial			
	Tocilizumab	Yes (57)	Controversial	No benefit on disease progression	All patients	NCT04346355
				Don't improve clinical outcomes at 15 days, and might increase mortality	Severe or critical	NCT04403685
			Reduce oxygen requirement, ICU stay, median hospital stay and mortality	Critical	NCT04730323	
Repurposed drugs with immunomodulatory properties	Thalidomide	Yes (3)	No result published	No better clinical status or lower mortality at 28 days	Severe	NCT04320615
	Isotretinoin	Yes (9)	No result published	No prevention of intubation or death	Moderate	NCT04356937
	Imatinib	Yes (5)	No result published			
	Atorvastatin	Yes (9)	No result published			
	Rosiglitazone	No	No clinical trial			
	Vemurafenib	No	No clinical trial			
Immunosuppressive drugs	Tacrolimus	Yes (4)	No result published			
	Mycophenolate	No	No result published			
Cytokines	Interferon beta	Yes (13)	No result published			
Anti-inflammatory drugs	Parthenolid	No	No clinical trial			
	Curcumin	Yes (2)	No result published			
	Aspirin	yes (16)	No result published			

the SARS-Score allows perfectly discriminating patients of groups 1 and 2, either using clinical data and/or immune variables, and even allows proposing a therapy specific to the group the patient belongs to (Figure 6).

Indeed, results about treatments of COVID-19 patients are highly controversial (43–46), probably in part because severe COVID-19 patients were considered as a homogeneous population. Based on the immune signature, we performed a drug gene set enrichment analysis to propose differential therapeutics, alone or in combination, that could specifically correspond to each group of patients. With this approach, we took into account both the specific pharmacology of the drug and the overall effect on the modulation of genes expression. We found several drugs that would revert the signatures A and B:

our study suggests that inhibiting pro-inflammatory cytokines would be beneficial for group 2 patients. This could be achieved by cytokine receptors blockade such as Tocilizumab or Etanercept to target IL-6R or TNF α R, respectively. Blocking TNF α R has already been proposed in COVID-19 (47) and might be a strong candidate as it can regulate both signatures A and B. On the contrary, group 1 patients would probably benefit from drugs that activate antiviral adaptive immune cell responses. This could be achieved by repurposing molecules such as Imatinib, Thalidomide, Isotretinoin or Atorvastatin, that are already in clinical trials in COVID-19 (NCT04422678, NCT04273529, NCT04361422 and NCT04380402, respectively) (30, 48–50), or monoclonal antibodies targeting immune co-stimulatory molecules TNFRSF4 (OX40), TNFRSF18 (GITR) or LAG3

