

# THESE DE DOCTORAT DE

## L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Immunologie-Cancérologie

Par

**Linda BILONDA MUTALA**

## **Rôle de l'inflammasome des cellules tumorales dans l'immunosurveillance des cancers colorectaux par les lymphocytes T infiltrant la tumeur**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 Décembre 2020

Unités de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers /  
INSERM U1232 Equipe 3 et Institut Roche, France

### Rapporteurs :

Hervé BLOTTIERE      Directeur de Recherche, INRA-AgroParis Tech-Université Paris-Saclay  
Franck MOREL      Professeur des Universités, Université de Poitiers

### Composition du Jury :

Président :	Jaafar BENNOUNA	PU-PH, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes
Examineurs :	Magnus FONTES	Professeur des Universités, Université de Copenhague, Danemark et Institut Roche, France
Directrice de thèse :	Anne JARRY	Chargée de recherche CRCINA/Inserm U1232
Co-Directrice :	Camille BROCHIER	Chercheur Industriel, Institut Roche
Co-Encadrante :	Céline BOSSARD	PU-PH, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes

# Remerciements

**Je tiens à adresser tous mes remerciements :**

**A Monsieur le Docteur Hervé Blottière et Monsieur le Professeur Franck Morel**

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de faire partie du jury de cette thèse en qualité de rapporteur. Merci pour votre disponibilité et votre expertise.

**A Monsieur le Professeur Jaafar Bennouna et Monsieur le Professeur Magnus Fontes**

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de faire partie du jury de cette thèse. Merci pour votre disponibilité et votre expertise.

**A Madame le Docteur Camille Brochier**

Pour ta disponibilité, ton investissement dans le partenariat privé/public et pour tes conseils avisés. Nos différents échanges me permettent d'avoir une bonne vision du monde de la recherche en entreprise.

**A Madame le Professeur Céline Bossard**

Pour ta disponibilité, tes conseils et ton encadrement durant ma thèse. Bien qu'ayant un agenda très chargé, tu as toujours trouvé du temps pour moi et apporté un regard de clinicien à ce travail.

**A Madame le Docteur Anne Jarry**

De m'avoir accueillie depuis mon stage de Master 2 et encadrée durant cette thèse. Merci pour tes encouragements, tes conseils et ta disponibilité durant toutes ces années, qui n'ont pas toujours été faciles, pendant lesquelles j'ai toujours pu compter sur ton soutien indéfectible. Merci de m'avoir soutenue et supportée ; vraisemblablement, ces quelques lignes ne suffiront pas pour t'exprimer toute ma gratitude pour l'encadrement extraordinaire dont j'ai pu bénéficier durant ces quatre années y compris au moment de la rédaction de cette thèse.

**A Madame le Docteur Emmanuelle Godefroy**

Pour ton accompagnement et tes conseils à l'occasion des comités de suivi de thèse. Merci pour ta collaboration à l'aboutissement de cette thèse.

**A Madame Cécile Deleine**

Pour ton sens de l'organisation, ton investissement dans ce beau projet et pour ta disponibilité. Merci pour tes conseils, ton aide et ton soutien sans faille durant ces quatre années.

**Aux membres de l'équipe 3 du CRCINA**

Pour votre accueil et l'ambiance chaleureuse qui règne dans l'équipe. Merci plus particulièrement à **Madame le Docteur Nathalie Labarrière, la Cheffe d'équipe!**, pour son accueil au sein de cette équipe merveilleuse ; **A Madame le Professeur Nadine Gervois** pour ta disponibilité et tes remarques constructives ; **A Madame le futur Docteur Lucine Marotte** pour ces moments fous qu'on a pu partager ; **Mesdames les futures docteurs**

**Emilie Dupré et Kathleen Ducoin** pour votre sens de l'organisation et du partage, votre bonne humeur. A **Mesdames Tiffany Beauvais, Floriane Briand et Monsieur Romain Oger** pour tous ces mots gentils et vos encouragements. A **Madame le Docteur Catherine Rabu, Monsieur le Docteur Housseem Benlalam et Monsieur le Professeur François Lang** pour vos remarques constructives lors des réunions d'équipe du mardi et vos encouragements.

Aux anciens membres de l'équipe, Mesdames **Virginie Vignard, Delphine Fradin et Agnès Fortun** pour l'accueil et votre disponibilité pour répondre à mes questions de nouvel arrivante au sein de l'IRS-UN.

### ***Aux personnels de l'Institut Roche***

Pour votre accueil et encadrement au sein de l'Institut. Merci plus particulièrement à **Madame Nathalie Etienne** pour ta disponibilité, tu as toujours trouvé du temps pour me guider à travers tous les outils mis en place au sein de cette merveilleuse entreprise.

### ***A la clinique des données du CHU de Nantes***

Pour l'encadrement et vos conseils d'expert au moment des analyses statistiques qui ont rythmées mes vendredis matins. Merci à **Mesdames Matilde Karakachoff et Olivia Rousseau** qui m'ont fait découvrir les analyses sous Rstudio. Si ce puissant outil n'a presque plus de secret pour moi, c'est grâce à vous deux. Merci à **Monsieur le Professeur Pierre-Antoine Gourraud** pour l'accueil au sein de la clinique des données.

### ***Aux plateformes de la SFR Bonamy (Micropicell et Cytocell)***

Merci Stéphanie, Marine, Steven, Philippe pour votre aide précieuse et vos conseils en analyse d'images et en microscopie confocale.

Merci Nicolas pour ton expertise et ton aide en cytométrie en flux et dans la mise au point de multimarquages si compliqués sur tissus tumoraux humains.

### ***Aux cliniciens du CHU de Nantes***

Un grand merci au service de chirurgie digestive, d'anatomie pathologique et à la tumorothèque du CHU de Nantes pour votre aide et implication dans le recrutement des patients et la biocollection de CCR. Sans vous, ce travail n'aurait pas été possible.

### ***A mon conjoint et à ma fille***

Vous êtes sans doute ma source d'énergie. Merci pour vos encouragements, d'avoir toujours cru en moi, du sacrifice énorme pour m'accompagner dans mes projets un peu fous parfois. J'ai toujours pu compter sur vous deux.

### ***A ma famille d'ici et d'ailleurs***

Loin des yeux, près du cœur ! Merci plus particulièrement à **mes parents**, d'avoir toujours cru en moi et pour vos encouragements. Sans vous, je n'en serai pas là. Merci à **mes frères et sœurs** pour vos encouragements.

## Liste des abréviations

<b>aCasp1</b> : active caspase-1	<b>EGFR</b> : Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ACE</b> : antigène carcino-embryonnaire	<b>FCA</b> : Foyers de Cryptes Aberrantes
<b>ACT</b> : adoptive cell therapy	<b>FOXP3</b> : Forkhead box P3
<b>ADK</b> : Adénocarcinome	<b>GSDM</b> : Gasdermine
<b>ADP</b> : Adénosine diphosphate	<b>HLA</b> : Human Leucocyte Antigen
<b>AIM2</b> : Absent in melanoma 2	<b>HMGB1</b> : high-mobility group box 1
<b>ALR</b> : Absent in melanoma 2 Like Receptor	<b>ICE</b> : IL-1 Converting Enzyme
<b>AOM</b> : Azoxyméthane	<b>ICP</b> : immune checkpoints
<b>ASC</b> : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	<b>IDO-1</b> : Indoleamine 2,3-dioxygénase
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>IEL-TILs</b> : intraepithelial- Tumor infiltrating lymphocytes
<b>CAC</b> : Colitis-Associated Cancer	<b>IFN</b> : Interféron
<b>CARD</b> : Caspase Recruitment Domains	<b>IL</b> : Interleukine
<b>CAR-T</b> : chimeric antigen receptor T cell	<b>iLC</b> : innate lymphoid cells
<b>CCR</b> : Cancer colorectal	<b>LAG3</b> : Lymphocyte activation gene-3
<b>CD</b> : Cluster of differentiation	<b>LB</b> : Lymphocyte B
<b>CIMP</b> : CpG island methylator phenotype	<b>LT</b> : Lymphocytes T
<b>CIN</b> : Chromosome instability	<b>MDSC</b> : Cellules myéloïdes suppressives
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>MET</b> : microenvironnement tumoral
<b>CMS</b> : Consensus Molecular Subtypes	<b>MICI</b> : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4	<b>MMR</b> : DNA mismatch repair
<b>DAB</b> : 3,3'-Diaminobenzidine	<b>MSI</b> : Microsatellite instability
<b>DAMP</b> : Danger Associated Molecular Pattern	<b>MSS</b> : Microsatellite stability
<b>DEG</b> : differentially expressed genes	<b>NK</b> : Natural Killer
<b>DSS</b> : Dextran-sulfate de sodium	<b>NLR</b> : NOD like receptor
<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor	<b>NOD</b> : nucleotide oligomerization domain
	<b>NOS</b> : not otherwise specified
	<b>PAF</b> : Polypose adénomateuse familiale

**PAMP** : Pathogen-associated Molecular Pattern

**PD1** : Programmed death 1

**PD-L1** : Programmed death-Ligand 1

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**pTNM** : Pathological Tumor Node Metastasis

**ROS** : Reactive oxygen species

**SII** : Système immunitaire intestinal

**T-bet** : T-box expressed in T cells

**Tc1** : Lymphocyte T cytotoxique

**TCGA** : The Cancer Genome Atlas

**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor beta

**Th1** : Lymphocyte T auxiliaire de type 1

**Th17** : Lymphocyte T auxiliaire de type 17

**Th2** : Lymphocyte T auxiliaire de type 2

**TIGIT** : T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain

**TILs** : Tumor infiltrating lymphocytes

**TIM3** : T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3

**TLR** : Toll like receptor

**TNCD** : Thésaurus National de Cancérologie Digestive

**TNF** : Tumor necrosis factor

**Treg** : Lymphocyte T régulateur

**UICC** : Union for International Cancer Control

## Table des matières

Préambule .....	8
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>10</b>
<b>I. Brefs rappels sur la muqueuse colique normale.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1 La muqueuse colique : une barrière physicochimique en renouvellement constant .....</b>	<b>13</b>
<b>I.2 La muqueuse colique : une barrière immunologique en interaction avec le microbiote intestinal.....</b>	<b>15</b>
<b>II. Les cancers colorectaux .....</b>	<b>17</b>
<b>II.1 Epidémiologie .....</b>	<b>17</b>
<b>II.2 Facteurs de risque .....</b>	<b>17</b>
<b>II.3 Voies d'oncogenèse.....</b>	<b>18</b>
<b>II.3.A) Altérations génétiques des tumeurs de la voie “classique” ou CIN .....</b>	<b>19</b>
<b>II.3.B) Altérations génétiques des tumeurs sporadiques de phénotype MSI.....</b>	<b>19</b>
<b>II.4 Classification moléculaire.....</b>	<b>20</b>
<b>II.5 Classification anatomopathologique des CCR .....</b>	<b>22</b>
<b>II.5.A) Sous-types histologiques .....</b>	<b>22</b>
<b>II.5.B) Facteurs histopronostiques.....</b>	<b>24</b>
<b>II.6 Prise en charge thérapeutique.....</b>	<b>25</b>
<b>II.6.A) La chirurgie .....</b>	<b>26</b>
<b>II.6.B) La chimiothérapie et la radiothérapie.....</b>	<b>27</b>
<b>II.6.C) Les thérapies ciblées .....</b>	<b>28</b>
<b>III. Le microenvironnement tumoral dans les cancers colorectaux.....</b>	<b>29</b>
<b>III.1 L’immunoédition .....</b>	<b>33</b>
<b>III.1.A) La phase d’élimination.....</b>	<b>33</b>
<b>III.1.B) La phase d’équilibre.....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.C) La phase d’échappement .....</b>	<b>35</b>
<b>III.2 L’immunosubversion.....</b>	<b>35</b>
<b>III.2.A) Le recrutement de cellules immuno-régulatrices .....</b>	<b>35</b>
<b>III.2.B) L’altération des voies métaboliques.....</b>	<b>36</b>
<b>III.2.C) La surexpression des points de contrôle immunitaires.....</b>	<b>37</b>
<b>III.3 Les stratégies d’immunothérapie dans les CCR.....</b>	<b>42</b>
<b>III.3.A) Généralités .....</b>	<b>42</b>
<b>III.3.A) Inhibition des ICP .....</b>	<b>43</b>
<b>III.3.B) Vaccination anti-cancéreuse .....</b>	<b>44</b>
<b>III.3.C) Transfert adoptif .....</b>	<b>45</b>
<b>IV. L’inflammasome .....</b>	<b>47</b>
<b>IV.1 Les récepteurs de l’inflammasome.....</b>	<b>48</b>

IV.1.A) Les inflammasomes de type NLRs .....	49
IV.1.B) Les inflammasomes de type ALRs .....	50
IV.1 C) Protéine adaptatrice des ALRs et NLRPs .....	51
IV.2 Protéine effectrice de l'inflammasome : la caspase-1 .....	52
IV.3 Les substrats de la caspase-1.....	54
IV.3.A) L'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ).....	54
IV.3.B) L'interleukine 18 (IL-18).....	54
IV.3.C) Les gasdermines (GSDM) .....	56
IV.4. L'inflammasome dans l'homéostasie colique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) .....	57
IV.5 L'inflammasome dans les cancers coliques .....	59
<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS</b> .....	61
<b>RESULTATS</b> .....	64
Objectifs et résumé de l'article 1.....	65
Annexe à l'article 1 : Profil d'expression des principaux points de contrôle immunitaires dans les CCR (PD1, TIGIT, TIM3, LAG3).....	84
Objectifs et résumé de l'article 2.....	86
Annexe à l'article 2 : Validation des trois clusters par ré-échantillonnage ou «bootstrapping» .....	111
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	113
1. Les biomarqueurs de réponse aux immunothérapies dans les CCR.....	114
1.1) Expression de marqueurs inhibiteurs de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale : importance de l'axe PD1/PDL1 et d'IDO-1 dans les CCR .....	115
1.2) Infiltrat en TILs : T-bet est un biomarqueur pronostique et prédictif d'une réponse Th1/Tc1 préexistante dans les CCR .....	116
1.3) Estimation de la charge mutationnelle de la tumeur .....	117
1.4) Composition du microbiote intestinal .....	118
2. L'inflammasome des cellules tumorales (axe caspase-1/IL-18) : un modulateur de la réponse anti-tumorale Th1/Tc1 des TILs dans les CCR .....	118
2.1) Axe caspase-1/IL-18 dans les cellules tumorales : un potentiel modulateur de la réponse IFN $\gamma$ anti-tumorale des TILs Th1/Tc1 chez l'homme .....	119
2.2) Existence de différents sous-groupes de CCR .....	121
Conclusion générale .....	122
Références .....	123

## Préambule

Ce sujet de thèse s'intègre dans une problématique très actuelle visant à mieux comprendre les interactions entre cellules tumorales et lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) dans la progression des cancers colorectaux (CCR) chez l'homme. Ceci afin d'identifier de nouveaux mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire, et de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces dernières années, les travaux de Pagès et Galon ont clairement montré le rôle des lymphocytes T cytotoxiques et mémoires dans le contrôle de la progression tumorale des CCR non métastatiques. D'autres travaux ont identifié des points de contrôle immunitaire détournés par la cellule tumorale pour échapper à cette réponse médiée par les TILs. Cette meilleure connaissance de la biologie du microenvironnement tumoral a été à l'origine de nouvelles approches thérapeutiques majeures comme l'avènement de l'immunothérapie. En effet, l'immunothérapie, bouleversant le paradigme prévalant jusqu'alors, qui était de cibler uniquement la cellule tumorale, a permis des progrès significatifs dans la prise en charge de certaines tumeurs solides comme le mélanome, avec une survie à long terme jamais observée auparavant.

Dans les CCR, l'immunothérapie ciblant les points de contrôle PD1 et CTLA-4 a également trouvé sa place, avec un bénéfice significatif dans un sous-groupe de CCR caractérisé par une instabilité microsatellitaire. Cette approche prometteuse reste cependant insuffisante pour la majorité des CCR se caractérisant par une absence d'instabilité microsatellitaire.

L'**introduction** de ce mémoire, après un bref rappel sur les caractéristiques de la barrière épithéliale colique normale, présente des généralités sur le cancer colorectal puis se focalise sur les connaissances actuelles du microenvironnement tumoral dans la progression de la tumeur et ses implications thérapeutiques. Enfin, nous aborderons la présentation de l'inflammasome, son rôle en physiologie dans le côlon normal et son implication potentielle dans la régulation de la réponse immunitaire du microenvironnement.

Dans la première partie des **résultats (article 1)**, nous nous focaliserons sur une approche plus facilement utilisable en routine clinique pour appréhender la réponse Th1/Tc1, c'est-à-dire l'évaluation du marqueur T-bet, facteur de transcription impliqué dans la différenciation terminale des lymphocytes T effecteurs de type Th1/T cytotoxique. De plus, nous avons testé *ex vivo* la pertinence de ce marqueur pour évaluer la réponse aux immunothérapies. Ceci a été possible grâce à l'exploitation multiparamétrique de la

biocollection de CCR établie par la tumorotheque du CHU de Nantes, en collaboration avec les chirurgiens digestifs, les oncologues et les pathologistes, et au développement d'un modele de culture d'explants que j'ai contribue a mettre en place. Cette etude a ete publiee dans Oncoimmunology en 2019.

Dans la seconde partie des **resultats (article 2)**, nous nous interessons aux fonctions immunomodulatrices des cellules tumorales, plus precisement a travers une plateforme de l'immunité innée, l'inflammasome. L'équipe a précédemment montré que cette plateforme de l'immunité innée était présente dans les cellules épithéliales coliques humaines normales et jouait un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale et le déclenchement d'une réponse immunitaire  $IFN\gamma$  en cas d'agression bactérienne. L'objectif de cette seconde partie était d'examiner le statut de l'inflammasome dans les cellules tumorales coliques et d'analyser sa capacité à réguler une réponse anti-tumorale Th1/Tc1 ( $IFN\gamma$ ). Il s'agit à notre connaissance de la toute première étude abordant ce point chez l'homme. Un deuxième article, qui sera publié dans la revue Cancers (Basel) en 2021, présente les résultats de cette étude.

Enfin, une partie "**discussion et perspectives**" terminera ce manuscrit en abordant notamment la pertinence 1) de l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse aux immunothérapies dans les CCR et 2) de la prise en compte de l'inflammasome des cellules tumorales en tant que modulateur potentiel de la réponse immunitaire anti-tumorale.

# **INTRODUCTION GENERALE**

## I. Brefs rappels sur la muqueuse colique normale

Le côlon et le rectum constituent la partie terminale du tube digestif, plus communément appelé “gros intestin” en opposition à l’intestin grêle, qui s’abouche *via* la valvule de Bauhin. Le côlon est composé de plusieurs segments : le côlon droit ou colon ascendant qui comprend le cæcum où se situe l’appendice vermiforme, le côlon transverse reliant le côlon droit au côlon gauche aussi appelé côlon descendant qui se termine par l’anse sigmoïde (côlon sigmoïde) pour aboutir au rectum puis à l’anus (Figure 1). Pendant longtemps, la fonction principale attribuée au côlon était de favoriser l’élimination des résidus alimentaires par réabsorption de l’eau et des électrolytes. Actuellement, le côlon est considéré comme un organe complexe aux multiples fonctions dont celle de barrière physique et fonctionnelle constituée de cellules spécialisées capables d’interagir entre elles et séparant le milieu extérieur (lumière intestinale) qui renferme la flore intestinale du milieu intérieur. En effet, le côlon est très riche en microorganismes dont les bactéries majoritairement, mais aussi les virus, les champignons et les archées. Les bactéries du microbiote intestinal participent à la biotransformation des substrats présents dans les fibres alimentaires non digérées par l’homme, dans le tractus digestif supérieur, en une diversité de métabolites bénéfiques pour le microbiote et l’organisme (Landman *et al.*, 2016). Outre ces fonctions métaboliques, le microbiote intestinal participe également au développement et à la maturation du système immunitaire, comme précisé ci-dessous (Macpherson *et al.*, 2014).

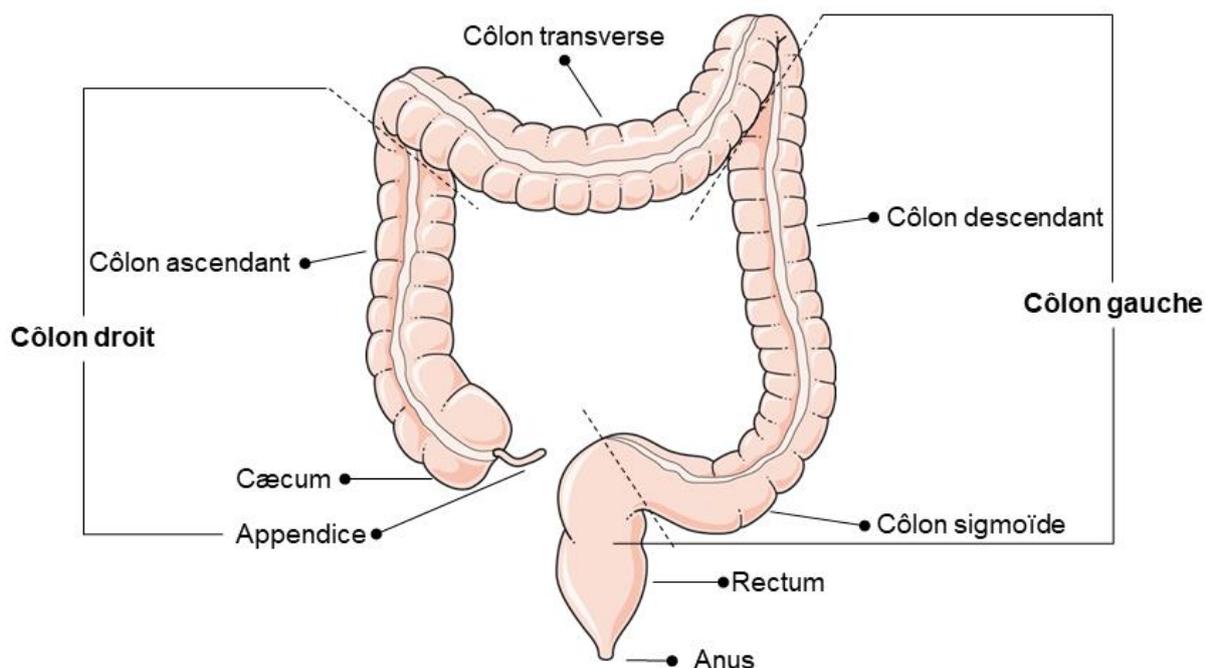


Figure.1. Structure et segmentation du gros intestin. *Image adaptée de Servier medical art*

Le côlon est constitué, comme tout le long du tube digestif, de quatre tuniques concentriques successives dont : la muqueuse, à l'interface entre les milieux extérieur (lumière) et intérieur, joue un rôle majeur dans l'homéostasie colique et est détaillée ci-dessous ; la sous-muqueuse, tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins, des cellules lymphoïdes et des cellules nerveuses (plexus de Meissner) ; la musculuse composée de cellules musculaires lisses disposées selon 2 axes formant une couche circulaire interne et longitudinale externe, ainsi que du plexus d'Auerbach gouvernant le péristaltisme ; la séreuse, tunique la plus externe, en continuité avec le mésentère ou mésocôlon qui relie le côlon à la paroi abdominale et contient des ganglions lymphatiques dits ganglions mésentériques (Figure 2).

**La muqueuse colique**, couche la plus interne du côlon, est composée d'une monocouche de cellules formant un épithélium ponctué de nombreuses invaginations formant les cryptes coliques (Figure 3). Ces cryptes s'invaginent dans un tissu conjonctif lâche nommé *lamina propria* ou chorion qui contient des fibroblastes, des myofibroblastes situés autour des cryptes, des capillaires lymphatiques et sanguins, ainsi que des cellules immunitaires mononucléées isolées ou regroupées en follicules lymphoïdes. Les principales cellules immunitaires résidentes du chorion sont les macrophages, situés préférentiellement au contact des cellules épithéliales, les cellules dendritiques, lymphocytes T et B (LT et LB), plasmocytes sécréteurs d'IgA et les cellules lymphoïdes innées (iLC) (Figure 3). Actuellement, la muqueuse colique est considérée comme une interface dynamique formant 1) une barrière physicochimique étanche et modulable en renouvellement constant et 2) une barrière immunologique en interaction avec le microbiote intestinal.

