

# CARACTERISATION D'UNE REPONSE IMMUNE ADAPTATIVE DANS LES TUMEURS COLORECTALES DE TYPE MSI : DE L'ANALYSE MOLECULAIRE A L'ANALYSE D'IMAGES

Boissière-Michot F.<sup>1</sup>, Lazennec G.<sup>2</sup>, Frugier H.<sup>1</sup>, Jarlier M.<sup>1</sup>,  
Roca L.<sup>1</sup>, Du Paty E.<sup>2</sup>, Laune D.<sup>2</sup>, Blanchard F.<sup>3</sup>, Le Pessot F.<sup>3</sup>, Sabourin J.-C.<sup>3</sup>, Bibeau F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM) - Val d'Aurelle,  
34298 Montpellier, France*

<sup>2</sup>*UMR 3145 SYSDIAG CNRS, 34093, Montpellier, France*

<sup>3</sup>*Centre Hospitalier Universitaire Rouen, 76038, Rouen, France*

Auteur correspondant :

Unité de Recherche Translationnelle, Institut régional du Cancer de Montpellier  
208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier Cedex.  
Florence.Boissiere@icm.unicancer.fr, Tél. 04 67 61 85 66

## RESUME

Qu'elles se développent dans un contexte héréditaire ou sporadique, les tumeurs colorectales (CRC) présentant une instabilité microsatellitaire (MSI) sont fréquemment associées à un recrutement local de cellules immunes. D'un point de vue clinique, à stade équivalent, les CRC MSI

présentent un meilleur pronostic que ceux avec microsatellites stables (MSS). Le but de cette étude était de caractériser les mécanismes immuns dans les CRC MSS et MSI. Pour ce faire, nous avons analysé par immunohistochimie les différentes populations immunes (lymphocytes T, T cytotoxiques, T mémoires, Th1, T régu-

lateurs, lymphocytes B, macrophages) et par technique Bioplex® l'expression intratumorale de 48 cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, dans les tumeurs MSI, un profil d'expression cytokinique particulier qui est impliqué dans une réponse de type Th1. Il se traduit par un recrutement de cellules participant à la réponse antitumorale (T cytotoxiques, T mémoires) et pourrait être à l'origine du meilleur pronostic de ces tumeurs.

## INTRODUCTION

En France, le cancer colorectal (CRC) se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents : le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes (<http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/11-cancer-colorectal/43-epidemiologie-du-cancer-colorectal-en-france-metropolitaine-incidence.html#ind2>). Environ 85 % de ces cancers se produisent dans un contexte d'instabilité chromosomique alors que 15 % sont dus à la déficience d'une protéine du système de réparation des mésappariements de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) (système MMR pour Mismatch Repair), en particulier hMLH1, hMSH2, hMSH6 ou PMS2, impliquée dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN (1). Cette déficience peut être liée soit à une mutation germinale d'un des gènes codant pour ces protéines soit à un contexte global d'hyperméthylation tumorale (2). Dans cette dernière situation, la méthylation du promoteur de certains gènes, dont hMLH1, va conduire à inhiber l'expression des dits gènes. Dans tous les

cas, l'absence d'expression d'une protéine du système MMR se traduira par l'accumulation de mutations, en particulier dans des séquences appelées microsatellites (3). Il s'agit de séquences mono-, bi-, ou trinuécléotidiques répétées en tandem intra- ou extra-géniques, qui sont très sensibles aux erreurs de réplication. En l'absence de réparation, les mutations accumulées vont se traduire par une instabilité de la taille des microsatellites au niveau de l'ADN tumoral. La tumeur sera alors caractérisée comme MicroSatellites Instable (MSI), par opposition à MSS, MicroSatellites Stable. Lorsque ces mutations sont intra-géniques, elles peuvent conduire à un décalage du cadre de lecture et être à l'origine de néoantigènes potentiellement immunogènes (4-6).

Les tumeurs MSI présentent fréquemment une forte réaction inflammatoire péri-tumorale (réaction Crohn-like), une infiltration importante par des lymphocytes intratumoraux (TILs, pour Tumor Infiltrating Lymphocytes) et un plus grand nombre de ganglions lymphatiques, le plus souvent réactionnels (7). Cette immunogénicité des tumeurs MSI pourrait ainsi expliquer leur bon pronostic.