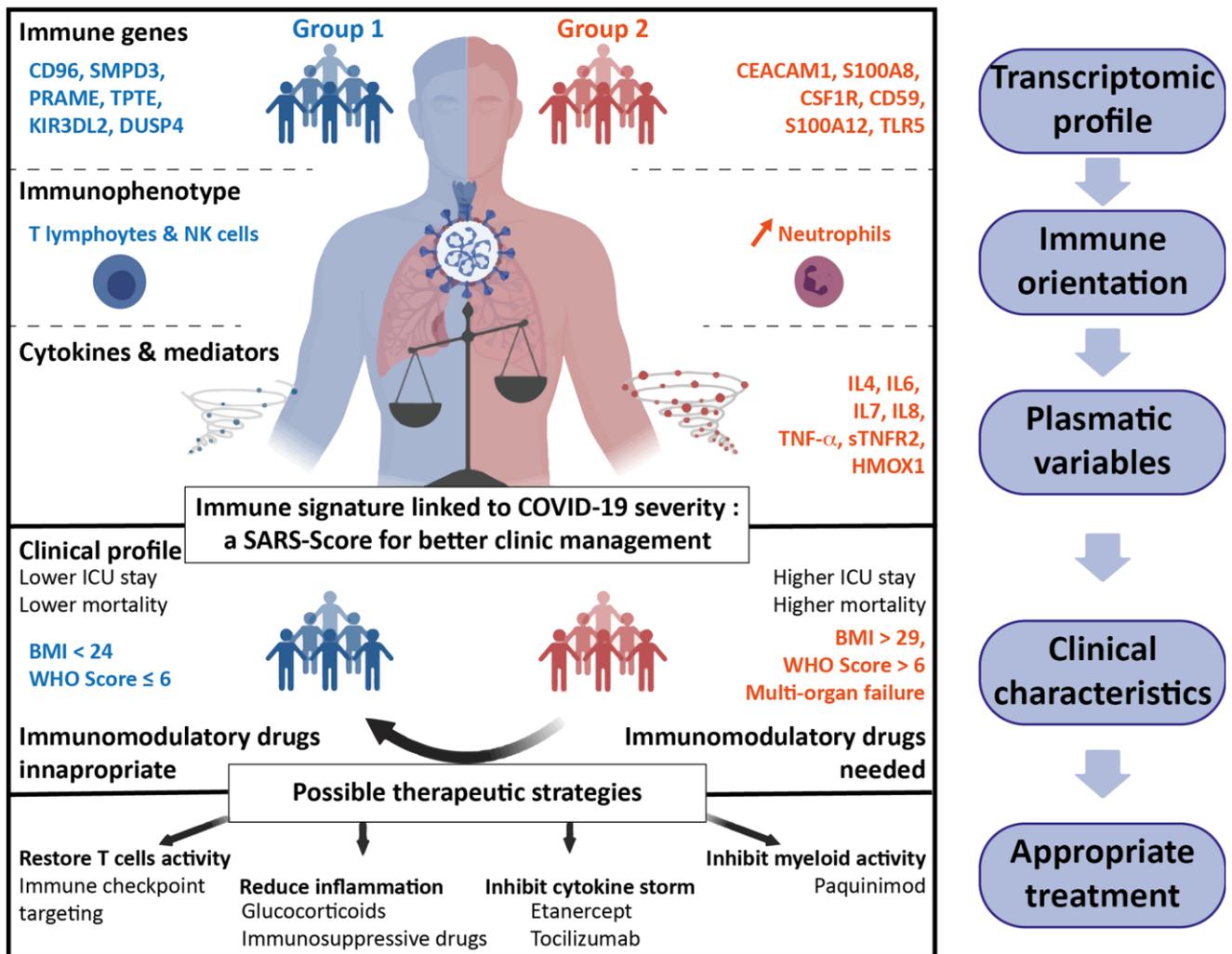


FIGURE 6 | Summary of the two groups of hospitalized COVID-19 patients. Groups 1 (blue, left part) and 2 (red, right part) have been defined on differential immune transcriptomic profiles that correspond to specific immune orientations. The plasmatic and clinical characteristics of these two groups allow to predictively classify the patients and personalize the therapeutic strategies to improve the outcome of COVID-19 patients.

immune checkpoint (overexpressed in group 1 patients). Immunosuppressive drugs like Tacrolimus—in clinical trials in COVID-19 (NCT04341038)—appear also as a possible candidate in our study, although its use has been associated with high mortality among organ transplant recipients. Finally, glucocorticoids such as Dexamethasone, Prednisolone or Hydrocortisone seem to be able to both boost signature B profile and revert signature A. Interestingly, the clinical efficacy of corticosteroids have already been correlated with neutrophil-to-lymphocytes ratio, which we found as a marker of group 2 patients (51, 52).