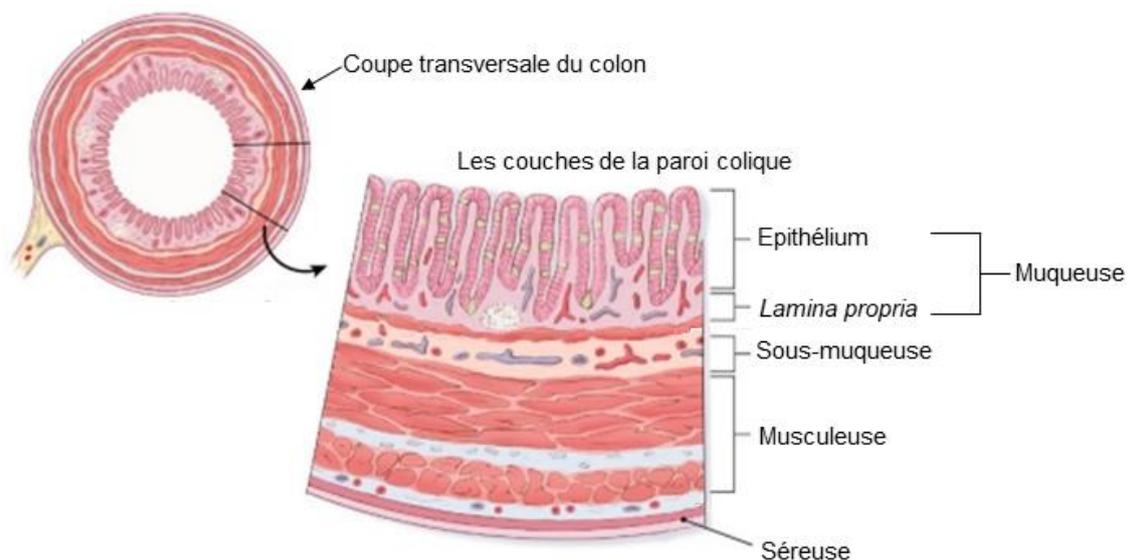


Figure.2. Schéma de la paroi du côlon. Adapté de «American Cancer Society»

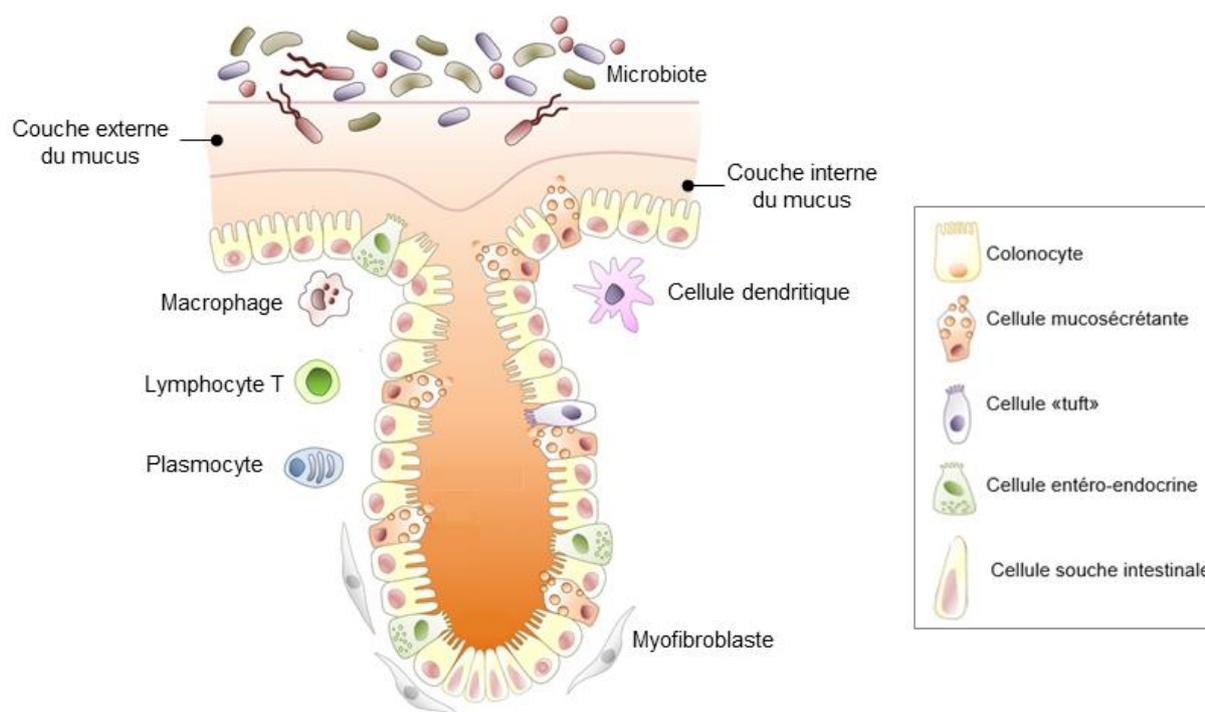


Figure 3. Crypte colique. *Adapté d'Allaire et al., 2018*

### I.1 La muqueuse colique : une barrière physicochimique en renouvellement constant

Les nombreuses cryptes coliques parallèles les unes aux autres, sont composées de différentes cellules épithéliales spécialisées et polarisées, assurant la propriété de barrière physique entre le milieu intérieur et le contenu luminal. La base de la crypte est composée de quelques **cellules souches** proliférantes qui assurent le renouvellement de l'épithélium, tous les 4 à 5 jours chez l'homme (Darwich *et al.*, 2014), et donnent naissance aux différents types cellulaires de l'épithélium (Cheng *et al.*, 1974 ; Winton *et al.*, 1988 ; Bjerknes *et al.*, 1999). A chaque division, les cellules souches intestinales engendrent des progéniteurs des deux principaux types cellulaires de l'épithélium colique : les cellules absorbantes, appelées colonocytes, et les cellules de type sécrétoire qui comprennent les cellules mucosécrétantes dites caliciformes, les cellules entéro-endocrines et les cellules «*Tuft*». Ces progéniteurs prolifèrent rapidement et deviennent des cellules épithéliales matures grâce à une régulation fine de plusieurs voies de signalisation dont les principales sont Wnt/ $\beta$ -caténine et Notch (Pinto *et al.*, 2003 ; Kuhnert *et al.*, 2004 ; Tian *et al.*, 2015) (Figure 4). Les cellules épithéliales se différencient au cours de leur migration vers le sommet de la crypte, où elles meurent par apoptose et sont éliminées dans la lumière intestinale. L'ensemble de ces processus permet la compartimentalisation de la crypte en différentes zones dites de prolifération, de différenciation et d'exfoliation (Figure 5). Une brève description anatomique et fonctionnelle des différentes cellules épithéliales coliques est mentionnée sur la page suivante.

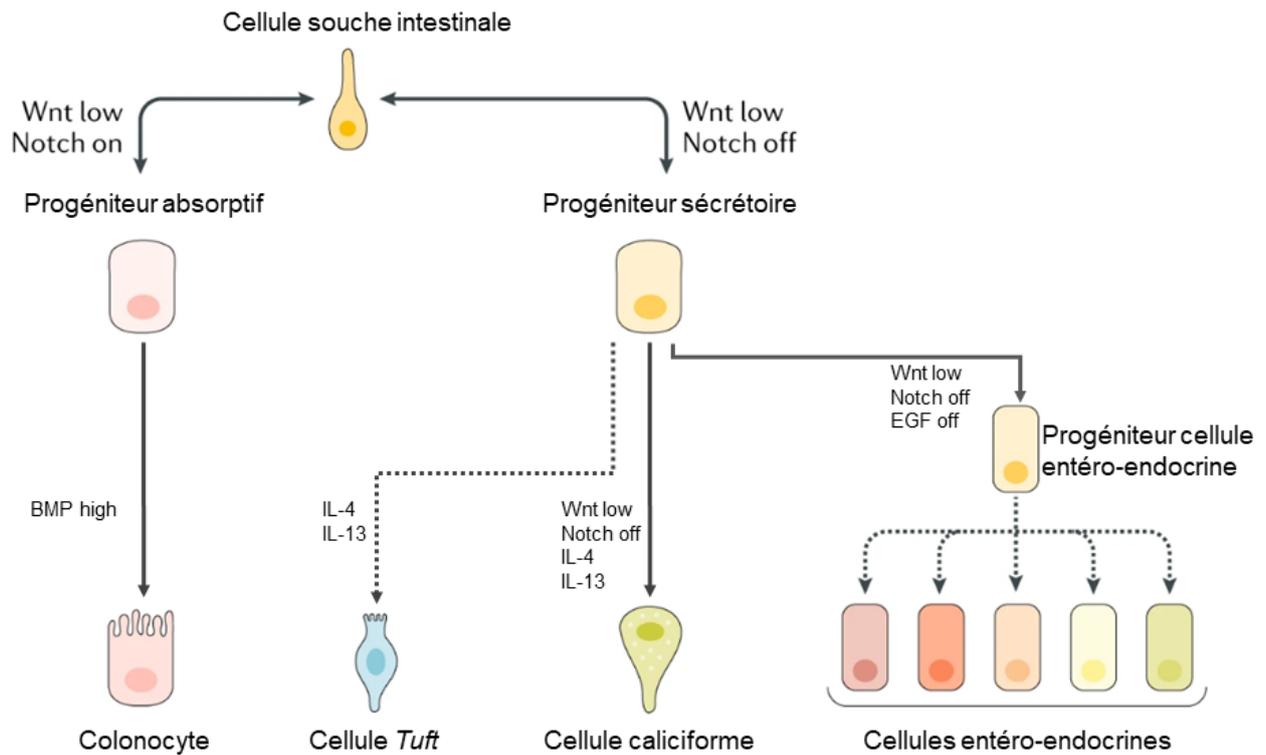


Figure 4. Différenciation des cellules épithéliales spécialisées. *Adapté de Gehart and Clevers 2019*

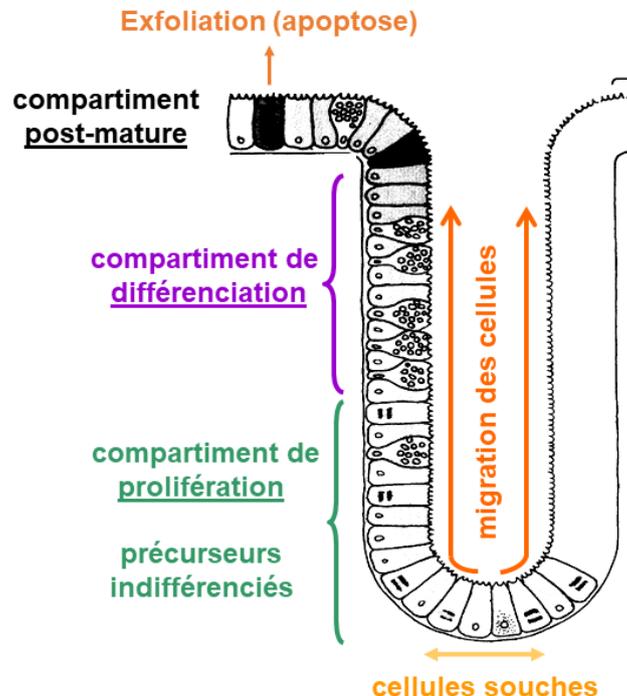


Figure 5. Compartimentalisation de la crypte épithéliale colique

- **Les colonocytes** présentent un pôle apical structurellement et fonctionnellement différent du pôle basolatéral. Le pôle apical présente des microvillosités associées à une bordure en brosse et responsable de l'absorption d'eau et d'électrolytes. Le pôle basolatéral

exprime entre autres de nombreux récepteurs aux IgA dimériques avant leur passage, par endocytose latéro-basale puis exocytose apicale, dans la lumière intestinale (Kurashima & Kiyono, 2017).

- **Les cellules caliciformes ou mucosécrétantes**, très abondantes dans le côlon sigmoïde et le rectum (4 cellules caliciformes pour 1 colonocyte). Elles jouent un rôle important dans la protection de l'épithélium colique car elles renferment des granules de mucus, MUC2 étant la mucine sécrétoire majoritaire dans le côlon. Le mucus sécrété forme un film muqueux épais et lubrifiant, constitué d'une couche externe fluide et d'une couche interne très dense limitant les contacts directs du contenu luminal avec la surface épithéliale (Atuma *et al.*, 2001).
  
- **Les cellules entéro-endocrines** représentent une population hétérogène. Elles sont peu nombreuses (< 1%) dans le gros intestin comparé à toutes les régions du tractus gastro-intestinal et localisées préférentiellement au fond de la crypte. Elles sécrètent des facteurs modulateurs (hormones peptidiques, neuropeptides, cytokines/chimiokines...) qui agissent sur les cellules avoisinantes (effet paracrine) ou sur des organes cibles lorsqu'ils passent dans la circulation sanguine (effet endocrine). Les facteurs sécrétés par les cellules neuroendocrines participent à des fonctions essentielles telles que le péristaltisme intestinal, la régulation des fonctions sécrétoires et absorbantes des cellules épithéliales, la régulation du débit sanguin intestinal, la modulation du système immunitaire (Gribble & Reimann 2016 ; Worthington *et al.*, 2018).
  
- **Les cellules «tuft»** représentent environ 1 à 2% des cellules épithéliales coliques. Il a récemment été montré que ces cellules tuft intestinales sont des cellules sentinelles impliquées dans la réponse immunitaire de type 2 (Th2) (Von Moltke *et al.*, 2015 ; Gerbe *et al.*, 2016 ; Howitt *et al.*, 2016).

## I.2 La muqueuse colique : une barrière immunologique en interaction avec le microbiote intestinal

La colonisation de la lumière intestinale par le microbiote est initiée dès la naissance et se maintient tout au long de la vie. Des interactions tripartites entre microbiote, cellules épithéliales et système immunitaire s'engagent à la naissance et tout au long de la vie pour maintenir l'homéostasie intestinale et éviter des réponses inflammatoires délétères (Nesh 2002). L'effet de la colonisation du microbiote peut se résumer en 3 rôles fondamentaux sur le système immunitaire intestinal (SII) (Moreau 2004). Le premier rôle du microbiote sur le SII est dit "d'activation" ; il est détaillé dans le paragraphe suivant. Le deuxième rôle est qualifié de "modulation", à l'exemple de l'expansion et de la différenciation des plasmocytes intestinaux producteurs des IgA sécrétoires. Enfin, le troisième rôle, dit de "régulation", est impliqué dans la mise en place des fonctions de tolérance aux antigènes alimentaires et aux composants du microbiote intestinal. Ainsi, la colonisation du microbiote dans la lumière intestinale permet la mise en place d'une barrière épithéliale colique efficace (Moreau 2004).

Des contacts directs ou indirects des composants du microbiote avec l'épithélium colique conduisent à l'**activation** permanente et indispensable de l'immunité innée qui aboutit à : 1) la production de mucus par les cellules caliciformes ; 2) la production de peptides antimicrobiens et de radicaux libres par les cellules épithéliales ; 3) au recrutement d'un grand nombre de cellules immunitaires qui viennent renforcer cette barrière. Les cellules de l'immunité innée telles que les phagocytes, cellules dendritiques, iLC sont rapidement mobilisées, tandis que les cellules de l'immunité adaptative telles que les LT et LB sont plus lents à se mobiliser (Cellier et al., 2000).

Les cellules de la barrière épithéliale colique peuvent subir une transformation maligne, probablement due à une dérégulation des interactions tripartites entre la barrière épithéliale, les cellules immunitaires et le microbiote intestinal. Les cellules épithéliales transformées sont à l'origine du processus d'oncogenèse, touchant le côlon et/ou le rectum, qui peut évoluer vers un adénocarcinome appelée **cancer colorectal**, sujet du chapitre suivant.

## II. Les cancers colorectaux

Le cancer colorectal (CCR) représente 10% de tous les cancers diagnostiqués annuellement dans le monde. En France, les CCR représentent 12% des cancers diagnostiqués chez les hommes (22 200 cas) et les femmes (19 000 cas) au cours de l'année 2016 selon l'Institut national du cancer (Inca). Environ un tiers des CCR sont des cancers du rectum (Bray *et al.*, 2018). Ce chapitre résume l'épidémiologie, la classification, le traitement et les caractéristiques moléculaires des CCR.

### II.1 Epidémiologie

Le CCR est un problème majeur de santé publique car son incidence devrait atteindre 2 à 5 millions de nouveaux cas en 2035 dans les pays industrialisés (Arnold *et al.*, 2017). En France et selon l'Inca, le CCR représente 43 336 nouveaux cas en 2018 (23 216 hommes et 20 120 femmes) se plaçant à la troisième place des cancers les plus fréquents après le cancer de la prostate et le cancer du sein. Il est responsable de 17 117 décès en 2018 et son taux de survie à 5 ans est estimé à 63% ; c'est le deuxième cancer le plus meurtrier après le cancer du poumon. Toujours selon l'Inca, 1 personne sur 30 peut être confrontée, au cours de sa vie, à la survenue d'un CCR. L'incidence de développer un CCR augmente avec l'âge, 71 ans étant l'âge moyen du diagnostic et 95% des CCR surviennent après 50 ans. Raison pour laquelle un programme de dépistage massif de CCR ciblant les personnes âgées de 50 à 74 ans est organisé depuis 2009 en France.

### II.2 Facteurs de risque

Les études épidémiologiques montrent une forte association entre le sexe masculin, le vieillissement et l'incidence du CCR. Un terrain inflammatoire, comme dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), est un risque majeur de développer un CCR (Mattar *et al.*, 2011). Les facteurs environnementaux et héréditaires (5 à 7% de CCR) jouent un rôle important dans le développement de ce cancer (Syngal *et al.*, 2015). Plusieurs facteurs environnementaux augmentent le risque de développer un CCR, dont : le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, la consommation de viande rouge et des aliments ultra-transformés, l'obésité. De plus, de nombreuses données récentes sont en faveur de l'implication du microbiote intestinal dans l'oncogenèse, la progression tumorale. En effet, des changements dans la composition de différentes espèces bactériennes (dysbiose), notamment *Fusobacterium*

*nucleatum*, certaines souches de *Bacteroides fragilis* et d'*Escherichia coli* ont été observés dans les selles et/ou la muqueuse de patients atteints de CCR qui pourraient servir de biomarqueurs pronostiques et/ou prédictifs de réponse aux traitements (Blottière *et al.*, 2013 ; Kostic *et al.*, 2013 ; Nakatsu *et al.*, 2015 ; Zitvogel *et al.*, 2015 ; Kwong *et al.*, 2018 ; Wong & Yu 2019).

### II.3 Voies d'oncogénèse

Dans la grande majorité des cas, les CCR sont des adénocarcinomes qui se développent suite à une hyperprolifération de l'épithélium colique. Les premières anomalies décelables morphologiquement sont les foyers de cryptes aberrantes (FCA) (Takayama *et al.*, 1998). Puis, apparaissent les polypes bénins (adénomes) qui peuvent évoluer en adénocarcinome (Fearon & Vogelstein 1990 ; Fodde *et al.*, 2001) (figure 6).

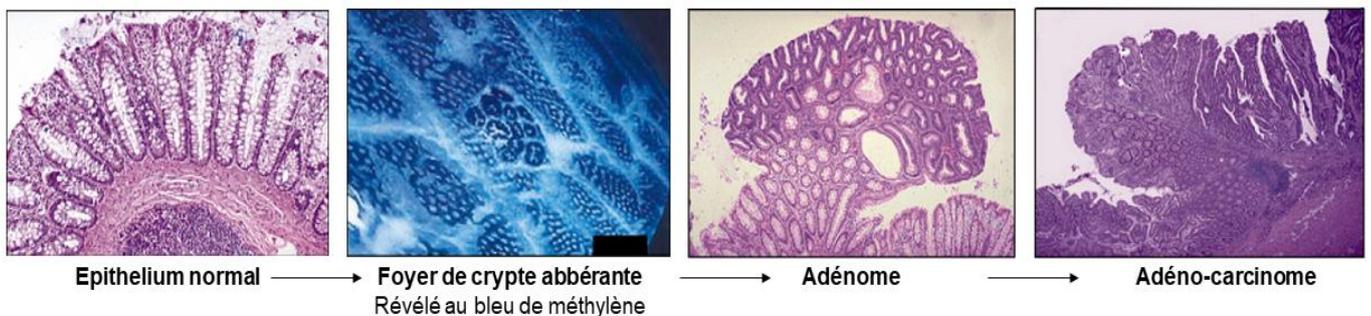


Figure 6. Histologie des lésions conduisant au développement d'un cancer colorectal

Il existe deux voies majeures d'oncogénèse colique qui conduisent à une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales donnant naissance à des lésions précancéreuses puis au cancer : la voie "classique" (70 à 80% des CCR) présentant une séquence adénome-adénocarcinome, caractérisée par une instabilité chromosomique (CIN, *chromosomal instability*) et la voie néoplasique dite «festonnée» (10 à 15% de CCR), caractérisée par les mutations d'oncogènes tels que *KRAS* et *BRAF*, la méthylation excessive des îlots CpG et une grande fréquence d'instabilité microsatellitaire (phénotype MSI) (Dekker *et al.*, 2019). Environ 5 à 7% des CCR sont des formes héréditaires : la polypose adénomateuse familiale (PAF) se caractérisant par une transmission autosomique dominante du gène APC muté et représentant environ 1% de tous les CCR ; le syndrome de Lynch, caractérisé par des mutations germinales touchant les gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN à l'origine du phénotype MSI. Le syndrome de Lynch est responsable de 3 à 7% des CCR (Jiao *et al.*, 2014 ; Dekker *et al.*, 2019).

### II.3.A) Altérations génétiques des tumeurs de la voie "classique" ou CIN

Cette voie a été décrite pour la première fois par Hansemann en 1890, qui établissait déjà un rapport entre le statut chromosomique de la tumeur et son degré de différenciation, en comparaison avec le colon normal apparié. C'est en 1990 que Fearon et Vogelstein proposent une origine moléculaire à l'instabilité chromosomique (CIN) observée dans la majorité des CCR. Cette instabilité chromosomique est caractérisée par des pertes alléliques sur le bras court du chromosome 17 et 8 et sur le bras long des chromosomes 5, 18 et 22. Ces pertes sont associées à des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs APC, TP53, SMAD4. En effet, la séquence adénome-adénocarcinome se traduit par de multiples événements séquentiels, génétiques et épigénétiques (Cancer Genome Atlas Network, 2012). De façon générale, la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur APC conduit à une dérégulation de la voie Wnt, à l'activation de la prolifération cellulaire, à la mutation des oncogènes *KRAS* et *BRAF* lors des phases précoces, puis à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *PTEN*, *SMAD4* et/ou *P53* lors des phases plus tardives (Bieging *et al.*, 2014 ; Leslie & Downes, 2004 ; Markman *et al.*, 2010). Ces tumeurs sont dites de phénotype microsatellite stable (MSS), par opposition aux tumeurs de la voie alternative qui sont dites de phénotype MSI car elles présentent une instabilité des microsatellites dans la majorité des cas comme précisé ci-dessous.

### II.3.B) Altérations génétiques des tumeurs sporadiques de phénotype MSI

La voie d'initiation tumorale par des polypes festonnés a été décrite plus récemment (Jass *et al.*, 2000 and 2001). La progression tumorale dans le cadre de cette voie est plus rapide que dans la voie traditionnelle adénome-adénocarcinome (Lazarus *et al.*, 2005 ; Goldstein 2006 ; Oono *et al.*, 2009). Les polypes festonnés forment un groupe hétérogène de lésions muqueuses incluant plus particulièrement des polypes/adénomes sessiles festonnés caractérisés par la mutation du gène *BRAF*, une morphologie particulière et de mauvais pronostic (Harvey *et al.*, 2007). Les altérations génétiques précoces des tumeurs festonnées sont les mutations *BRAF* et *KRAS* (Beach *et al.*, 2005), une hyper-méthylation des îlots CpG (*CIMP*) de la séquence promotrice des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) dont le gène *MLH1* responsable de l'instabilité microsatellitaire observée dans ce type de tumeur. Cette instabilité des locus microsatellites est à l'origine d'un infiltrat immunitaire plus dense que dans les tumeurs de la voie CIN de phénotype MSS.