Cependant, le rôle du système immunitaire dans le contrôle tumoral est extrêmement ambigu. En effet, la réponse immunitaire est toujours la résultante d'une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs. La localisation particulière de certains lymphocytes dans les tumeurs colorectales est un facteur pronostique majeur (8,9) alors que l'inflammation chronique de l'intes-

tin est reconnue pour être un facteur de risque (10). Ainsi, une réponse immune non contrôlée peut conduire à une inflammation pathologique en créant un environnement favorable à la croissance cellulaire. Dans un environnement tumoral, elle peut également participer à la phase d'échappement de l'immunosurveillance en agissant à divers niveaux tels que le recrutement de nouvelles populations immunes (macrophages M2, Lymphocytes T-régulateurs...), l'induction de l'expression de facteurs inhibant une réponse anti-tumorale effective (CTLA4, PD1, PDL1...) ou de facteurs pro-angiogéniques.

L'objectif de notre étude était de caractériser le microenvironnement inflammatoire dans des tumeurs colorectales de type MSS et MSI. Pour ce faire, nous avons analysé une cohorte de 48 CRC MSI et 62 CRC MSS. Les différentes populations immunes infiltrant la tumeur ont été caractérisées par immunohistochimie (IHC) sur des Tissus MicroArrays (TMA) spécifiquement conçus pour cette étude et quantifiées par analyse d'images. Le contenu intra tumoral en divers facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines a été analysé à partir de broyats tumoraux par technique multiplexée.

## **MATERIEL ET METHODES**

### ***Echantillons***

Tous les cancers colorectaux ayant un statut MMR documenté et pour lequel un échantillon FFPE et congelé était disponible dans les tumorothèques de l'Institut du Cancer de Montpellier et du CHU de Rouen ont été identifiés. Une cryosection

de chaque échantillon congelé a été réalisée, colorée par Hématéine Eosine Safran (HES) et son contenu en cellules tumorales a été analysé par un pathologiste. Seuls les échantillons congelés comportant au moins 50% de cellules tumorales ont été conservés pour l'analyse. Au total, 110 tumeurs coliques ont été analysées, 48 MSI et 62 MSS. Un échantillon fixé en formol et inclus en paraffine (FFPE), apparié avec chacune des tumeurs congelées, a été sélectionné pour constituer les TMA.

### ***Détermination du statut MMR***

Le statut MMR a été réalisé par analyse immunohistochimique de hMLH1, hMSH2, hMSH6 et PMS2 ainsi que par analyse PCR des séquences microsatellites comme déjà décrit (11).

### ***Construction des TMA***

Une lame HES de chaque bloc FFPE a été analysée. Pour chaque tumeur, six zones étaient identifiées : 3 en bordure de tumeur et 3 au centre de la tumeur. Une carotte de 600µm de diamètre était prélevée au niveau de chaque zone et intégrée dans un bloc receveur en utilisant le TMA arrayer MTA1 (Beecher Instrument, Excilone, France).

### ***Immunohistochimie***

Les différents marqueurs analysés ainsi que les anticorps utilisés sont décrits dans le tableau I. Après démasquage antigénique et inhibition des peroxydases endogènes, les lames ont été incubées avec les différents anticorps. La liaison spécifique de l'anticorps à son antigène a été mise en évidence avec le système d'amplification

Marqueur	Type cellulaire	Clone	Source	Démasquage antigénique	Dilution	Durée d'incubation	Protocole de marquage
CD3	Lymphocytes T	LN10	Menarini	EDTA	1/200	20 min	Envision™ FLEX
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques	C8/144B	Dako	EDTA	1/100	20 min	Envision™ FLEX
CD45R0	Lymphocytes T mémoires	UCHL1	Dako	EDTA	1/100	20 min	Envision™ FLEX+
FOXP3	Lymphocytes T régulateurs (Tregs)	236A/E7	Abcam	Citrate	1/100	20 min	Envision™ FLEX
T-Bet	T helper 1	4B10	SCB	EDTA	1/200	20 min	Envision™ FLEX+
CD20	Lymphocytes B	L26	Dako	EDTA	1/800	20 min	Envision™ FLEX
CD68	Macrophages	KP1	Dako	EDTA	1/4000	20 min	Envision™ FLEX

**Tableau I :** Caractéristiques des anticorps utilisés pour immunophénotyper les CRC MSS et MSI.

Flex® ou Flex®+ et révélée par le chromogène diaminobenzidine. Après déshydratation et montage entre lame et lamelle, les lames ont été analysées avec le logiciel SpotBrowser® (Excilone, France) en appliquant un protocole d'imagerie intégrant seuillages et critères de forme et de taille (détails sur demande). Les résultats étaient ensuite exportés sous format Excel et la moyenne des trois spots (même localisation et même échantillon) calculée. Les résultats des immunomarquages étaient exprimés en nombre de cellules positives par mm<sup>2</sup> de tissu.