Altogether, our study provides a fundamental understanding of the different immune profiles among severe hospitalized COVID-19 patients and provides a score which would be a useful tool to classify patients and propose accurate treatments for both groups of patients, towards a more personalized medicine against COVID-19.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by CERAPHP-5 00011928. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR, PEF and NJ performed the experiments. JR, PEF, AKi and MM performed bioinformatic analysis. JR, P-EF, NJ, and IC

analyzed the data. NH, AKa, CS, ET, DS, AK, J-SH, ML, AF, JBA, JLD, MADD, and FP provided clinical samples and pathological data. IC designed and supervised the study. JR, PEF, NJ, MADD, FP and IC wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the “Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale” (INSERM), Sorbonne Universite, Universite de Paris.

REFERENCES

- Wang T, Du Z, Zhu F, Cao Z, An Y, Gao Y, et al. Comorbidities and Multi-Organ Injuries in the Treatment of COVID-19. *Lancet* (2020) 395:e52. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30558-4
- Quah P, Li A, Phua J. Mortality Rates of Patients With COVID-19 in the Intensive Care Unit: A Systematic Review of the Emerging Literature. *Crit Care* (2020) 24:e1–4. doi: 10.1186/s13054-020-03006-1
- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients With COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study. *Lancet* (2020) 395:1054–62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
- Merad M, Martin JC. Pathological Inflammation in Patients With COVID-19: A Key Role for Monocytes and Macrophages. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:355–62. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4
- Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 Severity Correlates With Airway Epithelium-Immune Cell Interactions Identified by Single-Cell Analysis. *Nat Biotechnol* (2020) 38:970–9. doi: 10.1038/s41587-020-0602-4
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients With Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* (2020) 27:992–1000. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.009
- Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal Analyses Reveal Immunological Misfiring in Severe COVID-19. *Nature* (2020) 584:463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
- Messner CB, Demichev V, Wendisch D, Michalick L, White M, Freiwald A, et al. Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. *Cell Syst* (2020) 11:11–24.e4. doi: 10.1016/j.cels.2020.05.012
- Wei L-L, Wang W-J, Chen D-X, Xu B. Dysregulation of the Immune Response Affects the Outcome of Critical COVID-19 Patients. *J Med Virol* (2020) 92:2768–76. doi: 10.1092/jmvi.26181
- Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kusin M, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* (2020) 52:910–41. doi: 10.1016/j.immuni.2020.05.002
- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* (2020) 181:1036–1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026
- Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Morin L, et al. A Dynamic COVID-19 Immune Signature Includes Associations With Poor Prognosis. *Nat Med* (2020) 26:1623–35. doi: 10.1038/s41591-020-1038-6
- Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An Inflammatory Cytokine Signature Predicts COVID-19 Severity and Survival. *Nat Med* (2020) 26:1636–43. doi: 10.1038/s41591-020-1051-9