En résumé, les **CCR sont classés en deux sous-groupes** sur la base du statut (stable ou instable) des locus microsatellites : **les tumeurs de phénotype MSI** (microsatellite instable), qui représentent environ 15% des CCR (MSI) et sont associées à une forte charge mutationnelle (>12 mutations per 10<sup>6</sup> DNA bases) ; **les tumeurs de phénotype MSS** (microsatellite stable) qui représentent environ 85% des CCR et sont associées à une faible charge mutationnelle (<8.24 mutations per 10<sup>6</sup> DNA bases) (Cancer Genome Atlas Network 2012). Dans la suite de ce manuscrit, les CCR seront donc distingués selon leur statut microsatellitaire (MSS/MSI).

#### II.4 Classification moléculaire

L'observation de l'ensemble de ces altérations génétiques dans les CCR, couplé à des analyses du profil d'expression transcriptomique, a récemment conduit à la classification moléculaire consensuelle CMS (*Consensus Molecular Subtypes*) qui distingue 4 types moléculaires englobant 80% des CCR (Guinney *et al.*, 2015). Cette classification CMS (CMS 1 à 4) a une valeur pronostique et probablement prédictive d'efficacité des nouvelles thérapies. Elle est relativement corrélée à la localisation tumorale gauche ou droite de la tumeur. Cette classification CMS souligne l'hétérogénéité des CCR (Marisa *et al.*, 2013 ; Guinney *et al.*, 2015, Muller *et al.*, 2016).

- **CMS1** : 14% des CCR, caractérisés par une forte expression des gènes de l'immunité, et de phénotype MSI «immune». Ces CCR sont plutôt de bon pronostic dans les phases précoces de la maladie (sans métastase).
- **CMS2** : 37% des CCR, caractérisés par des mutations somatiques fréquentes, une surexpression des voies EGFR et Wnt, et de phénotype MSS. Ces CCR sont dits «canoniques» car leurs caractéristiques sont semblables à celles de la voie classique adénome-adénocarcinome décrite plus haut.
- **CMS3** : 13% des CCR, caractérisés par des mutations *KRAS* fréquentes, peu de mutations somatiques et de phénotype majoritairement MSS. Ces CCR présentent fréquemment une dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme (tumeurs dites «métaboliques»).
- **CMS4** : 23% des CCR, caractérisés par de nombreuses mutations somatiques, une surexpression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse, une activation fréquente de l'angiogenèse et de la voie du TGF- $\beta$ , qui confèrent aux tumeurs

un avantage prolifératif, immunosuppresseur et métastatique (Blobe *et al.*, 2000). Ces tumeurs, dites «mésenchymateuses», sont de mauvais pronostic.

Une minorité de CCR (13%) représente un groupe de CCR «mixte» ou à la CMS indéterminée. Les classes CMS et leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Classification CMS et corrélations phénotypiques. Adapté de Guiney *et al.*, 2015

Classe CMS (%)	1 : “Immune” 14%	2 : Canonique 37%	3 : Métabolique 13%	4 : Mésenchymateux 23%
Altérations génétiques	Phénotype MSI, hyperméthylation des îlots CpG	Phénotype MSS, forte altération chromosomique	Phénotypes MSS/MSI mixtes, faible altération chromosomique et hypométhylation des îlots CpG	Phénotype MSS, forte altération chromosomique
Statut <i>KRAS/BRAF</i>	<i>BRAF</i> muté		<i>KRAS</i> muté	
Signature transcriptomique	Fort infiltrat immunitaire	Activation voie WNT et MYC	Forte dérégulation métabolique	Fort infiltrat fibroblastique, activation de la voie TGF- $\beta$ , angiogenèse
Pronostic / Survie	Bon pronostic en absence de métastase, mais mauvais pronostic quand métastase	Pronostic intermédiaire	Pronostic intermédiaire	Mauvais pronostic après rechute (ou quand métastase) et mauvaise survie globale

De plus, les caractéristiques moléculaires des CCR sont différentes en fonction de la latéralité colique (côlon droit versus côlon gauche et rectum) et celle-ci impacte à la fois le pronostic et la réponse aux biothérapies anti-EGFR et anti-VEGF comme suggéré par des données récentes issues d’essais cliniques de phase 3. Trente-cinq % des CCR sont localisés à droite et cette localisation est associée à un mauvais pronostic (Venook *et al.*, 2016 ; Loree *et al.*, 2018) (Figure 7).

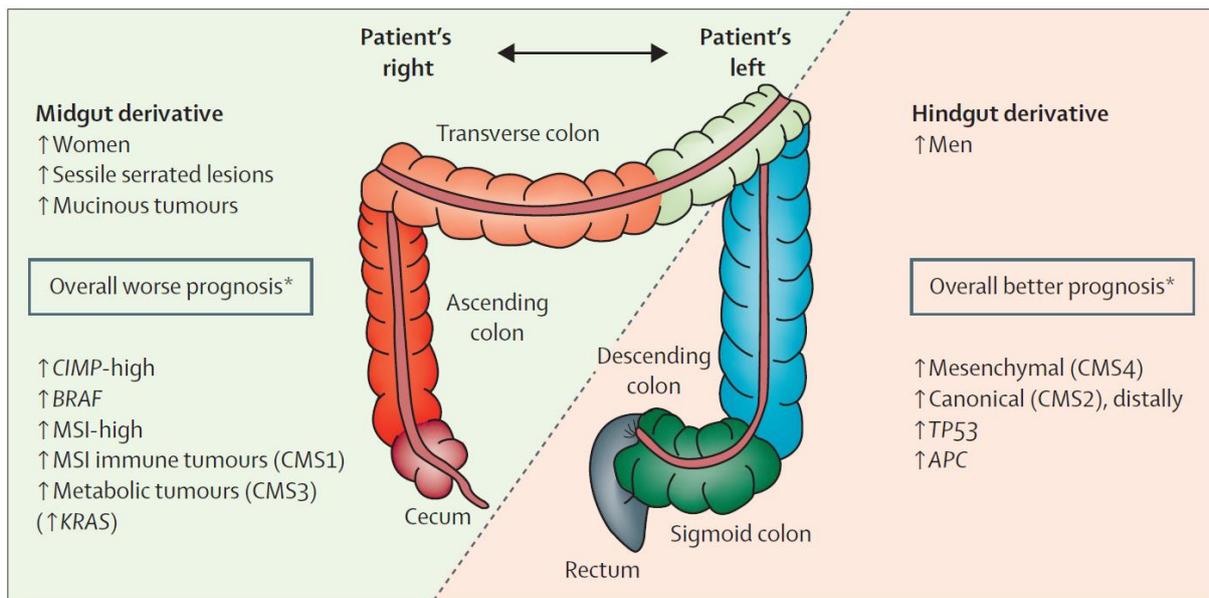


Figure 7. Schéma récapitulatif de l'hétérogénéité et du continuum des changements observés dans les CCR en fonction de la latéralité colique. D'après Derrek *et al.*, 2019

La détermination de la classification CMS est difficilement réalisable en routine clinique, car elle nécessite la mise en place de techniques coûteuses de biologie moléculaire à haut débit suivies d'analyses bio-informatiques complexes. Cependant, cette classification devrait permettre d'établir des signatures prédictives de l'efficacité de thérapies conventionnelles et ciblées dans des cohortes multicentriques de patients atteints de CCR. En revanche, la classification histo-pronostique des CCR, couplée à la détermination du statut microsatellitaire (MSS/MSI) et mutationnel (*KRAS/BRAF*) sont la base de la prise en charge thérapeutique des patients. Ces deux aspects, classification histo-pronostique et prise en charge thérapeutique des CCR, sont développés ci-dessous.

## II.5 Classification anatomopathologique des CCR

### II.5.A) Sous-types histologiques

La classification anatomopathologique des CCR repose sur la classification de l'OMS 2019 (5<sup>ème</sup> édition). La grande majorité des CCR (80 à 90%) sont des adénocarcinomes sans autre spécificité (NOS) qui sont de structure cryptique, classés en fonction du degré de ressemblance avec la muqueuse colique normale. Ainsi, un adénocarcinome NOS peut-être dit : bien différencié (35% des CCR), moyennement différencié (60% des CCR) et peu différencié (15% des CCR) (Figure 8A-C). Environ 10% à 20% des CCR sont des adénocarcinomes mucineux ou colloïdes, où plus de 50% de la tumeur est constituée de larges flaques de mucus (Figure 8E). Les autres sous-types histologiques plus rares de CCR sont : le carcinome médullaire

(Figure 8D), le carcinome indifférencié, le carcinome à cellules indépendantes dites en bague à chaton (Figure 8F) et le carcinome mixte (Symonds & Vickery, 1976 ; Marzouk & Schofield, 2011). Ces derniers sous-types histologiques ont la particularité d'être de phénotype MSI préférentiellement (Kakar & Smyrk, 2005 ; Lanza *et al.*, 1999).

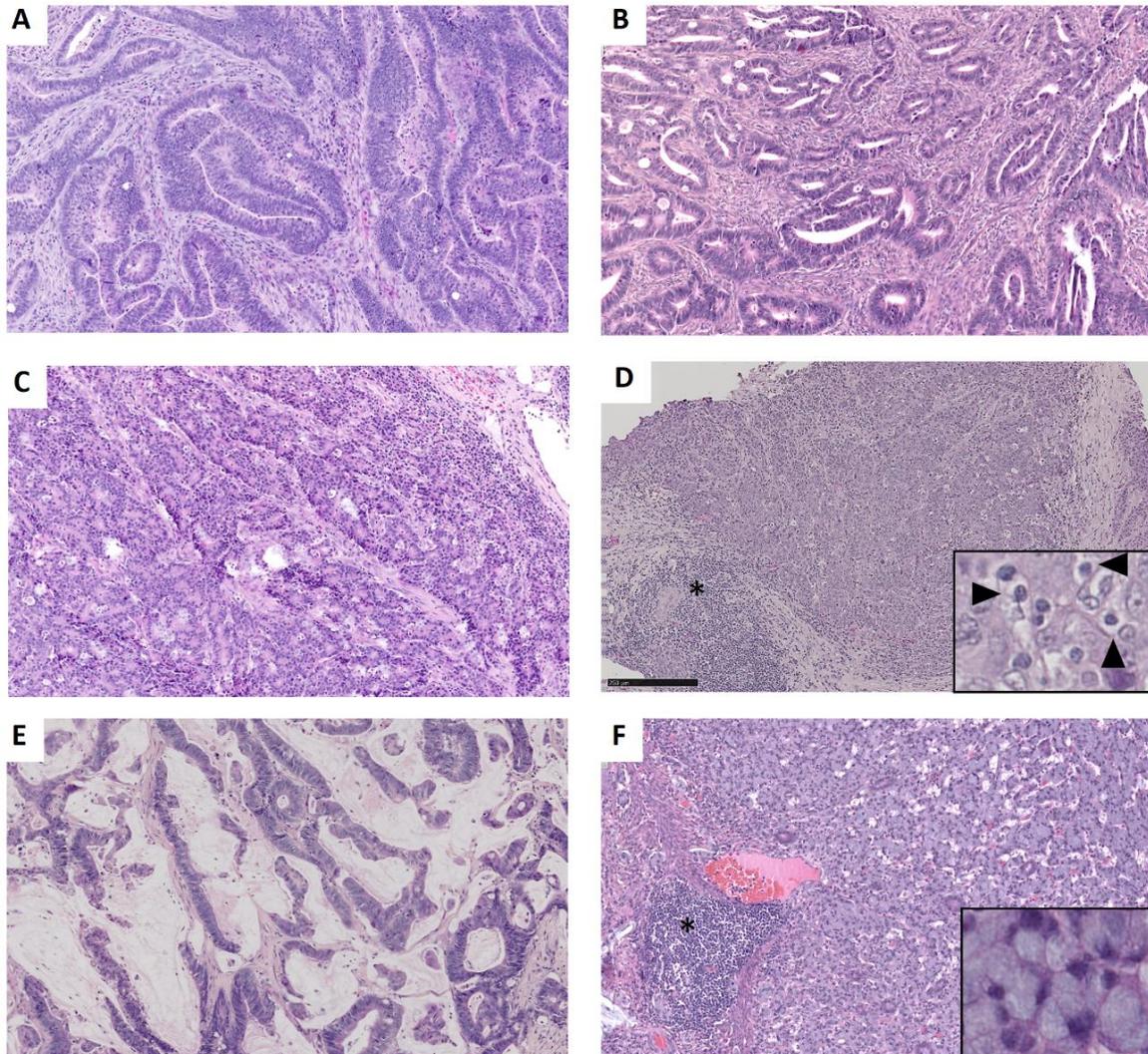


Figure 8. Principaux sous-types histologiques d'adénocarcinome (ADK) colique. Coloration standard Hématoxyline-éosine-safran (HES). A- ADK NOS bien différencié (MSS) ; B- ADK NOS moyennement différencié (MSS) ; C- ADK NOS peu différencié (MSI) ; D- ADK d'architecture médullaire (MSI) avec de nombreux TIL entre les cellules tumorales (IEL-TIL, pointes de flèches dans encart x400) ; E- ADK colloïde ou mucineux (MSS) ; F- carcinome à cellules indépendantes dit à cellules en bague à chaton. (encart x400). (barre : 250mm). \*: ilot lymphoïde au front d'invasion de la tumeur (D et F).

### II.5.B) Facteurs histopronostiques

Outre le sous-type histologique, les facteurs histo-pronostiques sont nécessaires à préciser par le pathologiste afin de guider la prise en charge thérapeutique. Il s'agit du grade de différenciation de la tumeur, de la présence ou non d'emboles vasculaires et d'engainements péri-nerveux, du stade pTNM («Pathological Tumor Node Metastasis»).

Ce stade pTNM selon la dernière classification UICC (8<sup>e</sup> édition) repose sur la profondeur d'infiltration de la tumeur dans la paroi colique (T), la présence de métastase ganglionnaire proche de la tumeur (N) et la présence de métastase extra-ganglionnaire (M). Cette classification permet un groupement des lésions en stades allant de O à IV qui sont détaillés ci-dessous et illustrés dans la figure 9.

**Stade 0** : l'adénocarcinome est dit *in situ* ou intra-épithélial (pTis), car la tumeur ne dépasse pas la *lamina propria* (pTis N0 M0).

**Stade I** : la tumeur dépasse la muqueuse et atteint les couches musculaires (muscleuse) de la paroi colique ou rectale (pT1-2 N0 M0).

**Stade II** : la tumeur atteint toutes les couches de la paroi colique, de la muqueuse à la séreuse, sans atteinte des ganglions mésentériques (pT3-T4 N0 M0).

**Stade III** : les ganglions mésentériques sont envahis par la tumeur (quel que soit le T).

**Stade IV** : métastases viscérale ou bien à distance de la tumeur, majoritairement dans le foie ou les poumons.

Actuellement, l'infiltrat lymphocytaire T, évalué grâce à l'immunoscore sur lequel nous reviendrons dans le chapitre III, est considéré comme un autre facteur histopronostique important à prendre en compte dans les CCR, selon la classification de l'OMS 5<sup>ème</sup> édition.

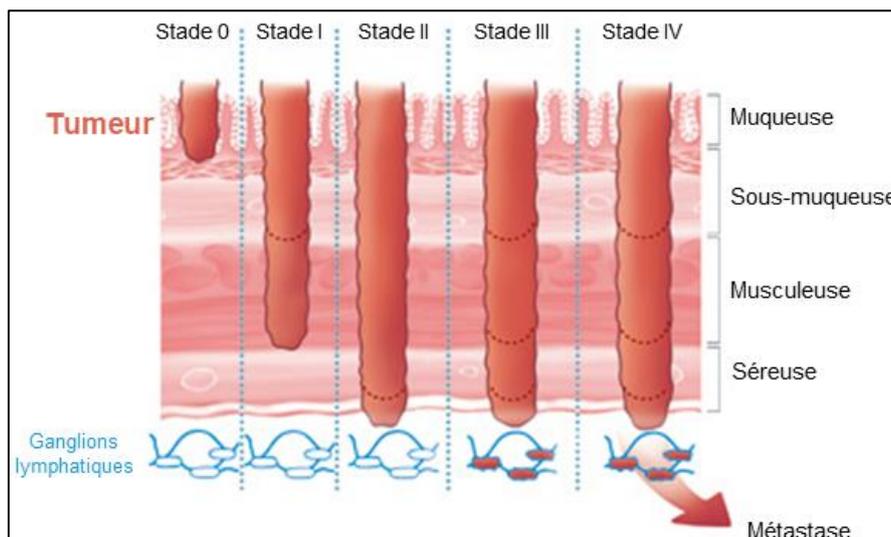


Figure 9. Représentation schématique des stades de CCR

## II.6 Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique d'un patient atteint de CCR est conditionnée par le stade pTNM de la maladie, les facteurs histopronostiques, le phénotype MSS ou MSI, le statut mutationnel des gènes *KRAS* et *BRAF* mais aussi par d'autres facteurs tels que l'âge, le statut de performance et les co-morbidités du patient. Selon les recommandations du thesaurus national de cancérologie digestive (TNCD), les CCR non métastatiques (stade 0-III) sont résectionnés endoscopiquement (cancers superficiels) ou chirurgicalement. Une chimiothérapie adjuvante est préconisée pour les stades II à haut risque et les stades III. Les stades IV métastatiques bénéficient, en plus d'une chimiothérapie, des thérapies ciblées anti-EGFR (en fonction du statut mutationnel *KRAS/BRAF*) et anti-VEGF. La figure 10 illustre les différentes thérapies, détaillées ci-dessous, en fonction du stade pTNM.

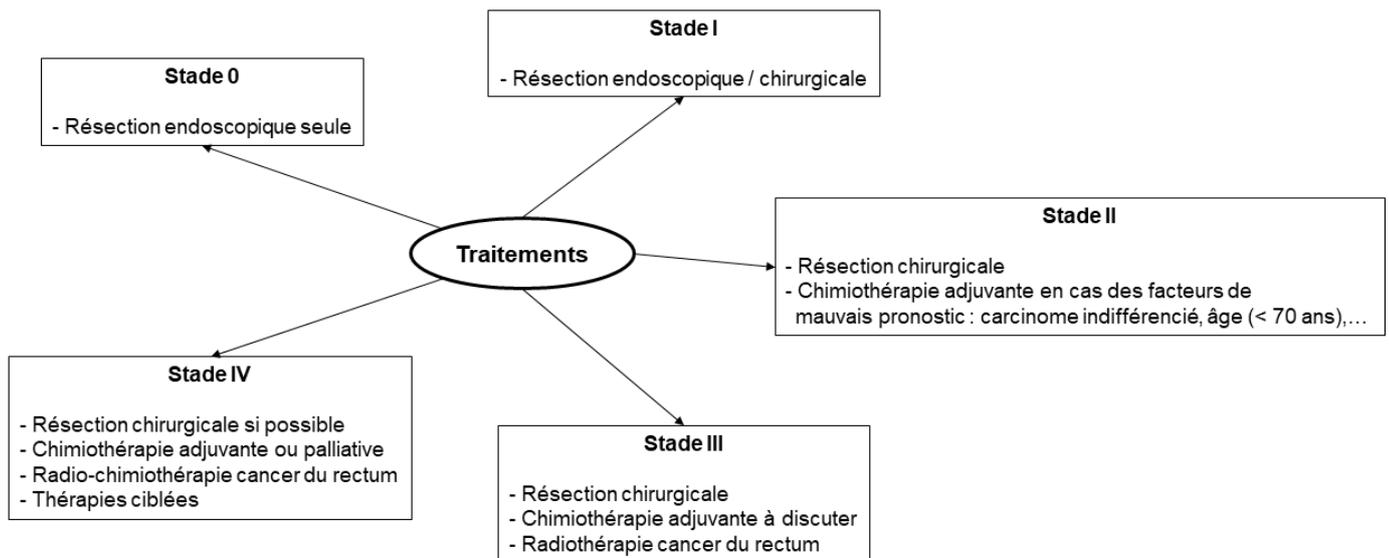


Figure 10. Représentation schématique des différentes thérapies proposées pour la prise en charge des CCR en fonction du stade pathologique. Adapté de Lecomte *et al.*, 2019

### II.6.A) La chirurgie

La résection chirurgicale de la tumeur primaire, en cas de tumeur résecable, est la pierre angulaire dans la prise en charge thérapeutique des CCR, thérapie curative quel que soit le stade de la maladie. La mortalité post-chirurgicale est inférieure à 1%, avec une morbidité inférieure à 5% (abcès, fistules). L'objectif de la chirurgie est d'obtenir une résection de la tumeur primitive, avec des marges de côlon sain, et des ganglions lymphatiques régionaux, aussi appelé curage ganglionnaire. Différents types de résection, conditionnés par la vascularisation et le drainage lymphatique, sont à distinguer en fonction de la localisation tumorale (Lecomte *et al.*, 2019) :

- Colectomie droite qui consiste à retirer (exérèse) la dernière anse iléale (intestin grêle) et le côlon droit puis à relier l'iléon au côlon transverse (anastomose iléo-colique ou iléo-transverse).
- Colectomie angulaire gauche : exérèse du côlon descendant avec anastomose colo-colique emportant l'artère colique supérieure gauche.
- Sigmoïdectomie : exérèse du côlon sigmoïde avec anastomose colorectale.
- Colectomie totale : ablation totale du côlon
- Amputation abdomino-périnéale si la tumeur localisée au niveau du rectum envahit le sphincter.

La récurrence après résection d'un cancer du côlon reste un problème majeur ; elle survient durant les 3 premières années qui suivent le traitement curatif dans environ 80 % des cas (Manfredi *et al.*, 2006). La récurrence peut être locale (colorectale) ou à distance (métastase hépatique ou pulmonaire). En cas de suspicion de CCR de stade IV, la prise en charge thérapeutique dépend de la localisation et du nombre de foyers de métastases. Celle-ci peut inclure une exérèse chirurgicale en monobloc combinée à des stratégies thérapeutiques adjuvantes utilisant de(s) molécule(s) administrée(s) après la chirurgie, afin de prévenir les récurrences (thérapies adjuvantes), ou avant la chirurgie, afin de réduire la taille de la tumeur et rendre possible sa résection chirurgicale (thérapies néo-adjuvantes).

### *II.6.B) La chimiothérapie et la radiothérapie*

Les molécules pharmacologiques les plus utilisées actuellement en France dans la prise en charge thérapeutique des CCR sont : le 5-Fluoro-uracile (5-FU), l'irinotécan, l'oxaliplatine ou l'association 5-FU / oxaliplatine (Folfox) (Dekker *et al.*, 2019 ; Lecomte *et al.*, 2019). Le 5-FU est un antimétabolite, analogue de la pyrimidine, dont les dérivés métaboliques sont toxiques pour les cellules en prolifération. L'incorporation du 5-FU dans les cellules tumorales induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I, enzyme qui génère des cassures simple brin transitoires afin de permettre la réplication de l'ADN. L'inhibition de la topoisomérase I induit l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules. L'oxaliplatine inhibe la réplication de l'ADN en induisant des liaisons covalentes entre 2 guanines (G) adjacentes d'un brin d'ADN. En tant que thérapie adjuvante, la chimiothérapie à base de fluoropyrimidine améliore la survie au stade III résecqué et dans un sous-groupe de CCR de stade II (par exemple, pT4 à haut risque, peu différencié).

La radiothérapie n'a pas d'indication dans le cancer du côlon du fait de la proximité du côlon avec d'autres organes, qui pourraient être endommagés après exposition aux radiations. De ce fait, la radiothérapie ne concerne que certains adénocarcinomes du moyen et/ou du bas rectum de stade III ou IV en thérapie néo-adjuvante où elle est mieux tolérée. Pour les cancers du rectum localement avancés, la radiothérapie peut être combinée à la chimiothérapie ; cette stratégie est connue pour réduire le risque de récurrence locale mais son effet sur la survie globale reste à démontrer (Ma *et al.*, 2017).

### *II.6.C) Les thérapies ciblées*

Les thérapies ciblées sont administrées en combinaison avec les molécules de chimiothérapie dans les CCR métastatiques (Bennouna *et al.*, 2017). Ces thérapies utilisent majoritairement des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement une protéine ou une voie de signalisation impliquée dans la tumorigenèse. Les anticorps monoclonaux les plus utilisés sont : le bévacizumab (avastin) anticorps dirigé contre le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) (Bennouna *et al.*, 2017), impliqué dans le mécanisme de néo-angiogenèse (Carmeliet 2005) ; le cétuximab dirigé contre l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique), impliqué dans la croissance tumorale (Singh & Coffey, 2014). D'autres thérapies ciblées, utilisant des inhibiteurs de kinases tels que le régorafénib, sont préconisées dans les CCR métastatiques réfractaires à la chimiothérapie adjuvante ou palliative (Lecomte *et al.*, 2019).