### **Extraction protéique**

Plusieurs coupes de 15 µm d'épaisseur, consécutives à la cryosection initiale ayant permis de valider le pourcentage de cellules tumorales, étaient réalisées de manière à obtenir 25 à 100mg de tissu. Ces coupes étaient collectées dans des tubes Lysing Matrix (MP Biomedicals) permettant le broyage, après rajout d'un tampon de lyse TEG, avec un MagNA Lyser

(Roche Diagnostics). Après centrifugation à 13000 g à +4 °C pendant 20 min, les surnageants étaient récupérés et la concentration en protéines totales mesurée par la technique de Bradford.

### **Dosage des protéines par technique Multiplex**

Pour mesurer simultanément 48 facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines, nous avons utilisé deux kits Bio-Plex (BioRad #171-A11127 et #171-A11171) en suivant les recommandations du fournisseur. Le premier kit permettait la détection de 27 protéines (27 plex assay: IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, IL-12 [p70], IL-13, IL-15, IL-17, CCL11 (Eotaxin), b-FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), PDGFbb, CCL5 (RANTES), TNF-α, VEGF) et le second de 21 facteurs supplémentaires (21 plex assay: IL-1α, IL-2Ra, IL-3, IL-12 (p40), IL-16, IL-18, CCL27 (CTACK), CXCL1

(GRO- $\alpha$ ), HGF, IFN- $\alpha$ 2, LIF, CCL7 (MCP-3), M-CSF, MIF, CXCL9 (MIG),  $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ), TNF- $\beta$ , TRAIL).

Chaque tube, contenant des billes couplées à des anticorps spécifiques, était incubé avec 25  $\mu$ g de protéines totales dans un volume final de 50  $\mu$ l. Les données étaient recueillies sur la plateforme BioRad, basée sur un lecteur à double laser de microplaques. Les concentrations de chacune des protéines mesurées étaient exprimées en pg/ $\mu$ g de protéines totales.

### Analyse statistique

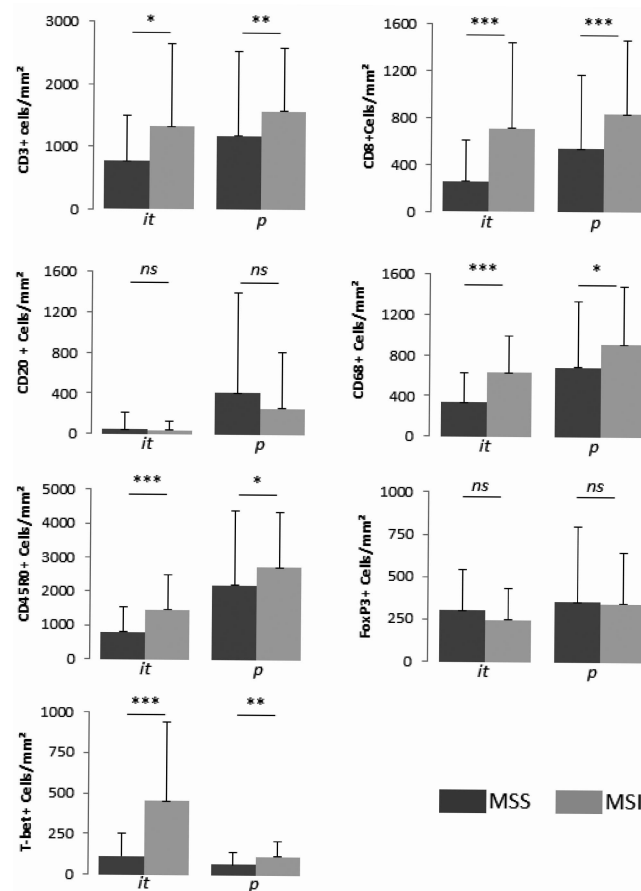
Les variables continues étaient exprimées par la moyenne, la médiane, l'écart type et l'étendue. Selon le type de données à analyser, les données étaient analysées en utilisant le test du  $\chi^2$ , le test de Fischer ou de Mann Whitney. Une différence était considérée comme statistiquement significative lorsque  $P < 0,05$ , à l'exception de l'analyse des cytokines pour laquelle le seuil de significativité était ramené à 0,001 avec la correction de Bonferroni, pour tenir compte des multiples comparaisons effectuées. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur STATA 10.0 (StataCorp).