- Galani I-E, Rovina N, Lampropoulou V, Triantafyllia V, Manioudaki M, Pavlos E, et al. Untuned Antiviral Immunity in COVID-19 Revealed by Temporal Type I/III Interferon Patterns and Flu Comparison. *Nat Immunol* (2021) 22:32–40. doi: 10.1038/s41590-020-00840-x
- Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn Errors of Type I IFN Immunity in Patients With Life-Threatening COVID-19. *Science* (2020) 370:eabd4570. doi: 10.1126/science.abd4570
- Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis F, Hoffmann H-H, Zhang Y, et al. Autoantibodies Against Type I IFNs in Patients With Life-Threatening COVID-19. *Science* (2020) 370:eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585
- Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-Derived Suppressor Cells Coming of Age. *Nat Immunol* (2018) 19:108–19. doi: 10.1038/s41590-017-0022-x
- Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Baßler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* (2020) 182:1419–40.e23. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.001
- Venet F, Demaret J, Gossez M, Monneret G. Myeloid Cells in Sepsis-Acquired Immunodeficiency. *Ann NY Acad Sci* (2020). doi: 10.1111/nyas.14333
- Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet A-G, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe From Mild COVID-19. *Cell* (2020) 182:1401–18.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.002
- Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019. *J Clin Invest* (2020) 130:2620–9. doi: 10.1172/JCI137244
- Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations With Age and Disease Severity. *Cell* (2020) 183:996–1012.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
- Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients With Severe COVID-19 Pneumonia. *N Engl J Med* (2021) 384:1503–16. doi: 10.1056/NEJMoa2028700
- Salama C, Han J, Yau L, Reiss WG, Kramer B, Neidhart JD, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized With COVID-19 Pneumonia. *N Engl J Med* (2021) 384:20–30. doi: 10.1056/NEJMoa2030340
- Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, Fernandes AD, Harvey L, Foulkes AS, et al. Efficacy of Tocilizumab in Hospitalized Patients With COVID-19. *New Engl J Med* (2020) 383:2333–44. doi: 10.1056/NEJMoa2028836
- Águas R, Mahdi A, Shretta R, Horby P, Landray M, White L. CoMo Consortium. Potential Health and Economic Impacts of Dexamethasone Treatment for Patients With COVID-19. *Nat Commun* (2021) 12:915. doi: 10.1038/s41467-021-21134-2
- Cordeiro LP, Linhares EONN, Nogueira FGO, Moreira-Silva D, Medeiros-Lima DJM. Perspectives on Glucocorticoid Treatment for COVID-19: A Systematic Review. *Pharmacol Rep* (2021) 73:728–35. doi: 10.1007/s43440-021-00225-3
- RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients With COVID-19. *N Engl J Med* (2021) 384:693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436
- Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu F-F, Boutros PC. NanoStringNorm: An Extensible R Package for the Pre-Processing of NanoString mRNA and miRNA Data. *Bioinformatics* (2012) 28:1546–8. doi: 10.1093/bioinformatics/bts188
- Rossi R, Talarico M, Coppi F, Boriani G. Protective Role of Statins in COVID 19 Patients: Importance of Pharmacokinetic Characteristics Rather Than Intensity of Action. *Intern Emerg Med* (2020) 15:1573–6. doi: 10.1007/s11739-020-02504-y
- Wang H, Horbinski C, Wu H, Liu Y, Sheng S, Liu J, et al. NanoStringDiff: A Novel Statistical Method for Differential Expression Analysis Based on NanoString Ncounter Data. *Nucleic Acids Res* (2016) 44:e151. doi: 10.1093/nar/gkw677