En plus du ciblage thérapeutique des cellules tumorales, de nouvelles thérapies dirigées contre d'autres composants du microenvironnement tumoral, en particulier la modulation du système immunitaire pour combattre les cellules cancéreuses, appelée immunothérapie, s'est récemment révélée très prometteuse. Le prochain chapitre présente le microenvironnement tumoral dans les CCR, plus particulièrement sa composante immunitaire et les mécanismes d'immunogénicité de la tumeur. Nous reviendrons sur l'immunothérapie dans les CCR plus en détail dans le chapitre III.3.

### III. Le microenvironnement tumoral dans les cancers colorectaux

Le cancer a été considéré pendant longtemps comme une collection de cellules cancéreuses relativement homogènes. Il est désormais considéré comme un tissu complexe composé d'une matrice extracellulaire et de plusieurs types cellulaires distincts, présents dans le stroma de la tumeur, avec lequel les cellules tumorales établissent ce qu'on appelle le microenvironnement tumoral (MET) (Hanahan & Weinberg, 2011). Le MET est un partenaire à part entière du développement ou de la régression tumorale qui exerce un impact important sur la maladie. En effet, l'évolution de nombreuses tumeurs solides, y compris le CCR, est influencée par des **interactions complexes et dynamiques entre la tumeur et son microenvironnement**, qui comprend de nombreux facteurs spécifiques aux tissus, différentes cellules non malignes et des anomalies génétiques de la tumeur (Bissell & Radisky, 2001). Les différents types cellulaires du MET qui contribuent de manière significative à la biologie de la tumeur sont mentionnés dans la figure 11 et leurs fonctions pro ou anti-tumorales dans les CCR sont résumées dans le tableau 2.

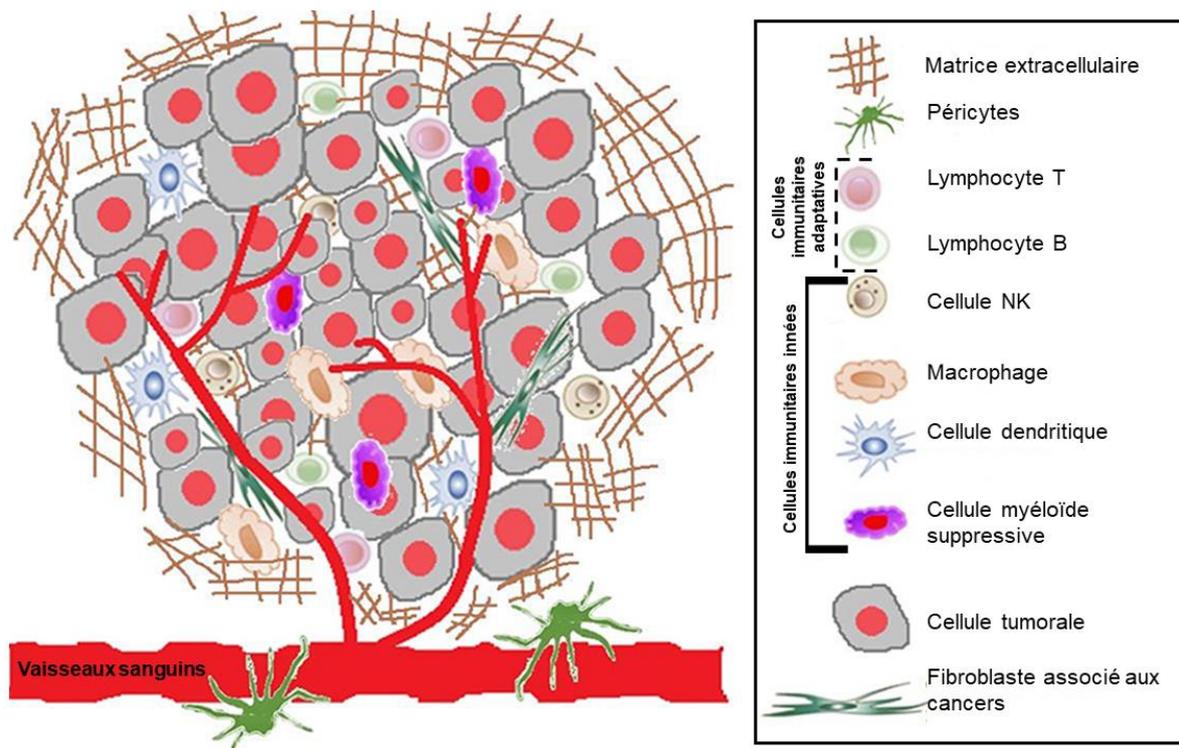


Figure 11. Schéma général de la composition du microenvironnement tumoral. *Adapté de Fernandes et al., 2018*

Tableau 2. Rôle des différents types cellulaires du MET dans les CCR

Types cellulaires	Sous-types cellulaires	Rôle dans les CCR (références bibliographiques)
 <b>Lymphocyte T</b>	<b>T cytotoxique (Tc)</b>	Anti-tumoral. Facteur de bon pronostic pour la survie des patients car stimule la présentation antigénique et induit la mort des cellules tumorales <sup>1-3</sup>
	<b>T auxiliaire de type 1 (Th1)</b>	
	<b>Th2</b>	Pro-tumoral. Les cytokines sécrétées dans le MET n'impacte pas la survie des patients <sup>4</sup>
	<b>Th17</b>	Pro-tumoral. Facteur de mauvais pronostic <sup>3</sup>
	<b>T régulateur (Treg)</b>	Suppriment les réponses Th1 et Tc1. La présence de Treg est associée à un meilleur pronostic dans le CRC, mais facteur de mauvais pronostic dans d'autres types de tumeurs <sup>5-7</sup>
 <b>Lymphocyte B</b>	La forme mature est nommée <b>plasmocyte</b>	Anti-tumoral. Correlation avec une évolution clinique positive dans les CCR; facteur de bon pronostic <sup>8</sup>
 <b>Cellule NK</b>		Anti-tumoral. Facteur de bon pronostic, associé à une meilleure survie des patients, mais présente une capacité limitée d'infiltration du MET (peu de NK) dans les CCR <sup>9-10</sup> .
 <b>Macrophage</b>	<b>Macrophage de type 1 (M1)</b>	Anti-tumoral. Favorise l'inflammation tout en induisant la mort des cellules tumorales <sup>11</sup>
	<b>Macrophage de type 2 (M2)</b>	Pro-tumoral. Favorise l'immunosuppression, l'angiogenèse. Facteur de mauvais pronostic <sup>12</sup>
 <b>Cellule dendritique (DC)</b>	<b>DC plasmacytoïde (pDC)</b>	Rôle pro- ou anti-tumoral très controversé, en fonction des signaux du MET. Favorisent la présentation antigénique et l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale <sup>13-14</sup> ou inhibent l'activation des lymphocytes T Th1/Tc1 et favorisent la progression tumorale <sup>15</sup>
	<b>DC conventionnel (cDC)</b>	
 <b>Cellule myéloïde Suppressive (MDSC)</b>		Pro-tumoral. Augmente l'expression des facteurs immunosuppresseurs. Un fort infiltrat en MDSC activées corrèle avec des stades TNM très avancés des CCR <sup>16</sup>
 <b>Fibroblaste associé aux cancers (CAF)</b>		Pro-tumoral. Facteur de mauvais pronostic. Favorise la migration cellulaire. Considéré comme un marqueur prédictif de la récurrence des CCR appartenant à la CMS4 <sup>17</sup>
 <b>Cellule endothéliale Péricytes</b>		Pro-tumoral : une forte vascularisation au front d'invasion dans les CCR est directement associée à la présence de métastases, à la récurrence et à la mortalité des patients <sup>18-19</sup>

1-Calon et al.,2015 ; 2-Zhu et al.,2010 ; 3-Tosolini et al.,2011 ; 4-Housseau et al.,2016 ; 5-Salama et al.,2009 6-Frey et al.,2010 ; 7-Fridman et al., 2017 ; 8-Berntsson et al.,2016 ; 9-Sandel et al.,2005 (a) ; 10-Sconocchia et al.,2014 ; 11-Chanmee et al.,2014 ; 12-Martinez et al.,2014 ; 13-Nagorsen et al.,2007 ; 14-Dadabayev et al.,2005 ; 15-Sandel et al.,2005(b) ; 16-Vasquez-Dunddel et al.,2013 ; 17-Karagiannis et al.,2012 ; 18-Raza et al.,2010 ; 19-Mezheyski et al., 2016

Dans le CCR, l'équipe de Jérôme Galon a démontré qu'un fort infiltrat en LT mémoires (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) et cytotoxiques (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) est de bon pronostic car associé à une survie globale prolongée des patients (Pagès et al., 2005 ; Galon et al., 2006 ; Ogino *et al.*, 2009 ; Fridman et al., 2012). De ces différentes observations est né le concept de l'«**immunoscore**» qui permet d'évaluer la composante immunitaire du MET et de déterminer la densité de ces deux populations lymphocytaires dans la tumeur et à son front d'invasion. La valeur pronostique de l'immunoscore et d'une signature Th1/Tc1 a été démontrée dans les CCR (Galon *et al.*, 2006 ; Tosolini *et al.*, 2011), celle-ci étant considérée comme supérieure à la classification TNM (Mlecnik *et al.*, 2011). De manière intéressante, un fort immunoscore a été mis en évidence, non seulement dans les CCR MSI mais aussi dans un sous-groupe de CCR MSS (Mlecnik *et al.*, 2016). De plus, un nombre élevé de mutations dans les cellules tumorales corrèle avec une forte infiltration immunitaire, indiquant qu'une forte immunogénicité pourrait induire une meilleure réponse immunitaire dans les CCR (Mlecnik *et al.*, 2016 ; Giannakis *et al.*, 2016) et aussi dans le cancer du poumon (Rosenthal *et al.*, 2019). La valeur pronostique de l'immunoscore a été confirmée dans d'autres tumeurs solides telles que le mélanome, le cancer du poumon et de la prostate (Angell *et al.*, 2020). De plus, l'immunoscore est actuellement envisagé comme un test prédictif de la récurrence tumorale (y compris dans les CCR de stade II), ce qui permettrait de stratifier les patients et d'identifier ceux qui seraient susceptibles de bénéficier de traitements adjuvants (Pagès *et al.*, 2018).

A présent, intéressons-nous aux relations entre le MET immunitaire et les cellules tumorales.

Les relations entre les cellules tumorales et la composante immunitaire du MET ont été initialement décrites par Paul Ehrlich en 1909. Il proposait le postulat suivant : *“sans l'effet protecteur du système immunitaire, le cancer serait assez fréquent dans les organismes à longue durée de vie”*. Ce postulat a été repris par Thomas L. & Burnet F. en 1959 proposant l'hypothèse de l'immunosurveillance tumorale selon laquelle : *“une cellule normale acquérant des mutations oncogènes peut être éliminée par le système immunitaire qui fonctionne comme une barrière initiale majeure à la progression de la tumeur”*. En ce temps-là, l'hypothèse de l'immunosurveillance a été soutenue par une meilleure compréhension du système immunitaire combinée à la démonstration de l'existence d'antigènes tumoraux. Cependant, les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire sont beaucoup plus complexes qu'on ne le pensait. A ce jour, il est clairement établi que le système immunitaire exerce des effets contradictoires sur le développement tumoral dans plusieurs tumeurs solides dont les CCR

(Ferrone *et al.*, 2010) : d'une part, un effet anti-tumoral grâce notamment à l'activation de certains sous-types cellulaires tels que les LT de type Th1/Tc1 (Tableau 2) ; d'autre part, un effet pro-tumoral où l'inflammation chronique crée un MET favorable à la croissance et à l'invasion tumorale. Ainsi, la théorie de l'immunosurveillance a laissé place à celle de l'immunoédition qui met l'accent sur la double action du système immunitaire dans le développement tumoral, théorie majoritairement étudiée dans des modèles murins (Dunn *et al.*, 2002). Dans les CCR chez l'homme, l'immunoédition est confirmée par l'observation de l'association entre la progression de la maladie (stade pTNM) et le changement dans la composition de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur où certains types cellulaires créent un MET immunosuppresseur (Galon *et al.*, 2006) (Figure 12).

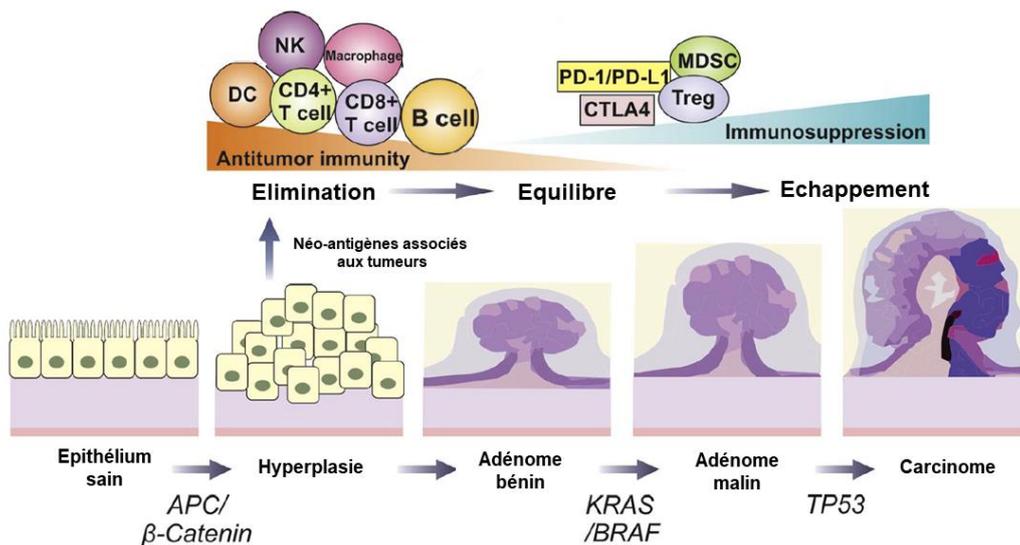


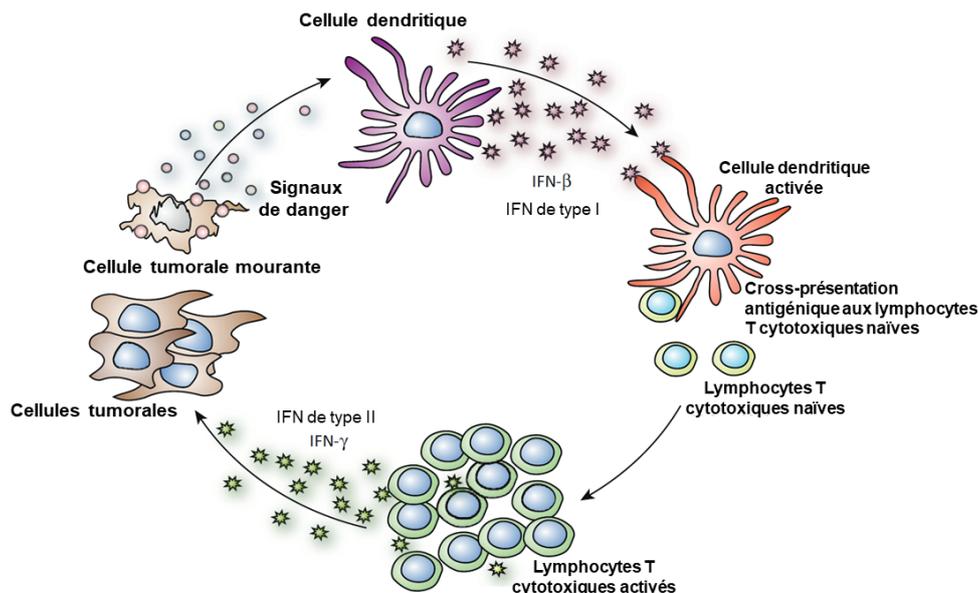
Figure 12. L'immunoédition au cours de la carcinogénèse classique dans les CCR. *Adapté de Fletcher et al., 2018*

### III.1 L'immunoédition

L'immunoédition définit les relations entre les cellules tumorales et le système immunitaire selon 3 phases détaillées ci-dessous et schématisées dans la figure 12 dont : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Dunn *et al.*, 2002).

#### III.1.A) La phase d'élimination

L'élimination, phase la mieux décrite, est considérée comme une version actualisée de l'immunosurveillance du cancer. Au cours de cette phase, les systèmes immunitaires inné et adaptatif travaillent ensemble pour détecter la présence d'une tumeur naissante afin de la détruire avant qu'elle ne devienne cliniquement apparente. Les mécanismes qui alertent le système immunitaire d'un développement tumoral ne sont pas complètement élucidés (Schreiber 2011). Un des mécanismes décrits consiste en un relargage des signaux de danger (HMGB1, ...) par les cellules tumorales mourantes qui vont être captés par les cellules dendritiques (DC) résidentes du tissu. A leur tour, les DC sécrètent des interférons de type I (IFN I) dont l'IFN- $\beta$  qui activent les DC et stimulent la cross-présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative (Fuertes *et al.*, 2013) (Figure 13). Ce mécanisme fait actuellement l'objet d'un essai clinique pour tester l'efficacité d'une stimulation de la production d'IFN I en combinaison avec des immunothérapies actuelles (anti-PD1) dans des plusieurs tumeurs solides et dans les lymphomes non hodgkiniens (Sivick *et al.*, 2018 ; Wilson *et al.*, 2018 ; Gogoi *et al.*, 2020).



TRENDS in Immunology

Figure 13. Hypothèse de la modulation des interférons de type I à la réponse spontanée des LT contre les tumeurs *in vivo*. Adapté de Fuertes *et al.*, 2013

Comme toute réponse immunitaire adaptative, la réponse anti-tumorale adaptative nécessite pour son déclenchement, une cellule présentatrice d'antigène, le plus souvent une cellule dendritique (Figure 13), présentant des antigènes tumoraux. Le processus de transformation tumorale produit des antigènes qui peuvent être reconnus par le système immunitaire. Il existe deux types d'antigènes tumoraux : les auto-antigènes partagés par les cellules tumorales et les cellules normales, mais surexprimés ou anormalement modifiés (modification post-traductionnelle) dans les cellules tumorales, et les néo-antigènes mutés qui sont uniques à chaque tumeur (Schumacher & Schreiber, 2015). De récentes études de séquençage d'exome du génome entier ont identifié une pléthore de mutations dans les tumeurs, dont certaines sont censées coder des néo-antigènes. Cependant, la plupart de ces mutations doivent encore être confirmées comme cibles potentielles d'une immunité spontanée et d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Finn 2017).

### *III.1.B) La phase d'équilibre*

La deuxième phase de l'immunoédition, la phase d'équilibre, correspond à un état dans lequel le système immunitaire empêche la croissance tumorale. Les cellules tumorales résiduelles, ayant échappé à l'immunosurveillance, sont maintenues par le système immunitaire dans un état fonctionnel de dormance, un terme utilisé pour décrire les cellules tumorales latentes qui peuvent résider chez les patients pendant des décennies. Il semble que la phase d'équilibre soit à l'origine de la longue période de latence observée depuis l'événement de la transformation tumorale jusqu'à la phase d'échappement. La phase d'équilibre s'accompagne d'une sélection des cellules tumorales non immunogènes qui ont acquis des mutations leur permettant d'échapper à la surveillance immunitaire, mécanisme aussi appelé "*immunosélection*". De telles mutations se traduisent par : 1) des modifications transcriptomiques associées à une faible expression des néo-antigènes ; 2) la méthylation de la machinerie de présentation antigénique et 3) des délétions chromosomiques des zones codant pour les néo-antigènes comme le suggère l'étude TRACERX dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (Rosenthal *et al.*, 2019).

### III.1.C) La phase d'échappement

Cette phase se caractérise essentiellement par la capacité des cellules tumorales à développer des moyens pour contrôler la réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules tumorales sont capables d'échapper à l'immunosurveillance par l'immunosélection ou par l'immunosubversion. L'immunosubversion désigne l'ensemble des mécanismes de suppression de la réponse immunitaire capables d'induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Les différents mécanismes de l'immunosubversion dans les cancers colorectaux sont présentés ci-dessous.

### III.2 L'immunosubversion

Dans le MET des CCR, divers mécanismes conduisent à la suppression de la réponse immunitaire anti-tumorale. En plus des mécanismes conduisant à l'échappement tumoral cités ci-dessus, on peut également inclure : 1) le recrutement de cellules immuno-régulatrices telles que les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), les LT de phénotype régulateur (Treg), les macrophages de type 2 et d'autres types cellulaires (voir le tableau 2 et la figure 12) ; 2) l'altération des voies métaboliques et 3) la surexpression des points de contrôle immunitaire. Ces différents mécanismes sont présentés succinctement ci-dessous.

#### III.2.A) Le recrutement de cellules immuno-régulatrices

- **MDSC** : résultantes de l'exposition de précurseurs myéloïdes immatures à des signaux inflammatoires chroniques, comme ceux présents dans le MET (Veglia *et al.*, 2018), elles présentent une forte capacité à réprimer la réponse immunitaire à travers la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires tels que la prostaglandine E2, l'arginase et les cytokines anti-inflammatoires (Huang *et al.*, 2006 ; Veglia *et al.*, 2018) (Figure 14). Dans le CCR, leur présence dans le sang périphérique et dans les tissus tumoraux est associée à des stades très avancés de la maladie (Zhang *et al.*, 2013). De plus, chez les patients atteints de CCR métastatique, un taux élevé de MDSC circulantes prédit la rechute à la chimiothérapie et une faible survie sans progression (Tada *et al.*, 2016).
- **Treg** : l'accumulation des Tregs dans le MET des CCR est considérée comme une conséquence physiologique de l'établissement d'une réponse inflammatoire anti-tumorale de type Th1/Tc1 permettant d'atténuer et/ou de supprimer l'inflammation Th1/Tc1

(IJsselsteijn et al., 2019). L'impact pronostique des Treg dans l'évolution des CCR est très controversé. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de deux sous-populations de LT aux fonctions opposées exprimant, à différents niveaux, le facteur de transcription FOXP3 crucial pour le développement des fonctions inhibitrices des Tregs (Ono *et al.*, 2007). En effet, l'activité immunosuppressive des Tregs classiques présentant une forte expression de FOXP3 est contrebalancée par les propriétés pro-inflammatoires des LT exprimant faiblement FOXP3 dans les CCR (Saito *et al.*, 2016). Ces deux sous-populations (FOXP3 *High versus low*) ne peuvent pas être clairement distinguées en immunohistochimie, technique couramment utilisée sur des cohortes rétrospectives de CCR, ce qui serait à l'origine de la controverse sur l'impact pronostique positif des Tregs dans l'évolution de la maladie.

### *III.2.B) L'altération des voies métaboliques*

L'altération de différentes voies métaboliques est actuellement considérée comme une caractéristique des cancers (Hanahan & Weinberg, 2011), comme par exemple, la dérégulation du métabolisme énergétique qui a été observée pour la première fois dans les années 1930, par O.H Warburg dont le mécanisme porte aujourd'hui le nom. L'effet Warburg met en évidence, dans les cellules tumorales, la dégradation du glucose en pyruvate puis sa fermentation en acide lactique, quel que soit le taux d'oxygène du milieu, afin de satisfaire la demande en dérivés glycosylés nécessaires à la prolifération cellulaire rapide (Vander Heiden *et al.*, 2009). La libération du lactate dans le MET contribue à son acidification et le rend hostile au bon fonctionnement des cellules immunitaires (Fischer *et al.*, 2007). En effet, l'activité métabolique des cellules tumorales peut moduler la composante immunitaire du MET en créant un environnement compétitif pour accéder aux nutriments clés, à l'exemple du glucose, ou en produisant des intermédiaires métaboliques nocifs à l'activation et au bon fonctionnement des cellules immunitaires (Biswas 2015). En conséquence, les cellules immunitaires dysfonctionnelles ne parviennent pas à éradiquer les cellules cancéreuses et peuvent tolérer la croissance tumorale et parfois faciliter le processus métastatique (Guo *et al.*, 2019). L'ensemble de ces différents mécanismes est représenté dans la figure 14.