## RESULTATS

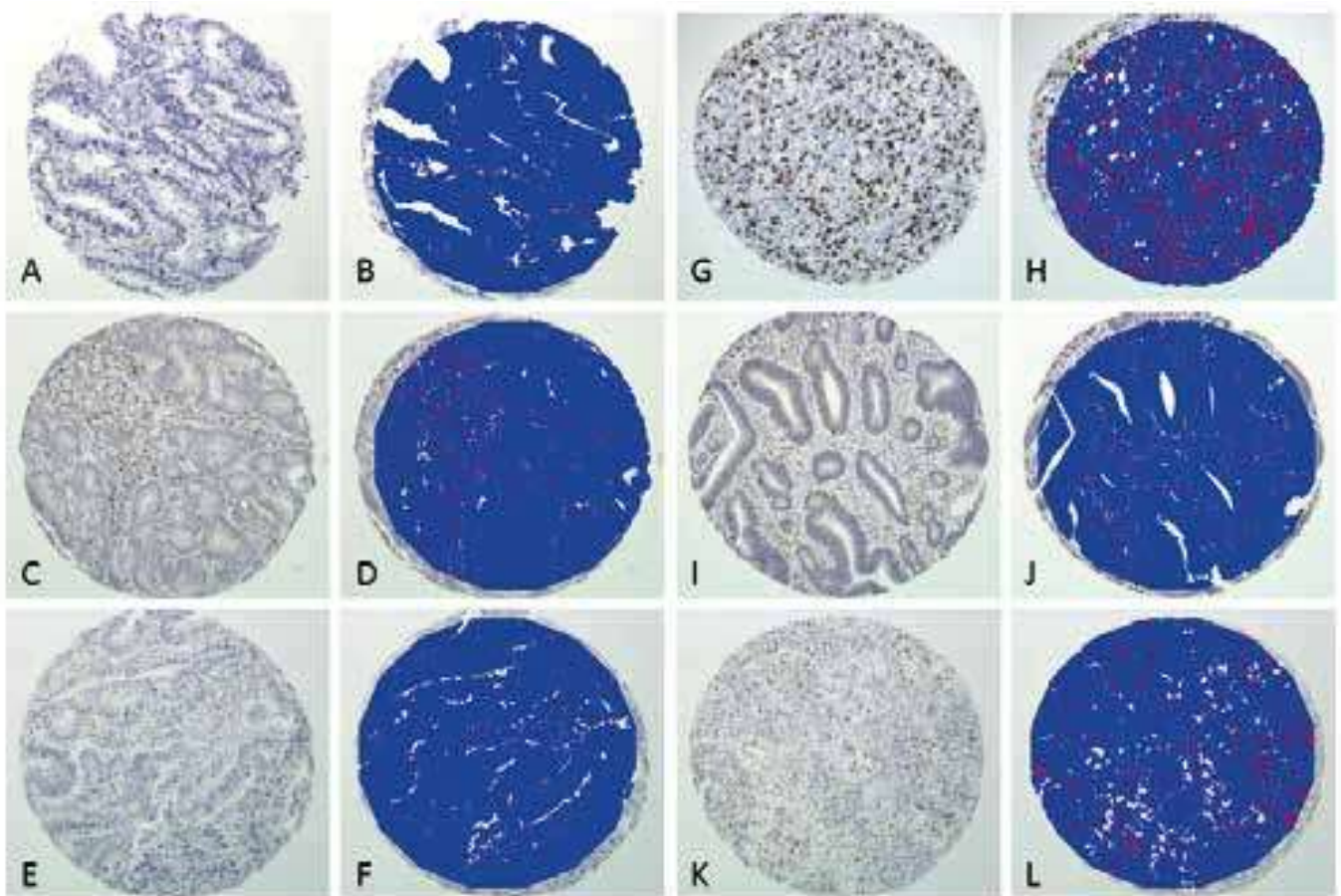
### Infiltrat inflammatoire

L'analyse par immunohistochimie a permis de mettre en évidence un recrutement intra- et péri-tumoral des lymphocytes T (CD3+), en particulier cytotoxiques (CD8+), mémoires (CD45RO), et de la voie Th1 (T-Bet+) dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS. A l'inverse,

les densités de lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) et de lymphocytes B (CD20+) n'étaient pas significativement différentes (Figures 1 et 2). Nous avons également pu noter un recrutement plus important de macrophages CD68+ dans les tumeurs de type MSI (Figure 1).