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Hopital Europeen Georges Pompidou hospital for contributing to the tissue collection. We also thank the CHIC (Center of Histology Imaging and Cytometry) facility of the Centre de Recherche des Cordeliers.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.701273/full#supplementary-material>

32. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: Interactive and Collaborative HTML5 Gene List Enrichment Analysis Tool. *BMC Bioinf* (2013) 14:128. doi: 10.1186/1471-2105-14-128
33. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: A Comprehensive Gene Set Enrichment Analysis Web Server 2016 Update. *Nucleic Acids Res* (2016) 44:W90–7. doi: 10.1093/nar/gkw377
34. Overmyer KA, Shishkova E, Miller IJ, Balnis J, Bernstein MN, Peters-Clarke TM, et al. Large-Scale Multi-Omic Analysis of COVID-19 Severity. *medRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.07.17.20156513
35. Yoo M, Shim J, Kim J, Ryall KA, Lee K, Lee S, et al. DSigDB: Drug Signatures Database for Gene Set Analysis. *Bioinformatics* (2015) 31:3069–71. doi: 10.1093/bioinformatics/btv313
36. Zhou T, Su TT, Mudianto T, Wang J. Immune Asynchrony in COVID-19 Pathogenesis and Potential Immunotherapies. *J Exp Med* (2020) 217: e20200674. doi: 10.1084/jem.20200674
37. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired Type I Interferon Activity and Inflammatory Responses in Severe COVID-19 Patients. *Science* (2020) 369:718–24. doi: 10.1126/science.abc6027
38. Abers MS, Delmonte OM, Ricotta EE, Fintzi J, Fink DL, de Jesus AAA, et al. An Immune-Based Biomarker Signature is Associated With Mortality in COVID-19 Patients. *JCI Insight* (2021) 6:e144455. doi: 10.1172/jci.insight.144455
39. Bowman ER, Cameron CMA, Avery A, Gabriel J, Kettelhut A, Hecker M, et al. Levels of Soluble CD14 and Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 May be Predictive of Death in Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Infect Dis* (2020) 223:jiaa744. doi: 10.1093/infdis/jiaa744
40. Janiak K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells* (2021). doi: 10.3390/cells10010151
41. King C, Sprent J. Dual Nature of Type I Interferons in SARS-CoV-2-Induced Inflammation. *Trends Immunol* (2021) 42:312–22. doi: 10.1016/j.it.2021.02.003
42. Guo Q, Zhao Y, Li J, Liu J, Yang X, Guo X, et al. Induction of Alarmin S100A8/A9 Mediates Activation of Aberrant Neutrophils in the Pathogenesis of COVID-19. *Cell Host Microbe* (2020) 29(2):222–35.e4. doi: 10.1016/j.chom.2020.12.016
43. Bansal P, Goyal A, Cusick A, Lahan S, Dhaliwal HS, Bhyan P, et al. Hydroxychloroquine: A Comprehensive Review and Its Controversial Role in Coronavirus Disease 2019. *Am Med* (2021) 53:117–34. doi: 10.1080/07853890.2020.1839959
44. Li G, Ruan S, Zhao X, Liu Q, Dou Y, Mao F. Transcriptomic Signatures and Repurposing Drugs for COVID-19 Patients: Findings of Bioinformatics Analyses. *Comput Struct Biotechnol J* (2021) 19:1–15. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.056
45. Khalil A, Kamar A, Nemer G. Thalidomide-Revisited: Are COVID-19 Patients Going to Be the Latest Victims of Yet Another Theoretical Drug-Repurposing? *Front Immunol* (2020) 11:1248. doi: 10.3389/fimmu.2020.01248
46. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. COVID-19: Discovery, Diagnostics and Drug Development. *J Hepatol* (2021) 74:168–84. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.031
47. Feldmann M, Maini RN, Woody JN, Holgate ST, Winter G, Rowland M, et al. Trials of Anti-Tumour Necrosis Factor Therapy for COVID-19 are Urgently Needed. *Lancet* (2020) 395:1407–9. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30858-8
48. Emadi A, Chua JV, Talwani R, Bentzen SM, Baddley J. Safety and Efficacy of Imatinib for Hospitalized Adults With COVID-19: A Structured Summary of a Study Protocol for a Randomised Controlled Trial. *Trials* (2020) 21:897. doi: 10.1186/s13063-020-04819-9
49. Han Y, Yang L, Duan X, Duan F, Nilsson-Payant BE, Yaron TM, et al. Identification of Candidate COVID-19 Therapeutics Using hPSC-Derived Lung Organoids. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.05.05.079095
50. Li Y, Shi K, Qi F, Yu Z, Chen C, Pan J, et al. Thalidomide Combined With Short-Term Low-Dose Glucocorticoid Therapy for the Treatment of Severe COVID-19: A Case-Series Study. *Int J Infect Dis* (2021) 103:507–13. doi: 10.1016/j.ijid.2020.12.023
51. Cai H, Liu G, Zhong J, Zheng K, Xiao H, Li C, et al. Immune Checkpoints in Viral Infections. *Viruses* (2020) 12. doi: 10.3390/v12091051
52. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HXH, et al. Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio as an Independent Risk Factor for Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19. *J Infect* (2020) 81:e6–e12. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.002

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Russick, Foy, Josseaume, Meylan, Hamouda, Kirilovsky, Sissy, Tartour, Smudja, Karras, Hulot, Livrozet, Fayol, Arlet, Diehl, Dragon-Durey, Pagès and Cremer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