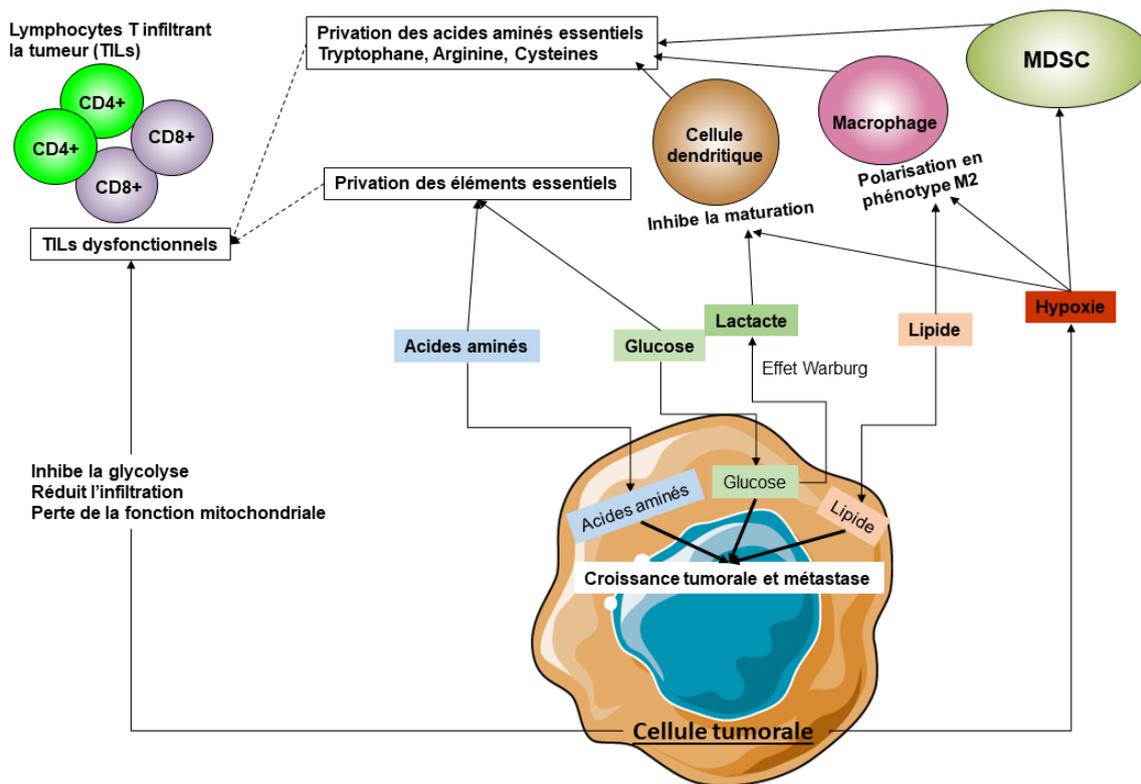


Figure 14. Dérégulation métabolique des cellules tumorales conduisant à l'immunosubversion. Adapté de Guo *et al.*, 2019

### III.2.C) La surexpression des points de contrôle immunitaires

L'activation du système immunitaire est finement régulée par des signaux positifs et négatifs (Olive 2006). Les points de contrôle immunitaire sont des **récepteurs inhibiteurs** («*immune checkpoints*» ou **ICP**) qui préviennent, diminuent ou empêchent l'activation et les fonctions effectrices des cellules de l'immunité adaptative et/ou innée (Chen 2004 ; Gordon *et al.*, 2017). La fixation des ICP à leurs ligands a pour objectif d'empêcher une réponse immunitaire excessive pouvant être délétère pour les tissus (Sharpe *et al.*, 2007). Ainsi, les ICP préviennent l'auto-immunité et sont impliqués dans le contrôle de la tolérance (Sharpe *et al.*, 2007). Une surexpression des ICP caractérise un état d'épuisement des cellules immunitaires, observée pour la première fois au cours d'une infection virale chronique chez la souris, cet état d'épuisement des cellules immunitaires étant également observé dans les cancers chez l'homme (Gallimore *et al.*, 1998 ; Zajac *et al.*, 1998 ; Wherry *et al.*, 2015). En effet, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, plus particulièrement les LT (*tumor infiltrating lymphocytes en anglais, "TILs"*), expriment fortement les ICP du fait de la persistance antigénique de la tumeur. A leur tour, les cellules tumorales de différents types de tumeur, incluant le CCR,

surexpriment les ligands des ICP (Keir *et al.*, 2008). Les ICP les plus étudiés dans les tumeurs solides sont CTLA-4, PD1, TIM3, LAG3 et TIGIT. Leur expressions, ligands et fonctions sont précisés ci-dessous et schématisés dans la figure 15.

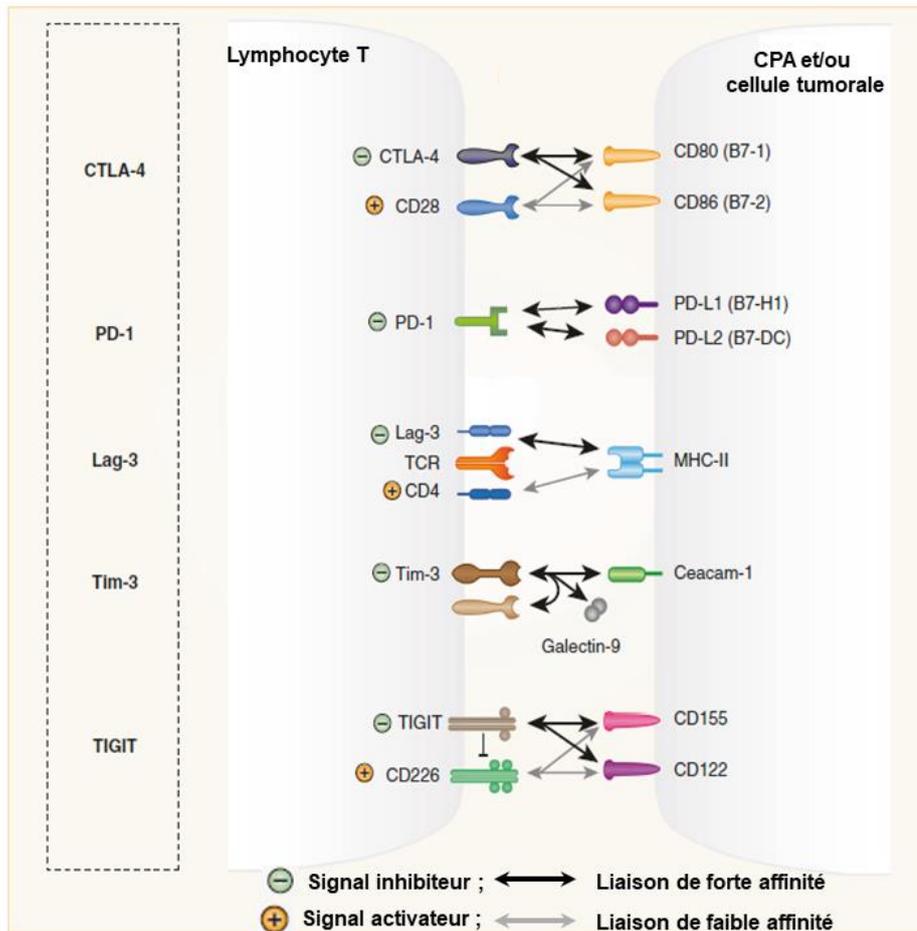


Figure 15. Principaux ICP et leurs ligands. Adapté de Joosse *et al.*, 2019 (CPA : cellule présentatrice d'antigènes)

- **CTLA-4** (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*, aussi appelé CD152) : est un récepteur membranaire de la superfamille des immunoglobulines (Ig) qui présente une homologie structurale avec le CD28 connu comme un signal co-activateur des LT (Brunet *et al.*, 1987). Comme le CD28, CTLA-4 se lie également aux CD80 et CD86 qui sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (Carreno & Collins, 2002). Le CTLA-4 est exprimé par les cellules dendritiques, les lymphocytes épuisés et activés dans les ganglions lymphatiques et/ou en périphérie (Brunet *et al.*, 1987 ; Perkins *et al.*, 1996). Contrairement au CD28, CTLA-4 subit une endocytose constitutive médiée par des vésicules de clathrine, de telle sorte qu'il soit rapidement internalisé après avoir atteint la surface de la cellule. CTLA-4 régule l'initiation de la

réponse immunitaire par compétition de fixation aux ligands avec le CD28 (Tivol *et al.*, 1995 ; Walunas *et al.*, 1996).

- **PD1** (*Programmed death 1*, aussi appelé CD279) : est un récepteur membranaire présentant un domaine extracellulaire «IgV-like» responsable de l'interaction du PD1 à ses ligands, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire responsable de la transduction des signaux comportant un motif inhibiteur ITIM et un motif ITSM (Ishida *et al.*, 1992). PD1 possède deux ligands naturels : PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC) mais ses fonctions inhibitrices ont été majoritairement attribuées à l'interaction avec PD-L1 car il est largement exprimé par les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques ; l'expression de PD-L2 étant restreinte aux cellules hématopoïétiques telles que les macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B (Dong *et al.*, 1999 ; Latchman *et al.*, 2001 ; Goldberg *et al.*, 2007). PD1 est rapidement exprimé après activation des cellules immunitaires dont les LT et LB, les cellules NK et d'autres cellules de l'immunité innée (Agata *et al.*, 1996 ; Yao *et al.*, 2009). Considéré comme un marqueur de l'activation (Simon & Labarriere 2017a), PD-1 joue un rôle majeur dans le maintien de la tolérance périphérique au sein des tissus (Fife *et al.*, 2018).
- **LAG3** (*Lymphocyte activation gene-3*, aussi appelé CD223) : récepteur co-inhibiteur membre de la superfamille des Ig. La structure de LAG3 ressemble à celle du CD4 et il se lie avec une forte affinité au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) (Triebel *et al.*, 1990 ; Huard *et al.*, 1995). LAG3 est exprimé à la surface des LT CD4+ et CD8+ activés ainsi que dans une sous-population de cellules NK (Bruniquel *et al.*, 1998). La liaison de LAG3 au CMH-II entraîne une diminution des réponses antigènes-spécifiques médiées par les LT CD4+ (Huard *et al.*, 1996). Cependant, d'autres études montrent que LAG3 interfère dans la fonctionnalité des LT CD8+ suggérant l'existence d'autres ligands en plus du CMH-II (Hannier *et al.*, 1998 ; Anderson *et al.*, 2016).
- **TIM3** (*T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3*, aussi appelé Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2, HAVCR2) : membre de la superfamille des Ig, initialement identifié comme marqueur des LT CD4 et CD8 sécrétant l'IFN $\gamma$  (Monney *et al.*, 2002). TIM3 est exprimé par les cellules de l'immunité adaptative et innée (Chiba *et al.*, 2012). Il peut être membranaire et/ou soluble et possède plusieurs ligands incluant galectine-9 et Ceacam-1 (Zhu *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2016). TIM3 exerce des effets

autocrine ou paracrine, sa liaison à ses ligands induit une diminution des fonctions effectrices des cellules immunitaires incluant la baisse de la sécrétion de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et des fonctions cytotoxiques (Hastings *et al.*, 2009).

- **TIGIT** (*T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain*) : récepteur de la superfamille des Ig présentant un domaine inhibiteur ITIM cytoplasmique, il est exprimé par les LT dont les Tregs et par les cellules NK (Yu *et al.*, 2009). TIGIT se lie au CD155 et CD112 qui sont exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes et par des cellules non hématopoïétiques (Casado *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2009). Ces ligands se lient également à un récepteur stimulateur, le CD226 qui augmente les fonctions effectrices des LT activés (Bottino *et al.*, 2003), alors que le TIGIT inhibe ces fonctions en ciblant directement des molécules dans la signalisation du TCR (Lozano *et al.*, 2012).

Dans le cancer chez l'homme, plus particulièrement dans le mélanome, l'expression du CTLA-4 et de l'axe PD1/PDL1 sont très étudiées dans le microenvironnement de la tumeur (Taube *et al.*, 2012 and 2015). Cependant, dans les CCR, seules quelques données parcellaires montrent que certains ICP, principalement CTLA-4, PD1/PDL1 et LAG3 sont surexprimés dans les CCR de phénotype MSI (Llosa *et al.*, 2015 ; Kitsou *et al.*, 2020). Le profil d'expression des ICP, en relation avec la densité en TIL et le statut microsatellitaire, est encore mal connu dans les CCR.

En plus des ICP, il existe d'**autres marqueurs immunorégulateurs** capables d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale qui sont connus pour être surexprimés au sein du MET comme par exemple :

- 1) le **CD39** est actuellement considéré comme un médiateur de l'immunosuppression dans les cancers (Allard *et al.*, 2017). C'est une ectonucléotidase qui convertit l'ATP extracellulaire, connu pour induire une réponse inflammatoire (Junger 2011), en ADP puis en adénosine en association avec le CD73 (Schetinger *et al.*, 2007). L'adénosine est un puissant immunosuppresseur des cellules qui expriment les récepteurs A2 et A3 telles que les LT et les cellules NK (Gessi *et al.*, 2007). Le complexe CD39/CD73 est fortement exprimé par les cellules tumorales (Bastid *et al.*, 2015) et certaines cellules immunitaires dont une sous-population de Treg chez l'homme (Borsellino *et al.*, 2007 ; Mandapathil *et al.*, 2009). Par sa fonction, le complexe CD39/CD73 instaure un microenvironnement immunitaire suppresseur propice à la croissance tumorale.

- 2) l'hétérodimère inhibiteur **NKG2A/CD94** est un récepteur qui se lie à l'HLA-E, complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) non classique de type Ib (Kaiser *et al.*, 2008). Ce récepteur inhibiteur est surexprimé par les LT cytotoxiques dans les CCR (Eugène *et al.*, 2020). Son ligand, l'HLA-E est également surexprimé par les cellules tumorales dans les CCR MSI et constitue un marqueur de mauvais pronostic pour la survie dans les CCR (Levy *et al.*, 2008 ; Bossard *et al.*, 2012). La liaison entre l'hétérodimère NKG2A/CD94 à l'HLA-E participe à l'établissement d'un MET immunitaire suppresseur et contribue ainsi à l'échappement tumoral.
- 3) l'**IDO-1** (Indoleamine 2,3-dioxygénase) qui est une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane conduisant à la production de métabolites connus sous le nom de kynurénines. Des données montrent une surexpression de l'IDO-1 par les cellules tumorales en comparaison avec les cellules saines chez l'homme, dans différents types de tumeur, incluant les CCR (Théate *et al.*, 2015, Ott *et al.*, 2019). Les hypothèses actuelles sont que cette enzyme participe à l'immunosubversion par 2 mécanismes : 1) elle induit une privation du tryptophane, acide aminé essentiel à la mise en place des fonctions effectrices des LT ; 2) les métabolites résultants de la dégradation de cet acide aminé ont des effets immuno modulateurs sur les LT et peuvent contribuer à la différenciation des LT naïfs vers un phénotype Treg (Grohmann *et al.*, 2003 ; Pallotta *et al.*, 2011).

La meilleure compréhension du microenvironnement immunitaire dans le cancer a conduit au **ciblage des points de contrôle positif et négatif de l'immunité**. Cette approche, **l'immunothérapie**, apporte de nouvelles solutions thérapeutiques dans le traitement des tumeurs solides comme le mélanome et se révèle être une stratégie thérapeutique prometteuse mais perfectible dans certains sous-groupes de CCR comme décrit ci-dessous.

### III.3 Les stratégies d'immunothérapie dans les CCR

#### III.3.A) Généralités

Selon leur mode d'action sur la réponse immunitaire anti-cancéreuse, les immunothérapies sont dites "passive" lorsqu'elles consistent à injecter des cellules ou molécules qui ont une activité anti-tumorale intrinsèque, à l'exemple du transfert adoptif cellulaire qui est développé ci-dessous ; ou "active" lorsque les cellules ou molécules utilisées exercent leurs effets anti-tumoraux après engagement du système immunitaire de l'hôte, à l'exemple de l'inhibition des ICP ou de la vaccination anti-tumorale (Lesterhuis *et al.*, 2011). Certaines immunothérapies ciblent spécifiquement quelques antigènes tumoraux bien définis, alors que d'autres fonctionnent de manière relativement non spécifique et renforcent les réponses immunitaires anticancéreuses naturelles ou induites par la thérapie, dont la spécificité est inconnue et souvent large (vaccination cytokinique) (Galluzzi *et al.*, 2014).

Il existe différentes façons de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, la figure 16 récapitule ces différentes approches qui ciblent le système immunitaire inné ou adaptatif. Nous insisterons sur quelques-unes d'entre elles : 1) l'inhibition des ICP ; 2) la vaccination anti-tumorale ; 3) le transfert adoptif des LT spécifiques à certains antigènes. Ces 3 axes représentent une piste prometteuse de l'immunothérapie dans la prise en charge des CCR.

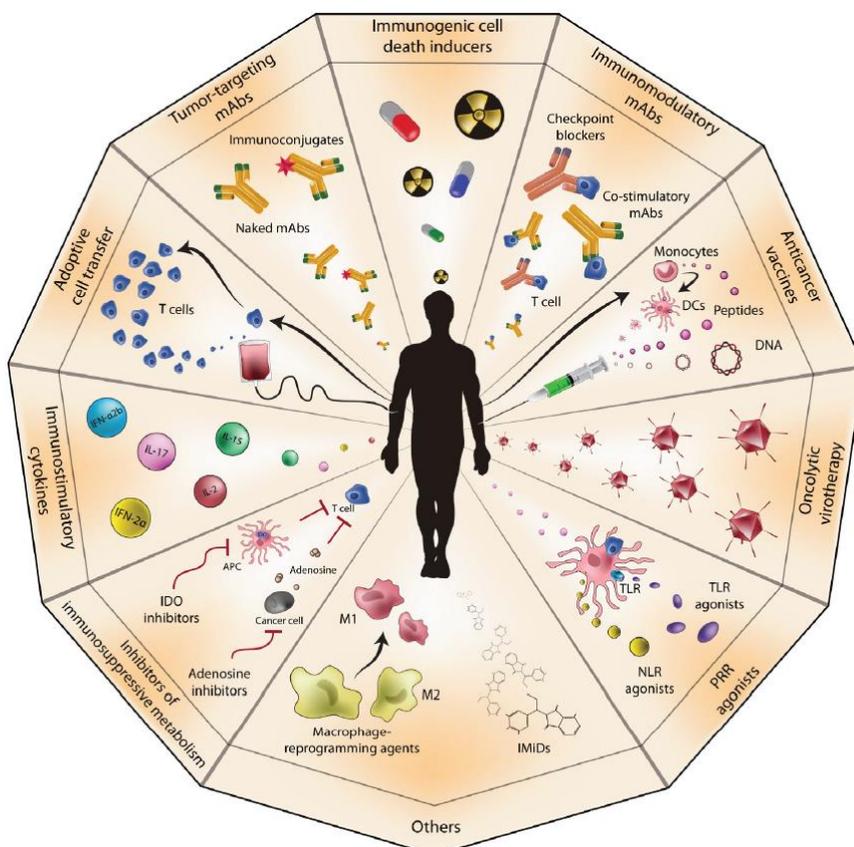


Figure 16. Les immunothérapies anticancéreuses. Tiré de Galluzzi *et al.*, 2014

### III.3.A) Inhibition des ICP

La preuve de l'efficacité des inhibiteurs d'ICP (anticorps monoclonaux) a été tout d'abord démontrée dans le traitement des mélanomes métastatiques réfractaires à la chimiothérapie (Hodi *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2015). Parmi les anticorps dirigés contre les ICP cités précédemment, seuls les anticorps dirigés contre CTLA-4, PD1 et PDL1 ont reçu une approbation par la FDA, l'équivalent de l'Agence Européenne du médicament aux Etats-Unis, pour le traitement de différents types de tumeur dont les CCR MSI. L'accès à cette thérapie en France est encore restreint car l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est attendue. Le tableau 3 récapitule les cancers qui ont reçu une approbation de la FDA ou une AMM dans la prise en charge thérapeutique.

L'immunothérapie induit un réel bénéfice clinique thérapeutique dans certaines tumeurs solides métastatiques, auparavant difficiles à traiter, telles que le mélanome et le cancer du poumon (Hodi *et al.*, 2010 ; Gettinger *et al.*, 2018). En France, l'immunothérapie n'est pas utilisée de façon systématique pour traiter le CCR, mais plusieurs études cliniques sont en cours pour tester son efficacité. Dans le CCR, l'immunothérapie est préconisée pour les 4 à 5% de tumeurs MSI associées à une forte charge mutationnelle, où un traitement par des anti-PD1 ou par la combinaison anti-PD1 et anti-CTLA4 apporte une réponse durable dans 30 et 70% des CCR MSI respectivement. Cependant, dans la grande majorité des CCR MSS, les immunothérapies ne sont pas efficaces (Le *et al.*, 2015 and 2017 ; Overman *et al.*, 2017 ; Coupez *et al.*, 2020). De plus, plusieurs essais cliniques visant à améliorer la réponse aux immunothérapies en combinaison avec des inhibiteurs de kinases, tels que le régorafénib, n'ont pas atteint leur principal critère d'efficacité (Eng *et al.*, 2019). Il semble que le faible recrutement des cellules immunitaires au sein de la tumeur soit un obstacle fondamental à l'efficacité des immunothérapies (Ganesh *et al.*, 2019).

Cible	Médicament	Autorisations FDA (USA)	Laboratoire
CTLA-4	Tremelimumab	Mésothéliome	Astra-Zeneca
	Ipilimumab (YERVOY®)	Mélanome en adjuvant et métastatique*	Bristol-Myers Squibb
PD-1	Nivolumab (OPDIVO®)	Colorectal MSI, carcinome hépatocellulaire, mélanome*, carcinome urothélial, cancer bronchique non à petites cellules*, ORL, rénal et Hodgkin	Bristol-Myers Squibb
	Pembrolizumab (KEYTRUDA®)	Cancers MSI, adénocarcinome œsogastrique, carcinome urothélial, mélanome*, cancer ORL, cancer bronchique non à petites cellules et Hodgkin	MSD
PD-L1	Durvalumab (IMFINZI®)	Carcinome urothélial	Astra-Zeneca
	Atezolizumab (TECENTRIQ®)	Carcinome urothélial, carcinome bronchique non à petites cellules	Roche
	Avelumab (BAVENCIO®)	Carcinome urothélial, carcinome de Merkel*	Merck Serono

\* Autorisation en France

### III.3.B) Vaccination anti-cancéreuse

La vaccination anti-tumorale connaît une remarquable renaissance depuis le succès des immunothérapies anti- ICP. D’ailleurs, ce succès est souvent associé aux réponses des lymphocytes T à des néoantigènes dans le cadre préclinique et clinique. Les vaccins autologues, à base de cellules tumorales irradiées, sont des options d’immunothérapies personnalisées prometteuses pour les tumeurs solides et hématologiques (Khan *et al.*, 2020). Dans les CCR, une étude préliminaire a montré qu’un vaccin autologue, composé de cellules tumorales irradiées et d’une souche de BCG atténuée, stimule la réponse immunitaire anti-tumorale du patient et réduit le risque de rechute de 61% dans les CCR de stade II uniquement (Vermorken *et al.*, 1999). Un essai clinique de phase IIIb sur plus de 500 patients atteints de CCR de stade II (NCT02448173), avec ce vaccin appelé Oncovax, est actuellement en cours.