**Figure 1** : Analyse quantitative de l'infiltrat immunitaire au centre (it) ou en périphérie (p) des tumeurs colorectales MSS ou MSI. Le nombre de cellules immunoréactives a été évalué sur chaque spot par analyse d'images.



**Figure 2** : Spots tissulaires immunomarqués par CD8 (A, G), FoxP3 (C, I) et T-Bet (E, K) dans des tumeurs colorectales MSS (A, C, E) ou MSI (G, I, K). L'analyse d'images correspondant à chacun des spots est illustrée en parallèle (B, H, D, J, F, L). Les cellules détectées par le système d'analyse d'images sont colorées en rouge.

### **Expression cytokinique**

La plupart des facteurs analysés n'étaient pas (médiane = 0; IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, CCL3, G-CSF, TNF $\alpha$ , PDGFbb) ou peu détectables (médiane <1pg/ $\mu$ g de protéines totales ; IL-1 $\alpha$ , IL2-P $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-12(p70), IL-17, IL-18, LIF, CCL11, CCL27, IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL7, CCL4,  $\beta$ -FGF,  $\beta$ -NGF, IFN- $\alpha$ 2, GM-CSF, M-CSF, SCF, TNF $\beta$ , TRAIL), aussi bien dans les échantillons MSS que MSI (Tableau II).

Parmi les cytokines mesurables, CCL5, CXCL8, CXCL9, IL-1 $\beta$ , CXCL10, IL-16, CXCL1 et IL-1ra étaient significative-

ment surexprimées dans les tumeurs MSI contrairement à MIF qui était plus fortement exprimé dans les tumeurs MSS (Tableau II). CCL5, CXCL10, CXCL8, CXCL9 et IL-1 $\beta$  montraient les plus fortes variations entre les deux groupes de tumeurs (entre 12,9 et 2,3 fois).