### III.3.C) Transfert adoptif

La thérapie cellulaire par transfert adoptif (ACT, *adoptive cell therapy*) est une autre forme d'immunothérapie passive dite "personnalisée" car elle consiste à : 1) isoler des LT à partir de la tumeur (TILs), des ganglions drainants et/ou du sang périphérique de patients ; 2) enrichir *in vitro* les LT spécifiques des antigènes tumoraux et ; 3) réinjecter ces cellules amplifiées au patient (Rosenberg *et al.*, 2015) (figure 16). *In vitro*, les LT peuvent être modifiés génétiquement pour exprimer des récepteurs d'antigènes chimériques (CAR-T) permettant d'améliorer la reconnaissance antigénique. Dans les CCR métastatiques, cette technique a été utilisée pour générer des CAR-T spécifiques de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), biomarqueur des cancers gastro-intestinaux, surexprimé dans les tissus et le sérum des patients atteints de CCR (Nap *et al.*, 1988). L'utilisation des CAR-T anti-ACE a fait l'objet de deux essais cliniques dont un premier, basé sur 3 patients, a eu des effets indésirables sévères potentiellement mortels (Parkhurst *et al.*, 2011). Un deuxième essai clinique de phase I, basé sur 10 CCR métastatiques en rechute et réfractaires aux thérapies conventionnelles, montre que plusieurs patients (7/10) ont stabilisé la maladie après injection des CAR-T anti-ACE autologues, sans toxicité significative (Zhang *et al.*, 2017). Cependant, l'utilisation des CAR-T dans le traitement des CCR et d'autres tumeurs solides n'est pas largement recommandée du fait de la présence d'un microenvironnement tumoral hétérogène et potentiellement immunosuppresseur (Ganesh *et al.*, 2019). Afin d'augmenter l'efficacité du transfert adoptif par CAR-T dans les tumeurs solides, des études préliminaires montrent qu'il est important de génétiquement modifier les CAR-T pour sécréter de l'IL-18 qui permettrait le maintien des fonctions effectrices des CAR dans l'organisme (Hu *et al.*, 2017 ; Avanzi *et al.*, 2018).

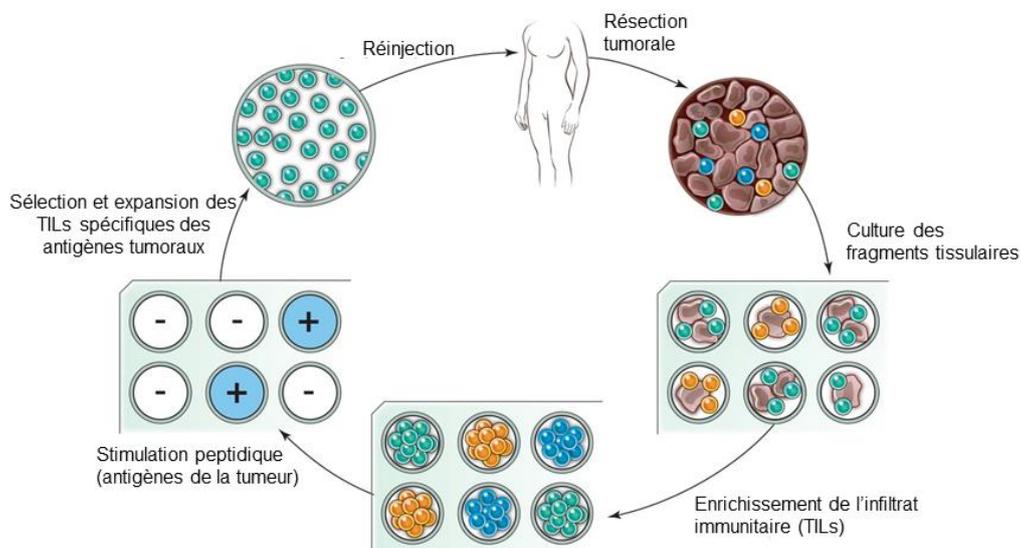


Figure 16. Schéma général du transfert adoptif. Adapté de Rosenberg *et al.*, 2015

Actuellement, dans les CCR, l'immunothérapie est limitée à un sous-groupe de patients présentant un profil génétique particulier dit "MSI-high", représentant 5% des CCR métastatiques et caractérisé par une forte charge mutationnelle (Figure 17) (Kather *et al.*, 2017). **L'amélioration de la réponse aux immunothérapies dans les CCR reste un défi primordial à relever pour les CCR métastatiques de phénotype MSS.** Ce défi passe notamment par une caractérisation profonde du MET, mais également de l'effet des cellules tumorales sur l'infiltrat lymphocytaire T. En effet, comme nous l'avons abordé précédemment, les cellules tumorales sont à l'origine d'une immunosubversion favorable à leur croissance. Plusieurs études s'intéressent à l'action des cellules immunitaires sur les cellules tumorales, mais peu d'entre elles s'intéressent à l'effet immunomodulateur positif des cellules tumorales sur l'infiltrat lymphocytaire T.

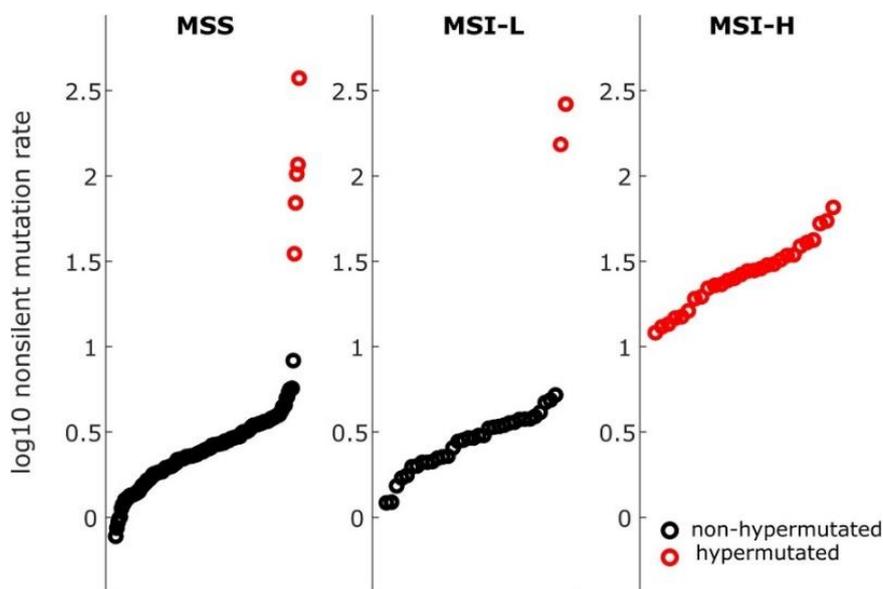


Figure 17. Charge mutationnelle en fonction du statut microsatellitaire des cancers colorectaux. MSI-L : "MSI low" ; MSI-H : "MSI high". Tiré de Kather *et al.*, 2017.

Dans le prochain chapitre, nous nous intéresserons à la voie de l'inflammasome, une plateforme de l'immunité innée présente dans les cellules épithéliales, potentiel modulateur de la réponse immunitaire adaptative, qui a actuellement un rôle émergent en immuno-oncologie et immunothérapie (Karan 2018).

## IV. L'inflammasome

L'étude de l'immunité innée chez les mammifères connaît une grande renaissance. Actuellement, l'immunité innée est considérée comme un système sophistiqué qui détecte les signaux de "danger" tels que, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : «Pathogen-associated Molecular Pattern») ou les signaux de stress cellulaire dérivés de l'hôte (DAMP : «Danger Associated Molecular Pattern»), tout en restant insensible aux motifs non "dangereux" (Couillin *et al.*, 2011). L'inflammasome est une plateforme multiprotéique cytoplasmique, de l'immunité innée. Il est composé dans sa forme "canonique" d'un récepteur (tels que les NLR "NOD-like receptor", détaillés ci-dessous), d'une protéine adaptatrice (ASC généralement) et d'une protéine effectrice la pro-caspase-1.

Il existe plusieurs inflammasomes dont la dénomination et la spécificité dépendent du récepteur (Jamilloux 2017), le plus étudié et le mieux connu étant NLRP3, que nous prendrons comme exemple (Figure 18). L'activation du NLR, qui comprend plusieurs domaines, entraîne, sous l'influence de stimuli bactériens ou de danger, son oligomérisation et conduit à la maturation de la pro-caspase-1 en caspase-1 active. La caspase-1 active effectue à son tour la maturation protéolytique des cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 $\beta$  (interleukine 1 bêta), l'IL-18 (interleukine 18). La caspase-1 active peut d'autre part déclencher une mort cellulaire pro-inflammatoire distincte de l'apoptose appelée pyroptose, en induisant le clivage de la gasdermine D (GSDMD) (Martinon *et al.*, 2002 ; Bergsbaken *et al.*, 2009) (figure 18). Les différents composants de l'inflammasome et le signal induit sont détaillés ci-dessous.

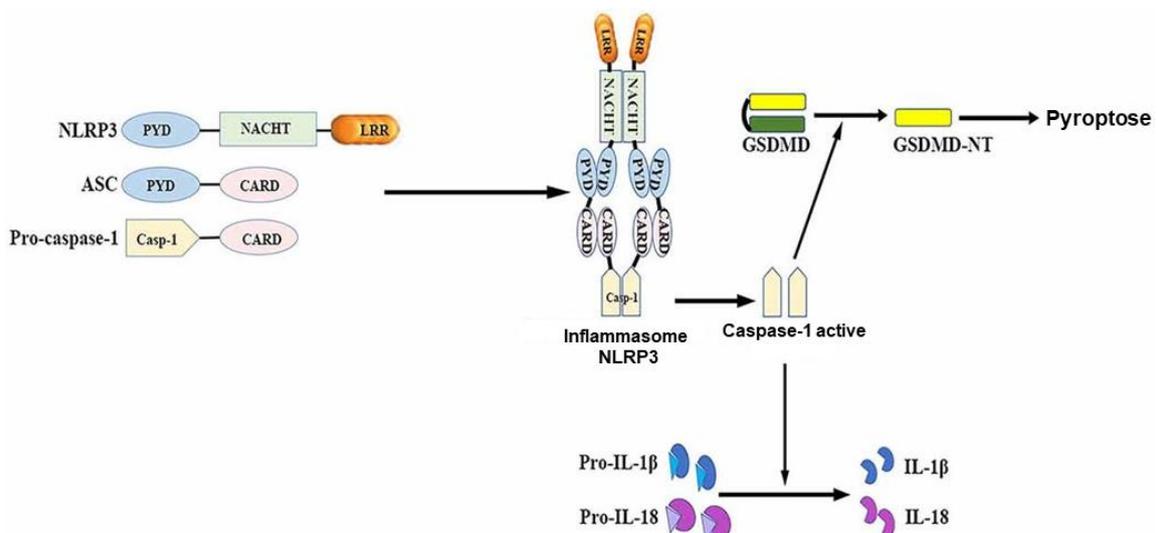


Figure 18. Composition et activation de l'inflammasome

#### IV.1 Les récepteurs de l'inflammasome

Les récepteurs de l'inflammasome font partie de la grande famille des récepteurs de l'immunité innée regroupés sous l'acronyme PRR (*Pattern Recognition Receptor*, en anglais), connus pour leurs rôles clés dans la reconnaissance microbienne et le contrôle des réponses immunitaires adaptatives (Medzhitov 2001). Les PRRs sont exprimés par les cellules en première ligne de défense telles que les cellules épithéliales des muqueuses (cellules épithéliales intestinales, pulmonaires et kératinocytes), les monocytes/macrophages, les polynucléaires, les cellules dendritiques et les cellules de l'immunité adaptative (Franchi *et al.*, 2009).

La première famille de PRR identifiée est la famille des récepteurs Toll like (TLR) qui sont localisés à la membrane cytoplasmique (TLR-1, -2, -4, -5, -6) afin de reconnaître les pathogènes extracellulaires, ou bien dans le compartiment endosomal (TLR-3, -8, -9) afin de détecter les acides nucléiques d'origine pathogène (Delneste *et al.*, 2007). Les travaux de Bruce Beutler et Jules Hoffman sur l'activation de la réponse immunitaire par le TLR4 chez l'homme ont été récompensés par un prix Nobel de médecine et de physiologie en 2011 et ont permis de relancer la recherche sur les PRRs chez les mammifères (Imler *et al.*, 2011). Par la suite, d'autres PRRs ont été identifiés et classés en différentes familles : la famille des récepteurs cytoplasmiques de type RLR [*Retinoic acid-Inducible-Gene 1 (RIG-I) Like Receptor*](Goubau *et al.*, 2013) ; les récepteurs de type CLR (*C type lectin receptor*) qui sont transmembranaires ou sécrétés (Hardison & Brown, 2012) ; les récepteurs de type NLR (Nucleotide oligomerization Receptor) qui sont intracellulaires découverts pour leur capacité à activer la caspase-1 (Martinon *et al.*, 2002) ; ainsi que les récepteurs de type ALR [*Absent in melanoma 2 (AIM-2) Like Receptor*](Ratsimandresy *et al.*, 2013). La grande diversité dans la localisation des PRRs permet d'augmenter leur capacité à reconnaître les PAMPs et DAMPs (Jamilloux & Henry, 2013).

Comme pour beaucoup d'autres mécanismes de l'immunité innée, il existe une redondance fonctionnelle entre ces différentes familles de PRRs, par exemple la redondance observée entre les TLR et RLR (Amit *et al.*, 2009). Dans la majorité des cas, la détection des PAMPs et/ou DAMPs par les PRRs se traduit par l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1, Elk-1, ATF2, p53 et des facteurs de régulation de l'interféron (IRF) qui aboutit à la production de certaines cytokines telles que les IFN de type I, l'IL-6, le TNF et des chimiokines (Kim & Choi, 2010 ; Vallabhapurapu & Karin, 2009 ; Battistini 2009). Il est connu que certaines familles de PRRs telles que les TLR et CLR peuvent fonctionner en coopération pour activer l'inflammasome via la stimulation de l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  qui nécessite une

maturation par la caspase-1 active (Trinchieri & Sher, 2007). Ainsi, seules 2 familles de PRR (les NLRs et ALRs) sont reconnues comme principaux activateurs de la caspase-1 et sont décrites ci-dessous (Lupfer *et al.*, 2019). D'autres PRRs de la famille des RLR ont été décrits comme activateurs de l'inflammasome mais cette étude nécessite confirmation (Poeck *et al.*, 2010 ; Jamilloux & Henry, 2013) (Figure 19).

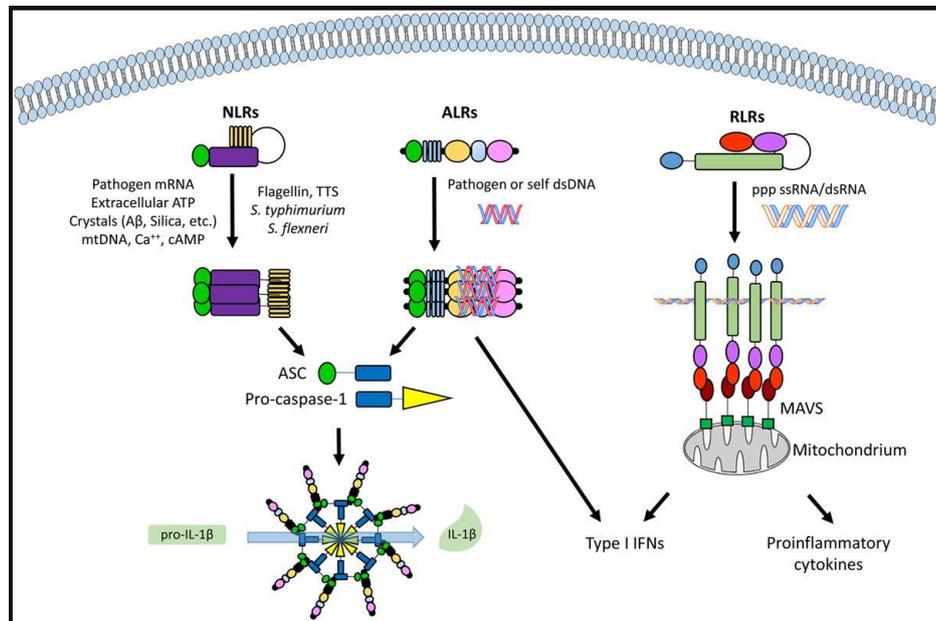


Figure 19. Les PRRs impliqués dans la formation de l'inflammasome.  
Adapté de Caneparo *et al.*, 2018

#### IV.1.A) Les inflammasomes de type NLRs

Le génome humain abrite 22 gènes qui codent pour les NLRs et sont hautement conservés au cours de l'évolution dans le règne animal et végétal (Lange *et al.*, 2011 ; Maekawa *et al.*, 2012). Les NLRs se caractérisent par trois principaux domaines structuraux présentant différentes fonctions :

- un premier domaine dans la partie N-terminale, responsable de la transduction du signal. Ce domaine permet de classer les NLRs en 3 sous-familles grâce aux différents motifs protéiques dont le motif BIR (*Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeats domain*) comprenant les NLRs de type **NAIPs** ; le motif PYD (*Pyrin Domain*) rassemble les **NLRPs** et le motif CARD (*Caspase-Recruitment Domain*) qui englobe les **NLRC** (Figure 20). Ces deux derniers motifs (PYD et CARD) font partie de la superfamille de *Death fold domain* initialement identifié sur le récepteur Fas (Itoh & Nagata, 1993).

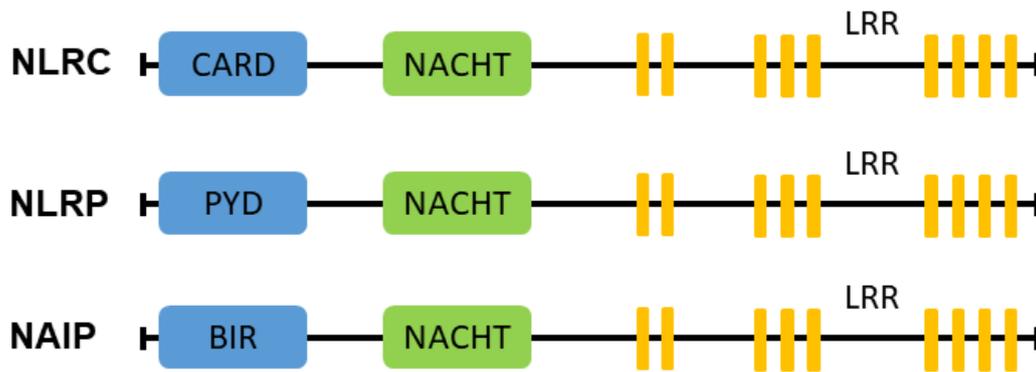


Figure 20. Les différentes sous-familles des NLRs. Adapté de Kersse *et al.*, 2011

- un deuxième domaine appelé NOD ou NACHT dans la partie centrale, commun à tous les NLRs. Le domaine NOD est responsable de l'oligomérisation ATP-dépendante par homologie de séquence après détection d'un ligand activateur (Duncan *et al.*, 2007). Pour éviter l'oligomérisation spontanée des NLRs, on pense que ces protéines sont maintenues dans un état inactif par repliement qui est décrit dans les lignes suivantes (Faustin *et al.*, 2007).

- un domaine riche en leucine (LRR, Leucin-Rich Repeats) dans la partie C-terminale. Le domaine LRR est impliqué dans la détection du ligand et interagit avec certaines protéines chaperonnes dont le complexe HSP90/SGT1 pour stabiliser de l'état inactif par repliement sur le domaine NOD, tout en favorisant la capacité des NLRs à détecter les PAMPs/DAMPs (Martinon & Tschopp, 2005 ; Mayor *et al.*, 2007).

**Les ligands activateurs de la famille des NLRs** peuvent-être des motifs bactériens tels que le peptidoglycane présent sur la paroi bactérienne, la flagelline ou des molécules de stress cellulaire telles que les dérivés actifs de l'oxygène (ROS), l'ATP extracellulaire. Les acides nucléiques bactériens et/ou viraux ont été récemment confirmés comme activateurs des inflammasomes de type NLRs suite à la découverte des protéines DHX33 et DDX19A eux aussi membres de la superfamille de *Death fold domain* comme les motifs PYD et CARD de certains NLRs comme précisé ci-dessus. Ces deux protéines, DHX33 et DDX19A, présentent un domaine de liaison à l'ADN et peuvent se lier aux NLRs par interaction de leur domaine *Death fold* au domaine NOD des NLRs (Mitoma *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2015).

#### IV.1.B) Les inflammasomes de type ALRs

Cette nouvelle famille de PRR, composée de 4 membres chez l'homme, peut former des inflammasomes fonctionnels car elle comprend l'AIM2 et l'IFI16. Ces 2 membres présentent à leur extrémité N-terminale un motif PYD identique à celui des NLRP (Jin et al., 2012) et l'extrémité C-terminale présente un domaine HIN200 (*hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with a 200-amino-acid repeat*) hautement conservé au cours de l'évolution et responsable de la détection de l'ADN double brin cytosolique par AIM2 et nucléaire par IFI16 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009 ; Kerur *et al.*, 2011). Il est à noter que IFI16 et AIM2 sont dans un état auto-réprimé en l'absence d'un ligand activateur comme pour les NLRs. Dans le cas des ALRs, l'auto-répression passe par le repliement du domaine PYD sur le domaine de liaison à l'ADN (HIN200) (Jin et al., 2012). La localisation nucléaire d'IFI16 permet d'initier rapidement une réponse aux pathogènes nucléaires tels que l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) (Kerur *et al.*, 2011). Cependant, ce récepteur doit aussi fidèlement différencier l'ADN double brin du "soi" et du "non-soi". Ces mécanismes intrigants passent par l'activation d'au moins 4 récepteurs IFI16 par de longs fragments d'ADN double brin nu, puis s'ensuit une oligomérisation d'environ 10 IFI16, obligatoire pour une activation optimale de l'inflammasome IFI16 (Stratmann et al., 2015). Le ciblage de l'ADN du soi par IFI16 est évité grâce à la présence des histones qui condensent l'ADN de l'hôte et ne le laissent pas de long fragment d'ADN nu. D'autres travaux suggèrent que IFI16 est capable d'utiliser la taille de l'ADN double brin nu comme règle moléculaire pour distinguer le soi du non-soi (Morrone et al., 2014).

#### *IV.1 C) Protéine adaptatrice des ALRs et NLRPs*

L'oligomérisation des récepteurs de l'inflammasome présentés ci-dessus conduit au recrutement d'une protéine adaptatrice ASC pour les récepteurs dont la partie N-terminale présente un motif PYD (ALRs et NLRP). ASC est une petite protéine ubiquitaire aussi connue sous les appellations CARD5, PYCARD ou TMS1. Elle est composée des deux domaines dont un domaine PYD du côté N-terminal et un domaine CARD du côté C-terminal (Masumoto et al., 1999). Elle interagit avec les récepteurs de l'inflammasome (NLRPs et ALRs) par homologie de séquence du domaine PYD et permet de recruter la protéine effectrice, la pro-caspase-1, par interaction du domaine CARD de la caspase-1 détaillée ci-dessous (Srinivasula *et al.*, 2002). Le mécanisme d'assemblage de ces différents inflammasomes est illustré dans la figure 21.

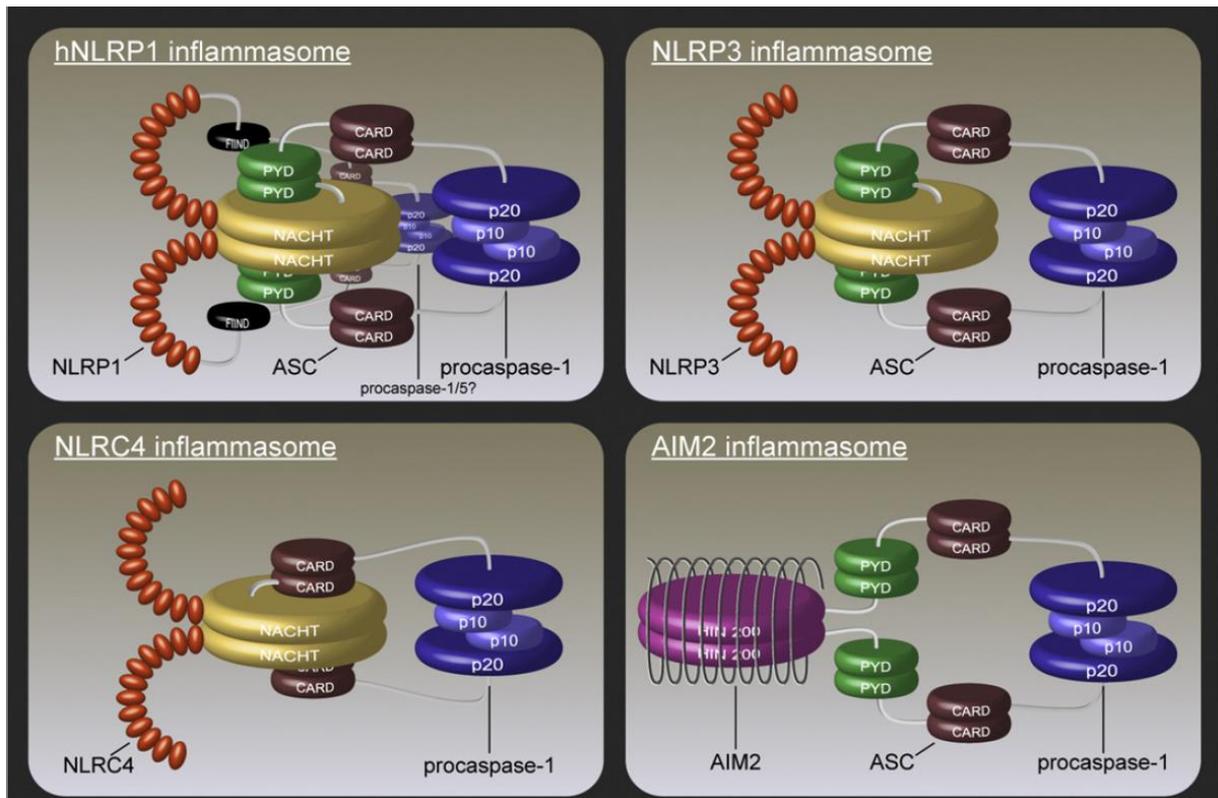


Figure 21. Représentation schématique des inflammasomes NLRP, NLRC et AIM2.  
D'après Kersse *et al.*, 2011

#### IV.2 Protéine effectrice de l'inflammasome : la caspase-1

La caspase-1 ou ICE («IL-1 Converting Enzyme») est une protéase de la famille des caspases inflammatoires, au même titre que les caspase-4, -5 et -12, chez l'Homme, qui présente un pro-domaine CARD dans la partie N-terminale (Martinon & Tschopp, 2004). La caspase-1 est la première caspase découverte chez les mammifères (Kostura *et al.*, 1989), et son rôle dans l'inflammation est bien décrit (Cerretti *et al.*, 1992 ; Thornberry *et al.*, 1992). Comme toutes les caspases, c'est une protéase à cystéine connue pour cliver ses substrats après un résidu Aspartate (Asp) d'une séquence tétra-peptidique bien conservée dans la partie C-terminale de son substrat, cette propriété catalytique étant caractéristique de la famille des caspases (Scheer 2013). La caspase-1 active est un hétérodimère composé de deux sous-unités de masse moléculaire d'environ 10kDa (p10) et 20kDa (p20) qui dérivent d'une proforme commune de 45kDa, la pro-caspase-1. Les deux sous-unités sont flanquées de résidus aspartate site d'activation de l'enzyme par auto-protéolyse (Scheer 2013) (figure 22).

L'assemblage supramoléculaire de l'inflammasome conduit au recrutement de la pro-caspase-1 par homologie de son pro-domaine CARD et celui présent sur la protéine adaptatrice ASC et/ou de certains NLRC tels que NLRC4 (Coers *et al.*, 2007 ; Abdelaziz *et al.*, 2011). Le recrutement de la pro-caspase-1 par l'inflammasome induit son auto-activation. La caspase-1 active procède au clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18, donnant naissance à la forme mature et biologiquement active de ces deux cytokines qui sont sécrétées par la cellule (Kuida *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1995 ; Martinon *et al.*, 2009) (figure 22).

En plus de la maturation de ces deux cytokines (IL-1 $\beta$  et IL-18), substrats majeurs de la caspase-1 présentés dans les prochains paragraphes, la caspase-1 active peut également induire, par des mécanismes pas complètement élucidés impliquant les gasdermines, une mort cellulaire nommée pyroptose (Frantz *et al.*, 2003). Mais les stimuli qui induisent l'activation de la caspase-1 et le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 n'entraînent pas forcément la pyroptose (Saleh & Green, 2007). L'apparition de la pyroptose semble dépendre de la formation d'un complexe appelé «pyroptosome» issu de l'oligomérisation de la protéine ASC indépendamment de l'inflammasome (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). De façon simpliste, un faible taux de caspase-1 active peut induire la maturation des cytokines pro-inflammatoires sans conduire à la pyroptose (figure 22).

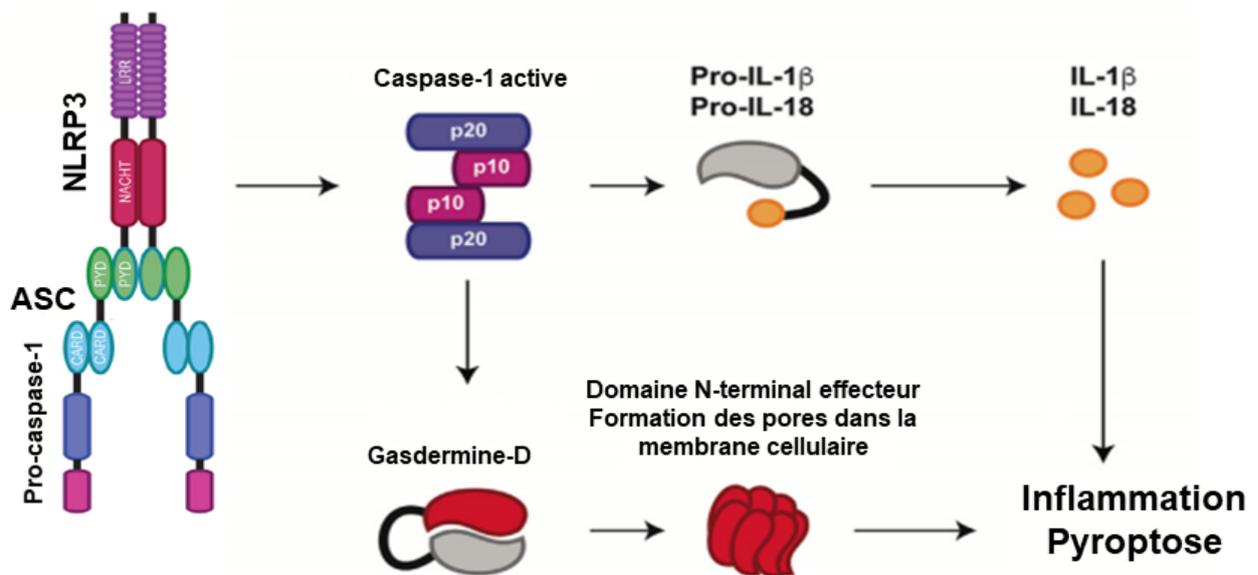


Figure 22. Fonctions effectrices de la caspase-1 après activation par l'inflammasome. Adapté de Platnich & Muruve, 2019

### IV.3 Les substrats de la caspase-1

Des études récentes de l'équipe de Maya Saleh ont rapporté l'existence de plusieurs autres substrats de la caspase-1 incluant les protéines chaperonnes, impliquées dans la modulation du cytosquelette et des enzymes de la voie de la glycolyse (Shao *et al.*, 2007). Dans les sous-sections suivantes, nous nous focaliserons sur les cytokines clivées par la caspase-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18) et le mécanisme conduisant à la pyroptose.

#### IV.3.A) L'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ )

L'IL-1 $\beta$  est un médiateur important de la réponse inflammatoire produit par plusieurs types cellulaires principalement les macrophages activés, les cellules NK, cellules dendritiques et les polynucléaires (Lopez-Castejon & Brough, 2011). Il est impliqué dans divers mécanismes tels que : le recrutement des leucocytes au site inflammatoire, il peut agir sur le système nerveux central en induisant de la fièvre et de la fatigue, et il favorise l'expression de facteurs pro-angiogéniques et d'autres cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6) (Dinarello 2009). L'expression de l'IL-1 $\beta$  est finement régulée : en effet, la transcription de la pro-IL-1 $\beta$  est dépendante de la voie NF $\kappa$ B ; la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  mature nécessite un clivage par la caspase-1 active sous l'influence de l'inflammasome car, l'IL-1 $\beta$  ne possède pas de peptide signal, ne peut pas utiliser la voie classique d'exocytose. Ainsi, il existe un découplage entre les niveaux de transcription de la pro-IL-1 $\beta$  et de sécrétion de l'IL-1 $\beta$  mature (Jamilloux & Henry, 2013). De plus, l'activité de l'IL-1 $\beta$  mature peut-être régulée par un récepteur leurre IL-1RII soluble ou membranaire dépourvu de domaine intracellulaire incapable d'induire la transduction du signal médié par l'IL-1 $\beta$  (Colotta *et al.*, 1993).

#### IV.3.B) L'interleukine 18 (IL-18)

Initialement identifiée comme un inducteur de l'IFN $\gamma$  (Nakamura *et al.*, 1989), l'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire qui participe : à la polarisation des LT vers un phénotype Th1/Tc1, en association ou non avec l'IL-12 et d'autres facteurs (Okamura *et al.*, 1995 ; Kohno *et al.*, 1997), à l'activation des cellules NK (Hunter *et al.*, 1997) mais également à l'activation d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les cellules épithéliales, endothéliales ou les fibroblastes (Gracie *et al.*, 2003). Comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif intracellulaire (pro-IL-18, 24kDa) nécessitant un clivage par la caspase-1 (IL-18 mature, 18kDa) pour être sécrétée car dépourvue de peptide signal (Gracie *et al.*, 2003).

Contrairement à l'IL-1 $\beta$ , le précurseur de l'IL-18 est constitutivement exprimé par les monocytes sanguins, les cellules épithéliales de l'ensemble du tractus gastro-intestinal, les kératinocytes et quasiment toutes les cellules épithéliales chez l'homme à l'état physiologique (Puren *et al.*, 1999).

La transduction du signal de l'IL-18 après fixation à son récepteur de faible affinité, l'IL-18R $\alpha$ , induit le recrutement de la sous-unité IL-18R $\beta$  qui permet la formation d'un complexe de forte affinité (IL-18/IL-18R $\alpha$ /IL-18R $\beta$ ), responsable de la transduction du signal via les domaines TIR des récepteurs qui se lient à MYD88, ce qui aboutit à l'activation de la voie NF $\kappa$ B et à un signal pro-inflammatoire (figure 23). Quasiment toutes les cellules de l'organisme expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) mais toutes n'expriment pas la chaîne  $\beta$  (IL-18R $\beta$ ), à l'exemple des cellules mésenchymateuses. En l'absence de la chaîne  $\beta$  la fixation de l'IL-18 à la chaîne  $\alpha$  seule n'induit pas des signaux pro-inflammatoires (Dinarello *et al.*, 2013). La transduction du signal de l'IL-18 via le complexe de forte affinité induit également l'augmentation des transcrits codant pour le facteur de transcription T-bet qui contrôle entre autre la production d'IFN $\gamma$  par différentes cellules de l'immunité innée et adaptative (Szabo *et al.*, 2000 ; Bachmann *et al.*, 2007).

D'autre part, l'IL-18 peut être négativement régulée par un récepteur leurre, l'IL-18BP (IL-18 «binding protein»), produit constitutivement, qui se lie à l'IL-18 avec une forte affinité et bloque son effet biologique (Figure 23) (Novick *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2000).

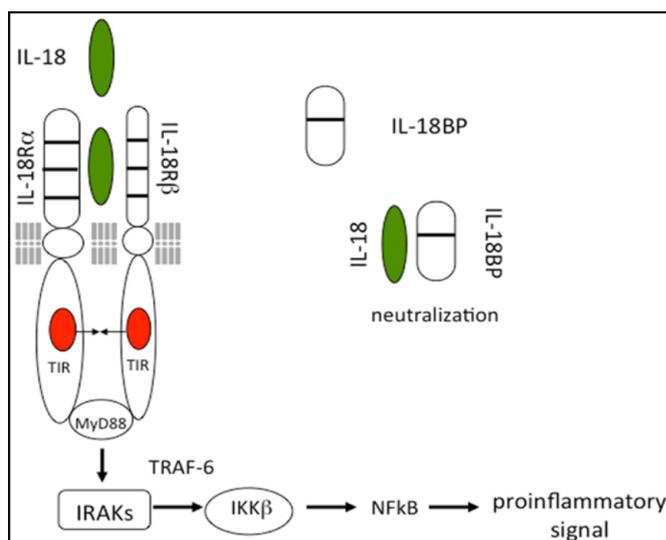


Figure 23. Transduction du signal de l'IL-18. Tiré de Dinarello *et al.*, 2013

### IV.3.C) Les gasdermines (GSDM)

Les gasdermines constituent un ensemble de protéines aux fonctions diverses, exprimées par différents tissus et types cellulaires (Feng *et al.*, 2018), initialement identifiées dans le tractus gastro-intestinal et dans le derme, ce qui a conduit à la dénomination “gasdermin” (Saeki *et al.*, 2000). Chez l’homme, il existe 6 gasdermines différentes dont la gasdermine -A (GSDMA), -B (GSDMB), -C (GSDMC), -D (GSDMD), -E (GSDME) et DFNB59 ou PJVK. Une fonction émergente des GSDM est leur capacité à induire la mort cellulaire et l’inflammation. En particulier, la GSDMD, considérée actuellement comme un substrat de la caspase-1, semble jouer un rôle dans la signalisation de l’inflammasome et la pyroptose (Feng *et al.*, 2018).

A l’exception du DFNB59, toutes les gasdermines comportent deux domaines hautement conservés (Aglietti & Dueber, 2017). Un domaine auto-inhibiteur dans la partie C-terminale qui se lie au domaine effecteur dans la partie N-terminale (Ding *et al.*, 2016). La liaison auto-inhibitrice de la partie C-terminale est levée après clivage protéolytique par les caspases inflammatoires dont la caspase-1. Ainsi, le domaine effecteur des GSDMs peut se lier aux composants lipidiques de la membrane cellulaire et former des pores qui permettront le relargage des cytokines effectrices de la caspase-1 (IL-1 $\beta$  et IL-18) (Ding *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2016). La formation des pores dans la membrane cellulaire peut conduire à la pyroptose, caractérisée par un gonflement des cellules, une condensation nucléaire, une rupture de la membrane cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-18) et de DAMPs (Jorgensen & Miao, 2015 ; Man & Kanneganti, 2016) (Figure 24).

La relation entre la pyroptose et le cancer est complexe, les effets de la pyroptose sur le cancer varient en fonction du contexte génétique et de l’organe impliqué. D’une part, la pyroptose peut inhiber l’apparition et le développement des tumeurs ; d’autre part, en tant que type de mort cellulaire pro-inflammatoire, la pyroptose peut participer à l’établissement d’un MET propice à la croissance des cellules tumorales et ainsi favoriser la progression de la tumeur. En outre, l’induction de la pyroptose tumorale est également considérée comme une cible potentielle dans la prise en charge thérapeutique des cancers (Xia *et al.*, 2019 ; Fang *et al.*, 2020).

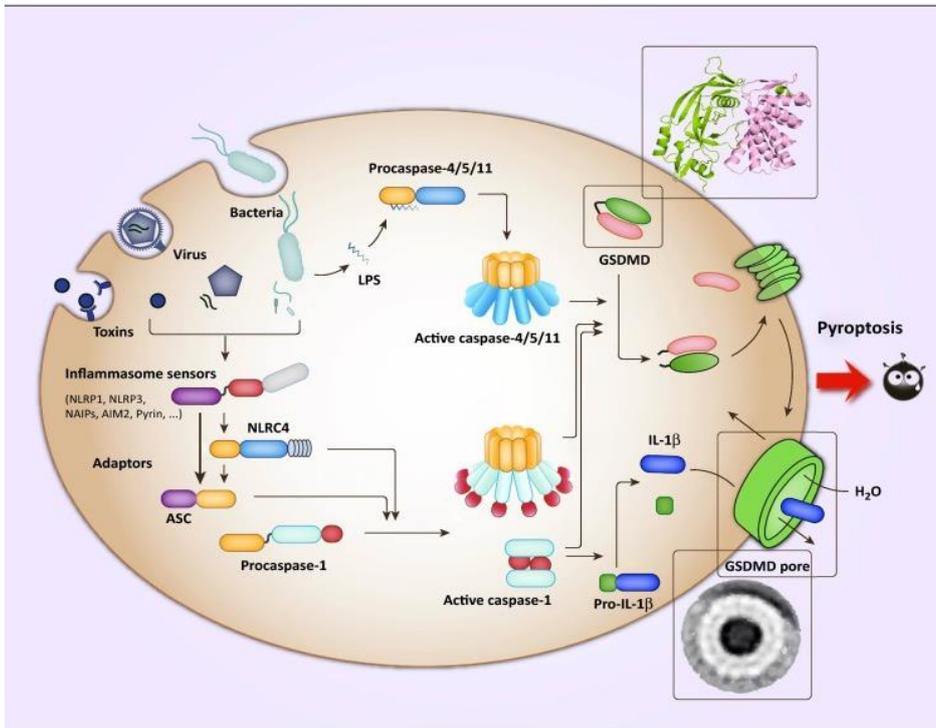


Figure 24. La pyroptose. Image tirée de Shi & Shao, 2017

Trends in Biochemical Science

#### IV.4. L'inflammasome dans l'homéostasie colique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Bien que l'inflammasome ait été beaucoup décrit et étudié dans les cellules immunitaires (cellules dendritiques et macrophages), des études récentes, chez la souris, montrent que les cellules épithéliales intestinales possèdent des inflammasomes (NLRC4, NLRP3, NLRP6 par exemples), qui peuvent s'activer en réponse à des agents pathogènes, afin de renforcer la fonction de barrière de la muqueuse colique (Knodler *et al.*, 2014 ; Sellin *et al.*, 2014). Par exemple, l'inflammasome NLRP6, présent dans des cellules sentinelles de la base de la crypte, lorsqu'il est activé par des ligands bactériens de certains TLR, s'est récemment révélé être un régulateur majeur de la sécrétion de MUC2 par les cellules caliciformes voisines, ce qui permet l'expulsion des bactéries dans le gel de mucus et maintient ainsi l'homéostasie intestinale (Birchenough *et al.*, 2016).

Dans la muqueuse colique humaine, les cellules épithéliales expriment la pro-caspase-1 et la pro-IL-18, qui peuvent être rapidement maturées par des stimuli bactériens ou de danger (Jarry *et al.*, 2011). Cependant, l'IL-1β n'est pas détectée dans les cellules épithéliales normales isolées de biopsies coliques humaines, alors qu'elle est produite et sécrétée par les cellules

mononucléées isolées du chorion (Daig *et al.*, 2000). La sécrétion de l'IL-18 pourrait avoir un effet protecteur sur la muqueuse colique, car elle permet l'élimination des bactéries et des virus via l'activation des lymphocytes T, la production d'IFN $\gamma$  et donc d'une réponse Th1/Tc1 (Kaplanski 2018). Chez la souris, selon les modèles étudiés (souris déficientes la plupart du temps), l'IL-18 a un effet soit protecteur des lésions de colite, soit délétère (Dupaul-Chicoine *et al.*, 2010 ; Siegmund 2010). De toute évidence, l'effet biologique de l'IL-18 en général et sur la muqueuse colique en particulier, est probablement dépendant de son environnement cellulaire et cytokinique et du type cellulaire la produisant (Kaplanski 2018) (Figure 25).

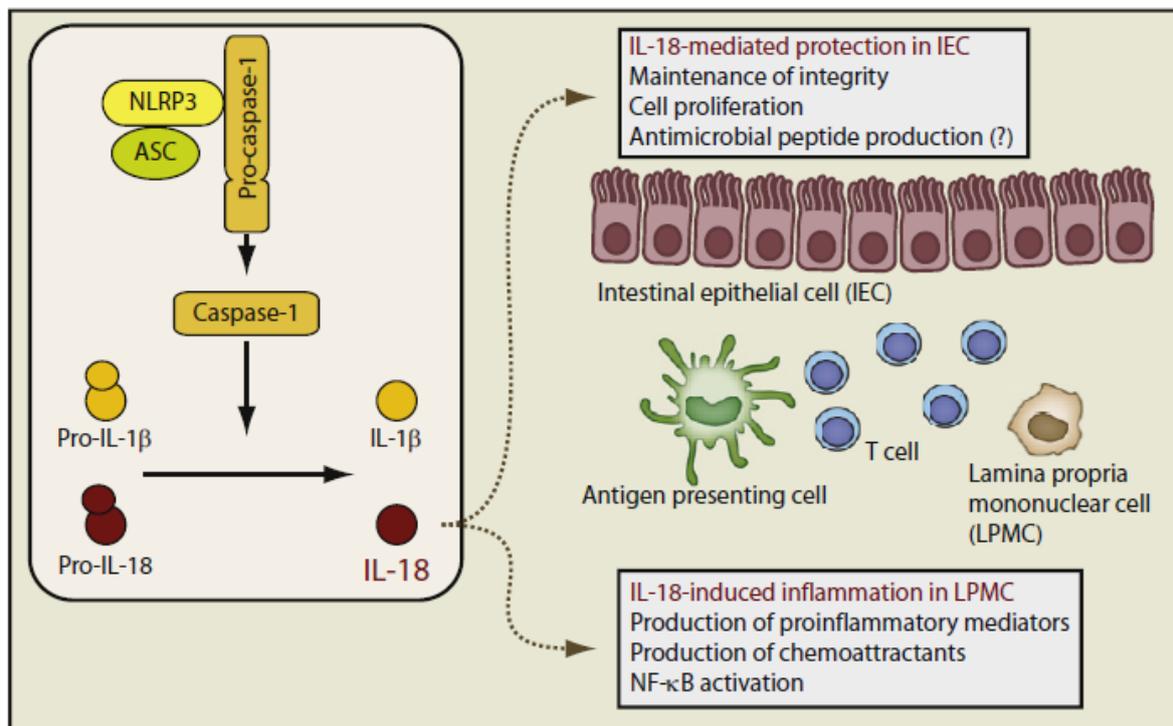


Figure 25. Effet de l'IL-18 sur la barrière épithéliale colique. D'après Siegmund 2010

De nombreuses études montrent qu'une dérégulation de la réponse inflammatoire est associée aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) que sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Pour ces deux pathologies, les hypothèses actuelles proposent que les lésions de la muqueuse intestinale sont la résultante d'une réponse immunitaire innée dérégulée déclenchée par des antigènes microbiens (Fiocchi 1998 ; Nagler-Anderson 2001 ; Brazil *et al.*, 2013). Notamment, les différentes études sur le rôle de l'inflammasome dans les MICI donnent des résultats qui semblent contradictoires (Tourkochristou *et al.*, 2019). Plusieurs études ont montré que tous les composants de l'inflammasome (NLRP3, taux sérique d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18) sont surexprimés chez les patients atteints de MICI (Ludwiczek *et al.*, 2005 ; Lazaridis *et al.*, 2017 ; Ranson *et al.*, 2018). De plus,

la sécrétion d'IL-18 mature et d'IFN $\gamma$ , analysées dans un modèle *ex vivo* de culture d'explants de muqueuse inflammatoire de patients atteints de maladie de Crohn, peut être subordonnée à la caspase-1 dans un sous-groupe de patients (Jarry *et al.*, 2015). A l'inverse, d'autres études montrent que des mutations/délétions de NLRP3 sont associées à la phase active des MICI (Bauernfeind *et al.*, 2012 ; Neudecker *et al.*, 2017) et que des mutations d'un autre type de récepteur de l'inflammasome, NOD2, sont à l'origine d'une susceptibilité accrue de développer la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001 ; Ogura *et al.*, 2001 ; Cuthbert *et al.*, 2002). Il est possible que dans l'avenir, les patients atteints de MICI puissent bénéficier de nouvelles approches thérapeutiques stimulant le système immunitaire inné protecteur (Gersemann *et al.*, 2012).

#### IV.5 L'inflammasome dans les cancers coliques

Alors que de nombreuses études montrent l'implication des inflammasomes dans les pathologies infectieuses, inflammatoires et auto-immunes, leur rôle dans la progression tumorale et dans la biologie de la cellule cancéreuse, beaucoup étudié sur des modèles animaux, est très controversé et mal connu. Leur rôle chez l'homme, en particulier dans le CCR, est très mal connu.

De nombreuses études utilisent un modèle murin de cancer associé à une colite pour étudier le rôle de l'inflammasome dans la carcinogénèse colique (modèle CAC : «Colitis-Associated Cancer»). Ces souris développent un cancer du côlon après administration de dextran-sulfate de sodium (DSS) provoquant des lésions inflammatoires intestinales (colite) et d'un carcinogène, l'azoxyméthane (AOM) (Parang *et al.*, 2016). Le modèle AOM/DSS est souvent utilisé dans des souris déficientes en composants de l'inflammasome tels que : la caspase-1, le NLRP3, le NLRC4, AIM2 et ASC, dont les effets sur la tumorigénèse sont résumés dans le tableau 4, qui montre des effets inverses selon le composant de l'inflammasome étudié. Ces effets contradictoires pourraient être expliqués par le fond génétique différent des souris étudiées et par la différence de composition en flore intestinale (Karki *et al.*, 2017 ; Pandey 2019). Il faut noter que ce modèle AOM/DSS, s'il est considéré comme un modèle mimant la carcinogénèse associée aux MICI chez l'homme (représentant 0.4% des CCR) (Jensen *et al.*, 2006), ne peut pas être considéré comme un bon modèle d'étude du CCR sporadique chez l'homme.