Marqueur	MSS (n=62)				MSI (n=48)				Ratio (MSI/MSS)	p
	Moy	DS	Méd	Etendue	Moy	DS	Méd	Etendue		
CCL5	0.40	0.80	0.13	[0-4.29]	5.16	18.13	1.37	[0-125.92]	12.9	<0.001
CXCL8	14.62	40.13	2.19	[0-284.63]	77.05	149.22	12.70	[.01-507.61]	5.3	<0.001
CXCL9	6.17	8.77	3.20	[0-49.9]	28.51	35.39	14.16	[0-154.09]	4.6	<0.001
IL1-β	2.24	8.87	0.13	[0-68.39]	5.13	8.86	1.78	[0-41.93]	2.3	<0.001
CXCL10	5.84	9.07	1.70	[0-44.67]	61.36	238.43	8.49	[0-1652.31]	10.5	<0.001
IL-16	9.53	8.03	7.91	[1.75-53.59]	14.90	14.89	12.10	[0-87.05]	1.6	0.011
CXCL1	1.89	2.58	0.94	[0-12.89]	2.84	3.58	1.40	[0-18.59]	1.5	0.033
MIF	106.66	53.64	92.40	[47.68-319.81]	89.23	60.19	76.16	[0-350.63]	0.8	0.039
IL-1ra	80.72	116.43	37.96	[.27-506.35]	105.98	123.77	58.83	[5.61-567.4]	1.3	0.049
CCL4	0.55	0.97	0.28	[0-5.92]	1.31	2.08	0.45	[0-10.25]	-	-
LIF	0.08	0.10	0.07	[0-.65]	0.05	0.07	0.01	[0-.33]	-	-
CCL3	0.00	0.01	0.00	[0-.04]	0.02	0.05	0.00	[0-.24]	-	-
IFNγ	0.08	0.17	0.00	[0-.89]	0.25	0.44	0.02	[0-1.97]	-	-
IL-18	13.32	47.74	0.85	[.02-270.58]	6.33	24.73	0.31	[0-160.42]	-	-
HGF	8.25	10.86	5.42	[1.55-63.03]	6.16	5.96	3.85	[0-23.19]	0.7	0.108
IL-13	0.02	0.04	0.00	[0-.16]	0.01	0.03	0.00	[0-.18]	-	-
IL-1α	0.26	0.49	0.15	[0-3.02]	0.38	0.62	0.16	[0-3]	-	-
βFGF	0.95	1.29	0.38	[0-4.6]	1.00	1.99	0.17	[0-9.14]	-	-
IL-12p40	2.14	2.72	1.24	[0-14.2]	1.81	2.69	0.69	[0-12.86]	0.8	0.258
CCL11	0.22	0.37	0.05	[0-1.71]	0.19	0.37	0.02	[0-1.73]	-	-
GM-CSF	0.03	0.05	0.00	[0-.19]	0.03	0.04	0.00	[0-.15]	-	-
IL-7	0.59	1.56	0.00	[0-8.9]	0.83	1.72	0.01	[0-9.39]	-	-
CXCL12	2.17	3.05	1.54	[0-16.09]	1.55	1.93	0.43	[0-7.67]	0.7	0.342
CCL7	0.97	1.93	0.16	[0-10.74]	1.01	1.38	0.63	[0-7.81]	-	-
CCL27	0.28	0.21	0.26	[0-1.17]	0.23	0.22	0.22	[0-.84]	-	-
TNFβ	0.02	0.02	0.03	[0-.1]	0.02	0.03	0.00	[0-.08]	-	-
SCF	0.65	0.71	0.48	[0-3.29]	0.90	0.98	0.60	[0-3.47]	-	-
IL-12p70	0.18	0.31	0.04	[0-1.72]	0.10	0.14	0.02	[0-.53]	-	-
SCFGβ	2.54	3.21	1.28	[0-15.46]	2.57	3.70	1.13	[0-18.79]	1.0	0.404
CCL2	0.16	0.25	0.08	[0-1.47]	0.16	0.31	0.01	[0-1.53]	-	-
βNGF	0.06	0.10	0.04	[0-.59]	0.05	0.08	0.00	[0-.38]	-	-
IL-10	0.00	0.01	0.00	[0-.03]	0.00	0.00	0.00	[0-.01]	-	-
IL-17	0.05	0.08	0.00	[0-.33]	0.08	0.15	0.00	[0-.55]	-	-
IL-6	0.35	0.76	0.01	[0-4.03]	0.74	1.72	0.02	[0-7.86]	-	-
IL-3	2.98	4.41	1.42	[0-20.35]	3.20	3.93	2.52	[0-18.77]	1.1	0.549
IFN-α2	0.45	0.30	0.43	[0-1.25]	0.42	0.32	0.44	[0-1.33]	-	-
PDGFbb	0.02	0.06	0.00	[0-.32]	0.06	0.27	0.00	[0-1.74]	-	-
IL-2	0.01	0.02	0.00	[0-.12]	0.00	0.01	0.00	[0-.05]	-	-
TRAIL	0.33	0.41	0.21	[0-1.89]	0.33	0.44	0.16	[0-2.24]	-	-
VEGF	12.94	20.97	5.10	[.26-120.91]	9.18	9.98	5.16	[.09-46.65]	0.7	0.786
IL-2Rα	0.32	0.37	0.23	[0-1.83]	0.34	0.38	0.21	[0-1.66]	-	-
TNFα	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
G-CSF	0.02	0.05	0.00	[0-.24]	0.05	0.13	0.00	[0-.7]	-	-
IL-9	0.01	0.02	0.00	[0-.11]	0.00	0.01	0.00	[0-.08]	-	-
M-CSF	0.43	0.51	0.33	[0-2.96]	0.36	0.30	0.35	[0-1.1]	-	-
IL-4	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
IL-15	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
IL-5	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-

Abréviations: Moy : moyenne ; DS : déviation standard ; Méd : médiane

**Tableau II :** Quantification des cytokines, chemokines et facteurs de croissance dans les CRC MSS et MSI

### *Corrélations cellules inflammatoires / cytokines*

Nous avons pu corrélérer significativement des sous-populations inflammatoires et l'expression de cytokines, en particulier CXCL9 et CXCL10 (Tableau III).

Par exemple, dans les tumeurs MSS, de forts niveaux de CXCL9 étaient significativement associés à une augmentation de la densité intra-tumorale de lymphocytes CD3+, CD8+ et T-Bet+. De manière intéressante, dans les tumeurs MSI, cette corrélation persistait, était encore plus

		CXCL8			CXCL9			IL-1-β			CXCL10			IL-16			MIF		
		Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p
MSI	CD3 <i>it</i>	1019	751	0.145	404	1577	<0.0001	1007	715	0.307	639	1201	0.056	751	1074	0.069	841	956	0.874
	CD3 <i>p</i>	1746	1249	0.114	910	1592	0.032	1479	1350	0.526	1612	1336	0.248	1612	1303	0.741	1609	1324	0.934
	CD8 <i>it</i>	525	473	0.351	147	952	<0.0001	613	294	0.166	276	882	0.010	312	760	0.010	474	525	0.803
	CD8 <i>p</i>	764	632	0.409	480	1000	0.004	725	598	0.313	598	894	0.020	617	787	0.465	661	680	0.953
	CD45RO <i>it</i>	1362	1356	0.519	779	1710	0.001	1394	1228	0.318	981	1618	0.039	1059	1565	0.045	1521	1172	0.182
	CD45RO <i>p</i>	2474	2754	0.962	1517	3280	0.053	3245	2073	0.139	2007	3018	0.509	2354	3245	0.777	3303	2449	0.318
	T-Bet <i>it</i>	319	231	0.509	148	411	0.000	277	214	0.540	154	325	0.038	199	321	0.097	231	279	0.892
	T-Bet <i>p</i>	94	110	0.556	49	148	0.001	112	90	0.589	103	119	0.212	91	120	0.126	104	114	0.916
	FoxP3 <i>it</i>	207	211	0.604	194	239	0.358	198	230	0.404	197	224	0.850	159	246	0.124	190	224	0.690
	FoxP3 <i>p</i>	259	272	0.697	222	262	0.981	208	348	0.109	302	209	0.129	222	262	0.788	222	325	0.733
	CD68 <i>it</i>	627	506	0.570	401	691	0.084	705	408	0.188	532	650	0.363	415	691	0.139	677	501	0.633
	CD68 <i>p</i>	921	609	0.509	602	942	0.164	1070	550	0.023	771	921	0.777	848	778	0.962	858	775	0.664
	CD20 <i>it</i>	8	4	0.539	3	12	0.127	10	6	0.555	8	7	0.909	7	12	0.065	10	3	0.089
CD20 <i>p</i>	42	67	0.443	18	88	0.031	69	34	0.725	65	44	0.751	18	82	0.126	50	82	0.679	
MSS	CD3 <i>it</i>	510	637	0.281	499	698	0.051	540	588	0.451	540	698	0.060	556	674	0.418	417	674	0.050
	CD3 <i>p</i>	741	828	0.482	612	845	0.206	751	808	0.994	759	808	0.589	624	898	0.246	746	818	0.416
	CD8 <i>it</i>	108	155	0.379	82	174	0.014	142	155	0.314	108	163	0.058	127	159	0.342	82	189	0.051
	CD8 <i>p</i>	314	328	0.954	254	369	0.445	329	294	0.594	271	334	0.718	254	353	0.535	219	382	0.042
	CD45RO <i>it</i>	529	664	0.207	553	623	0.380	529	664	0.388	579	494	0.513	521	563	0.786	389	722	0.044
	CD45RO <i>p</i>	1228	1723	0.149	1598	1862	0.133	1144	1722	0.348	1598	1722	0.348	1144	1722	0.264	1610	1808	0.554
	T-Bet <i>it</i>	50	58	0.897	44	143	0.001	62	53	0.762	44	138	0.001	50	85	0.106	41	114	0.116
	T-Bet <i>p</i>	34	45	0.693	34	53	0.229	31	53	0.447	31	59	0.028	42	36	0.569	32	60	0.149
	FoxP3 <i>it</i>	255	233	0.588	230	255	0.379	255	233	0.598	161	291	0.035	200	319	0.015	276	233	0.961
	FoxP3 <i>p</i>	239	186	0.851	184	203	0.708	318	157	0.226	210	187	0.507	166	2377	0.480	218	152	0.614
	CD68 <i>it</i>	212	318	0.356	195	353	0.038	243	283	0.468	212	353	0.188	209	283	0.364	218	402	0.098
	CD68 <i>p</i>	507	531	0.420	441	708	0.099	519	500	0.842	501	531	0.773	531	500	0.706	475	633	0.399
	CD20 <i>it</i>	6	7	0.349	4	21	0.018	6	15	0.257	6	15	0.213	5	11	0.223	4	11	0.058
CD20 <i>p</i>	50	50	0.448	61	47	0.638	39	54	0.255	61	45	0.565	46	64	0.844	49	54	0.413	

La densité de cellules immunopositives localisées au centre (*it*) ou en périphérie (*p*) de la tumeur est donnée en nombre de cellules /mm<sup>2</sup> en fonction du niveau d'expression des chimiokines

**Tableau III :** Quantification des cytokines, chemokines et facteurs de croissance dans les CRC MSS et MSI.

significative, ne se limitait pas au centre de la tumeur et impliquait d'autres populations comme les lymphocytes T mémoires CD45RO+.

## DISCUSSION

Les tumeurs de type MSI sont caractérisées par un microenvironnement tumoral inflammatoire qui pourrait expliquer leur bon pronostic (7). Dans cette étude, nous avons documenté le type de cellules inflammatoires recrutées au site tumoral et analysé leur contenu cytokinique. En utilisant un système d'analyse d'images permettant d'objectiver et de quantifier l'infiltrat immun, nous avons mis en évidence un recrutement de cellules inflammatoires orientées vers une réponse anti-tumorale (lymphocytes T cytotoxiques, helpers et mémoires) dans les tumeurs de type MSI alors que la densité en lymphocytes FoxP3,

qui contrecarrent cette réponse et sont plutôt orientés vers une tolérance immunologique, n'était pas modifiée par rapport aux tumeurs MSS.

Un des mécanismes impliqués dans le recrutement des cellules inflammatoires au site tumoral est l'expression, par les cellules tumorales et/ou par le microenvironnement tumoral, de facteurs de croissances, de chimiokines ou de cytokines (12). Nous avons montré un profil cytokinique particulier dans les mêmes échantillons que ceux pour lesquels un recrutement lymphocytaire existait. Ainsi, les chimiokines CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CCL5 étaient significativement surexprimées dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS. Ces chimiokines, pouvant être produites aussi bien par les cellules inflammatoires que par les cellules

tumorales, pourraient à leur tour participer au recrutement de cellules inflammatoires (12,13).

En résumé, nos données suggèrent l'existence d'une régulation fine du microenvironnement tumoral dans les tumeurs de type MSI conduisant à un re-

crutement de populations lymphocytaires spécifiques au travers de l'expression de chimiokines (14). En particulier, dans les CRC MSI, l'axe CXCL9/CXCL10 impliqué dans la polarisation d'une réponse immune de type Th1 est activé et participe très probablement au bon pronostic de ce type tumoral.

## BIBLIOGRAPHIE

1. SAMEER AS, NISSAR S, FATIMA K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2014;23:246–57.
2. GEIERSBACH KB, SAMOWITZ WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:1269–77.
3. WOERNER SM, YUAN YP, BENNER A, KORFF S, VON KNEBEL DOEBERITZ M, BORK P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D682–9.
4. LINNEBACHER M, GEBERT J, RUDY W, ET AL. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer J Int Cancer* 2001;93:6–11.
5. SCHWITALLE Y, KLOOR M, EIERMANN S, ET AL. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008;134:988–97.
6. SAETERDAL I, BJØRHEIM J, LISLERUD K, ET AL. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13255–60.
7. OGINO S, GOEL A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn JMD* 2008;10:13–27.
8. PAGÈS F, BERGER A, CAMUS M, ET AL. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654–66.
9. GALON J, COSTES A, SANCHEZ-CABO F, ET AL. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
10. WANG K, KARIN M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res* 2015;128:173–96.
11. BOISSIÈRE-MICHOT F, DENOUEL A, BOULLE N, ET AL. The non-crosslinking fixative RCL2®-CS100 is compatible with both pathology diagnosis and molecular analyses. *Pathol Oncol Res POR* 2013;19:41–53.

12. VERBEKE H, STRUYF S, LAUREYS G, VAN DAMME J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:345–58.
13. CHANG L-Y, LIN Y-C, MAHALINGAM J, ET AL. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- $\beta$ -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Res* 2012;72:1092–102.
14. BOISSIÈRE-MICHOT F, LAZENNEC G, FRUGIER H, ET AL. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2014;3:e29256.