Tableau 4. Rôle de certains composants de l'inflammasome sur la progression tumorale dans le modèle murin AOM/DSS

Déficiences en composants de l'inflammasome	Croissance tumorale dans le modèle AOM/DSS avec une déficience <i>versus</i> AOM/DSS sans déficience	Références bibliographiques
AIM2 <sup>-/-</sup>	Augmentée	Wilson JE <i>et al.</i> , 2015 ; Man <i>et al.</i> , 2015
NLRP3 <sup>-/-</sup>	Accrue / Aucun changement	Zaki <i>et al.</i> , 2010a ; Allen <i>et al.</i> , 2010 ; Hu <i>et al.</i> , 2010
NLRP6 <sup>-/-</sup>	Augmentée	Normand <i>et al.</i> , 2011
NLRC4 <sup>-/-</sup>	Accrue / Aucun changement	Hu <i>et al.</i> , 2010 ; Allen <i>et al.</i> , 2010
ASC <sup>-/-</sup>	Diminuée	Zaki <i>et al.</i> , 2010a ; Allen <i>et al.</i> , 2010 ; Dupaul-Chicoine <i>et al.</i> , 2010 ; Williams TM <i>et al.</i> , 2015 ; Wilson JE <i>et al.</i> , 2015
*CASP1 <sup>-/-</sup> CASP11 <sup>-/-</sup>	Augmentée	Zaki <i>et al.</i> , 2010a ; Allen <i>et al.</i> , 2010 ; Dupaul-Chicoine <i>et al.</i> , 2010 ; Hu <i>et al.</i> , 2010
IL-18 <sup>-/-</sup>	Augmentée	Zaki <i>et al.</i> , 2010b ; Salcedo <i>et al.</i> , 2010
IL-1β <sup>-/-</sup>	Aucun changement	Wilson JE <i>et al.</i> , 2015

\*la caspase-11 est une caspase inflammatoire retrouvée chez la souris uniquement qui présente des fonctions redondantes à celles de la caspase-1

Chez l'homme, peu d'études concernent l'expression des différents composants de l'inflammasome et leur rôle pronostique potentiel dans les CCR. Une étude, basée sur les profils d'expression transcriptomiques de certains NLRP/NLRC en utilisant des données issues de la base du *Cancer Genome Atlas* (TCGA) ainsi que des fragments de tumeur et colon normal apparié, montre une perte d'expression de NLRP3, NLRC3, NLRC5, AIM2 dans la tumeur, corrélée à la progression tumorale pour NLRC3 et AIM2 qui seraient des facteurs pronostiques potentiels dans le CCR (Liu *et al.*, 2015). En ce qui concerne la caspase-1 et l'IL-18, les données sont très parcellaires. Des polymorphismes dans le promoteur de l'IL-18 semblent être un facteur de risque de développer un CCR (Nikiteas *et al.*, 2007). De plus, l'IL-18, étudiée au niveau ARN et protéine par immunohistochimie, est sous-exprimée dans les CCR métastatiques (Pagès *et al.*, 1999). Enfin, l'IL-18 semble être un marqueur pronostique dans certaines tumeurs solides dont le mélanome, mais pas dans le CCR (Gil & Kim, 2019).

Certains composants de l'inflammasome et ses cytokines effectrices, en particulier l'axe caspase-1/IL-18 pourraient moduler la réponse immunitaire dans le CCR et constituer une cible potentielle permettant d'activer ou de restaurer une réponse anti-tumorale.

# **CONTEXTE ET OBJECTIFS**

Dans les cancers colorectaux, tumeurs hétérogènes sur le plan moléculaire et immunitaire, les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement immunitaire, en particulier les TILs, jouent un rôle majeur étant donné l'impact pronostique des TILs cytotoxiques et mémoires, et d'une signature Th1/Tc1 évaluée jusqu'à présent par une approche transcriptomique. Cependant, cette réponse immunitaire anti-tumorale peut être contrecarrée par différents mécanismes inhibiteurs dont la surexpression de récepteurs inhibiteurs (ICP), conduisant à son inefficacité et donc à l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance. Des stratégies d'immunothérapie bloquant les ICP, bien que prometteuses dans les CCR, ont un bénéfice significatif dans les CCR MSI mais pas dans les CCR MSS, les plus fréquents.

Il est donc nécessaire de rechercher 1) des biomarqueurs prédictifs de la réponse Th1/Tc1 facilement utilisables en routine clinique et prédictifs de la réponse aux immunothérapies, et 2) de déterminer des molécules ou voies de signalisation susceptibles de réactiver une réponse immunitaire déficiente dans certains CCR, un candidat potentiel étant l'inflammasome, considéré actuellement comme pouvant jouer un rôle important en immunoncologie et immunothérapie. L'inflammasome est une plateforme moléculaire dont l'axe caspase-1 / IL-18 fait le lien entre immunité innée et adaptative (Th1/Tc1). L'équipe a montré précédemment que les cellules épithéliales coliques humaines normales possèdent un inflammasome qui peut, selon le contexte, jouer un rôle dans l'homéostasie de la muqueuse ou le déclenchement d'une réponse inflammatoire de type Th1. Ainsi, la cellule épithéliale colique peut être considérée comme une cellule immunomodulatrice capable d'activer les cellules immunitaires avoisinantes. Dans le cancer du côlon, le statut de l'inflammasome dans les cellules tumorales et son rôle potentiel dans la modulation d'une réponse anti-tumorale Th1/Tc1 n'est pas connu.

Les travaux rapportés dans cette thèse, effectués chez l'homme, sont basés sur l'exploitation multiparamétrique de la biocollection de CCR établie par la tumorothèque du CHU de Nantes, en collaboration avec les chirurgiens digestifs, les oncologues et les pathologistes. La mise en place d'un réseau de cliniciens et de chercheurs a permis, à partir de fragments de tissu frais, de développer un modèle *ex vivo* de culture d'explants de tumeur, qui maintient les interactions entre cellules tumorales et TILs et permet des études fonctionnelles.

**Les objectifs** de cette thèse, réalisée au sein de l'équipe 3 de l'Unité INSERM U1232, en partenariat avec l'Institut Roche, étaient de :

- Evaluer si Tbet, facteur de transcription impliqué dans la différenciation terminale des lymphocytes T effecteurs de type Th1/Tc1 et facilement analysable et quantifiable par immunohistochimie/analyse d'images, pouvait récapituler la réponse IFN $\gamma$  dans les CCR ; et rechercher son impact pronostique et prédictif (article 1).
- Préciser le profil d'expression des récepteurs inhibiteurs sur les TILs par cytométrie en flux après dissociation mécanique des CCR et leur implication dans l'inhibition de la réponse IFN $\gamma$  en utilisant le modèle de culture d'explants de CCR (article 1 et annexe de l'article 1)
- Caractériser le statut et la fonctionnalité de l'inflammasome des cellules tumorales en se focalisant sur l'axe caspase-1/IL-18, en relation avec la densité en TILs Th1/Tc1 (TILs T-bet+), leur réponse IFN $\gamma$  et le statut microsatellitaire des CCR, dans une cohorte rétrospective et une cohorte prospective de CCR permettant une analyse fonctionnelle sur culture d'explants et sur TILs isolés de CCR.

Ce projet a été soutenu par l'Institut Roche à travers le dispositif CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche) et par la Ligue contre le Cancer Grand Ouest (CD 44, 22, 53).

# **RESULTATS**

## Objectifs et résumé de l'article 1

Les données de la littérature montrent clairement le rôle pronostique de la réponse Th1/Tc1, appréhendée par une approche transcriptomique (Galon *et al.*, 2006 ; Mlecnik *et al.*, 2011 ; Tosolini *et al.*, 2011). En outre, cette réponse Th1/Tc1 serait un facteur prédictif de la réponse aux immunothérapies, au moins dans le mélanome (Grasso *et al.*, 2020). Cependant cette approche transcriptomique n'est pas facilement utilisable en routine clinique.

L'objectif de ce travail était d'évaluer si le marqueur T-bet, facteur de transcription des lymphocytes Th1/Tc1, pouvait récapituler la réponse Th1/Tc1 dans les CCR et de rechercher son influence pronostique et prédictive, par immunohistochimie suivie d'une quantification par analyse d'image. Cette approche permettrait d'avoir un marqueur robuste facilement utilisable en routine clinique.

Cette étude était basée sur une exploitation multiparamétrique rétrospective de la biocollection de CCR du CHU de Nantes et sur le développement, à partir de tissus frais de CCR inclus prospectivement, d'un modèle 3D de cultures d'explants de CCR à court terme. Ce modèle, qui maintient les interactions fonctionnelles entre les cellules tumorales et immunitaires du MET, permet : 1) de quantifier la réponse Th1/Tc1 en dosant l'IFN $\gamma$  dans les surnageants de culture et 2) d'examiner *ex vivo* l'effet des immunothérapies anti-PD1 sur l'amplitude de la réponse IFN $\gamma$ . Ces deux paramètres étaient corrélés à la densité et au phénotype des TILs, aux caractéristiques histopathologiques des CCR et à leur statut microsatellitaire.

Nos résultats montrent que le facteur de transcription T-bet, dont l'expression est facilement mesurable sur coupes entières, est un biomarqueur pronostique quel que soit le statut microsatellitaire des CCR. T-bet semble également être un biomarqueur prédictif de la réponse IFN $\gamma$ , du moins *ex vivo* sur le modèle de cultures d'explants de CCR. Par conséquent, ces résultats montrent que ce marqueur, assez simple d'utilisation en routine clinique, peut récapituler la réponse Th1/Tc1 dans les CCR. Une étude en collaboration avec le Pr Ghiringhelli (INSERM UMR 1231, Dijon) est en cours pour évaluer la pertinence de T-bet comme marqueur prédictif de la réponse aux immunothérapies dans une cohorte de CCR ayant participé à un

essai clinique de phase I-II multicentrique testant l'efficacité d'une chimiothérapie de type FOLFOX associée au Durvalumab (anti-PDL1) dans les CCR métastatiques en deuxième ligne.

Ce travail montre également les avantages de ce modèle préclinique de culture d'explants de CCR pour étudier l'efficacité de différents agents pharmacologiques et notamment des immunothérapies, en fonction des caractéristiques de la tumeur et de son microenvironnement immunitaire.

Les résultats de cette étude dans laquelle je suis co-premier auteur ont été publiés dans la revue Oncoimmunology en 2019.

## The density of Tbet+ tumor-infiltrating T lymphocytes reflects an effective and druggable preexisting adaptive antitumor immune response in colorectal cancer, irrespective of the microsatellite status

Eva Ott<sup>a\*</sup>, Linda Bilonda<sup>b,c\*</sup>, Delphine Dansette<sup>a</sup>, Cécile Deleine<sup>b</sup>, Emilie Duchalais<sup>d,e</sup>, Juliette Podevin<sup>d,e</sup>, Christelle Volteau<sup>f</sup>, Jaafar Bennouna<sup>d,g</sup>, Yann Touchefeu<sup>d,h</sup>, Pierre Fourquier<sup>i</sup>, Wassila El Alami Thomas<sup>j</sup>, Jérôme Chetritt<sup>i</sup>, Stéphane Bezieau<sup>g,k</sup>, Marc Denis<sup>g,k</sup>, Claire Toquet<sup>†a,g</sup>, Jean-François Mosnier<sup>a,g</sup>, Anne Jarry<sup>b</sup>, and Céline Bossard<sup>a,b,g</sup>

<sup>a</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>b</sup>CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>c</sup>Institut Roche, Boulogne-Billancourt, France; <sup>d</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Oncologie Digestive, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>e</sup>Service de Chirurgie digestive et endocrinienne, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>f</sup>Plateforme de Biométrie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>g</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; <sup>h</sup>Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; <sup>i</sup>Service de Chirurgie Viscérale et Digestive, Hôpital privé du Confluent, Nantes, France; <sup>j</sup>Institut d'Histopathologie, Nantes, France; <sup>k</sup>Plateforme de Génétique moléculaire des cancers, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France

### ABSTRACT

**Purpose:** The recent success of anti-PD1 antibody in metastatic colorectal cancer (CRC) patients with microsatellite instability (MSI), known to be associated with an upregulated Th1/Tc1 gene signature, provides new promising therapeutic strategies. However, the partial objective response highlights a crucial need for relevant, easily evaluable, predictive biomarkers. Here we explore whether *in situ* assessment of Tbet+ tumor infiltrating lymphocytes (TILs) reflects a pre-existing functional antitumor Th1/Tc1/IFN $\gamma$  response, in relation with clinicopathological features, microsatellite status and expression of immunoregulatory molecules (PD1, PDL1, IDO-1).

**Methodology:** In two independent cohorts of CRC (retrospective n = 80; prospective n = 27) we assessed TILs density (CD3, Tbet, PD1) and expression profile of PDL1 and IDO-1 by immunohistochemistry/image analysis. Furthermore, the prospective cohort allowed to perform *ex vivo* CRC explant cultures and measure by Elisa the IFN $\gamma$  response, at baseline and upon anti-PD1 treatment.

**Results:** The density of Tbet+ TILs was significantly higher in MSI CRC, especially in the medullary subtype but also in a subgroup of MSS (microsatellite stable), and positively correlated with PD1 and PDL1 expression, but not with IDO-1. Finally, a high number of Tbet+ TILs was associated with a favorable overall survival. These Tbet+ TILs were functional as their density positively correlated with basal IFN $\gamma$  levels. In addition, the combined score of Tbet+ PD1+ TILs coupled with IDO-1 expression predicted the magnitude of the IFN $\gamma$  response upon anti-PD1.

**Conclusion:** Altogether, immunohistochemical quantification of Tbet+ TILs is a reliable and accurate tool to recapitulate a preexisting Th1/Tc1/IFN $\gamma$  antitumor response that can be reinvigorated by anti-PD1 treatment.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 September 2018  
Revised 29 November 2018  
Accepted 10 December 2018

### KEYWORDS

Colorectal cancer; medullary carcinoma; Tbet; microsatellite instability; IFN $\gamma$  response; explant culture; PD1/PDL1; IDO-1; PD1 blockade

### Introduction

Cancer immunotherapy, consisting on the modulation of the immunosuppressive tumor microenvironment using antibodies targeting immune checkpoints such as the PD1/PDL1 axis, has changed the landscape of treatment strategy in diverse advanced tumors including colorectal cancer (CRC). Programmed Death Ligand 1 (PDL1) plays an important role in the inhibition of T-cell mediated immune response, mostly CD8+ cytotoxic T cells, via engagement of the PD1/PDL1 axis,<sup>1</sup> leading to tumor immune escape and progression in several malignancies.<sup>2-6</sup> The success of immune checkpoint blockade is dependent on the immunogenicity of the tumor.<sup>7-9</sup> Thus, MicroSatellite Instable (MSI)

or Mismatch Repair deficient (MMRd) CRC have been expected to be potential candidates for anti-PD1/PDL1 therapy due to a dense and vigorous immune microenvironment related to a higher mutation load compared with Microsatellite Stable (MSS) CRC.<sup>10,11</sup> The results of the first proof-of-concept study,<sup>12</sup> and of the current multicenter phase II clinical trial (Checkmate 142) testing the anti-PD1 monoclonal antibody, nivolumab, in a larger cohort of metastatic CRC patients, have validated the concept that targeting this host immune checkpoint leads to significant objective and durable response in MSI CRC patients, contrasting with a very low response in MSS CRC.<sup>13</sup> Based on this promising clinical response, the FDA recently approved nivolumab for

**CONTACT** Céline Bossard  [celine.bossard@chu-nantes.fr](mailto:celine.bossard@chu-nantes.fr)  Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, 9 quai Moncoussu, Nantes Cedex 44093, France

\*Eva Ott and Linda Bilonda contributed equally to this work

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#).

© 2019 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

the treatment of patients with MSI metastatic CRC. However, responses to PD1 blockers appear to be uneven in these “immunogenic” MSI tumors, with 70% of nonresponders<sup>13</sup> and only few MSS patients enrolled. Thus, these results remain perfectible, requiring a better understanding of the determinants of response to these therapies to identify new “fine tuned” predictive biomarkers, a critical challenge to manage MSI but also MSS CRC patients.

Multiple studies in murine models have clearly demonstrated the critical role of interferon gamma (IFN $\gamma$ ), the canonical Th1/Tc1 (T helper 1/type I cytotoxic T lymphocytes) cytokine, in coordinating the anti-tumor immune response by enhancing tumor cell immunogenicity and facilitating tumor recognition and elimination by lymphocytes. Indeed, the engagement of the TCR of tumor-infiltrating T lymphocytes (TILs) – CD8+ (Tc1) but also CD4+ (Th1) – through recognition of a specific tumor antigen/MHC complex induces the release of IFN $\gamma$  that contributes to the recruitment of effector cells and coordinates the process of innate and adaptive anti-tumor immune responses.<sup>14–17</sup> In humans, compelling evidence also suggests the major role of a Th1/IFN $\gamma$  immune profile in CRC immunosurveillance. Indeed, based on gene expression profiling, a positive correlation has been found between the expression level of both IFN $\gamma$  and Tbet – the hallmark Th1 transcription factor that controls the expression of IFN $\gamma$  –, as well as other genes associated with Th1 adaptive immunity, and an improved prognosis,<sup>18,19</sup> irrespective of the microsatellite status of the tumor.<sup>11</sup> However, at the same time, IFN $\gamma$  can compromise anti-tumor immune response by triggering a feedback inhibition loop. Indeed, IFN $\gamma$  is known to induce the expression by tumor resident cells of immune suppressive molecules such as PDL1 which interacts with the inhibitory receptor PD1 on TILs,<sup>20,21</sup> as well as IDO-1 (Indoleamine 2, 3 dioxygenase),<sup>22</sup> both able to suppress local effector T-cell function. This dual effect of IFN $\gamma$  can explain in part the positive correlation between the IFN $\gamma$ /Th1 gene signature in pretreatment tumor biopsies and the objective responses to PDL1 or PD1 blockade across a wide variety of solid tumors including MSI CRC.<sup>23–26</sup>

Altogether, these clinical results suggest a major role of a preexisting IFN $\gamma$ /Th1 tumor gene signature to predict both a favorable clinical outcome and the success of the anti-PD1/

PDL1 immunotherapies. However, gene expression profile analyses in daily clinical practice are rarely performed due to some limitations, and the development of simpler and faster methods should be considered. Tbet is well known as a Th1-specific transcription factor required for the generation of CD4+ Th1 T cells, but also controls the generation of cytotoxic CD8+ effector T cells (Tc1) and directly activates IFN $\gamma$  gene transcription.<sup>27,28</sup> Therefore, the assessment of the density of Tbet+ TILs by immunohistochemistry in clinical practice could recapitulate this *in situ* Th1/Tc1/IFN $\gamma$  anti-tumor immune response and predict both prognosis and response to immunotherapy.

To investigate this hypothesis, we performed a multiparametric analysis of the immune microenvironment of CRC, using a combination of quantitative immunohistochemistry and functional analysis on *ex vivo* explant cultures of CRC, based on two independent cohorts of CRC patients. We assessed the density of Tbet+ TILs in relation with i) the clinicopathological and molecular features of CRC, ii) the expression level of immunoregulatory molecules (PD1, PDL1, IDO-1), and iii) the IFN $\gamma$  response measured in CRC explant culture supernatants, at baseline and upon PD1 blockade, in relation to the expression level of immunoregulatory molecules.

## Results

### Clinicopathological and molecular features of patients

Two independent cohorts of CRC patients were explored in this study: a retrospective cohort (n = 80, cohort 1) and a prospective cohort (n = 27, cohort 2) (Figure 1). For the purpose of this study, the retrospective cohort was enriched in medullary carcinomas due to their high density of TILs. Patient and tumor characteristics of these two cohorts are summarized in Table 1. In cohort 1, the majority of MSS CRC corresponded to well/moderately differentiated adenocarcinoma except one case classified as medullary carcinoma. MSI CRC, regardless of their histological subtypes, exhibited the features usually described in this group of CRC, including a majority of right side tumors, preferentially observed in women and elderly patients. Out of the 41 MSI CRC, 39 were sporadic cases, two patients had Lynch

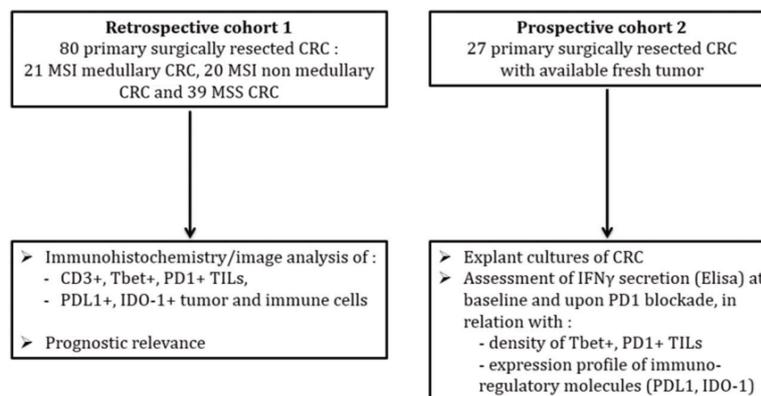


Figure 1. Study design.

**Table 1.** Patients and tumor characteristics.

	Cohort 1 (n = 80)			Cohort 2 (n = 27)
	MSI MC (n = 21) N (%)	MSI non-MC (n = 20) N (%)	MSS (n = 39) N (%)	N (%) MSS n = 23 MSI n = 4
<b>Age</b>				
Mean (range)	76.2 (35–95)	77.2 (61–89)	66.4 (44–87)	65.4 (34–88)
<b>Gender</b>				
Male	8 (38.1)	5 (25)	22 (56.4)	15 (56)
Female	13 (61.9)	15 (75)	17 (43.6)	12 (44)
<b>Tumor site</b>				
Right colon	18 (85.7)	16 (80)	12 (30.8)	8 (30)
Transverse colon	2 (9.5)	2 (10)	5 (12.8)	0
Left colon	0	2 (10)	19 (48.7)	16 (59)
Rectum	0	0	3 (7.7)	3 (11.1)
Small intestine	1 (4.7)	0	0	0
<b>Tumor size</b> (cm) mean (range)	7.52 (4–11)	6.1 (3–10)	5.03 (1.5–10)	4.9 (1.6–10)
<b>Histological subtype</b>				
Adenocarcinoma NOS:				
well/mod differentiated		8 (40)	30 (77)	18 (66.7)
poorly differentiated		0	2 (5)	3 (11.1)
Mucinous		10 (50)	4 (10.2)	5 (18.5)
Medullary	21(100)	0	1 (2.5)	0
Polymorph		2 (10)	1 (2.5)	0
Serrated		0	1 (2.5)	1 (3.7)
<b>pTNM stage</b>				
I	2 (9.5)	0	6 (15.4)	1
II	11 (52.5)	7 (35)	15 (38.6)	3
III	6 (28.5)	9 (45)	10 (25.5)	18
IV	2 (9.5)	4 (20)	8 (20.5)	5
<b>Mutational status</b>				
WT	8/19 (42.1)	6/18 (33.3)	15/29 (51.7)	10/27 (37)
RAS mutant	1/19 (5.2)	3/18 (16.6)	11/29 (37.9)	14/27 (51.9)
BRAF mutant	10/19 (52.6)	9/18 (50)	2/29 (6.9)	3/27 (10.3)
NI/ND	2/21 (9.5)	2/20 (10)	11/39 (28)	0

WT: wild-type; NI: not interpretable; ND: not done.

syndrome. The prospective cohort included 23 MSS and 4 MSI CRC. MSS CRC included 18 well/moderately differentiated adenocarcinoma, 1 poorly differentiated adenocarcinoma, 3 mucinous and 1 serrated adenocarcinoma. MSI CRC included two poorly differentiated and two mucinous adenocarcinomas.

#### **The density of Tbet+ TILs is high in MSI and in a subgroup of MSS CRC**

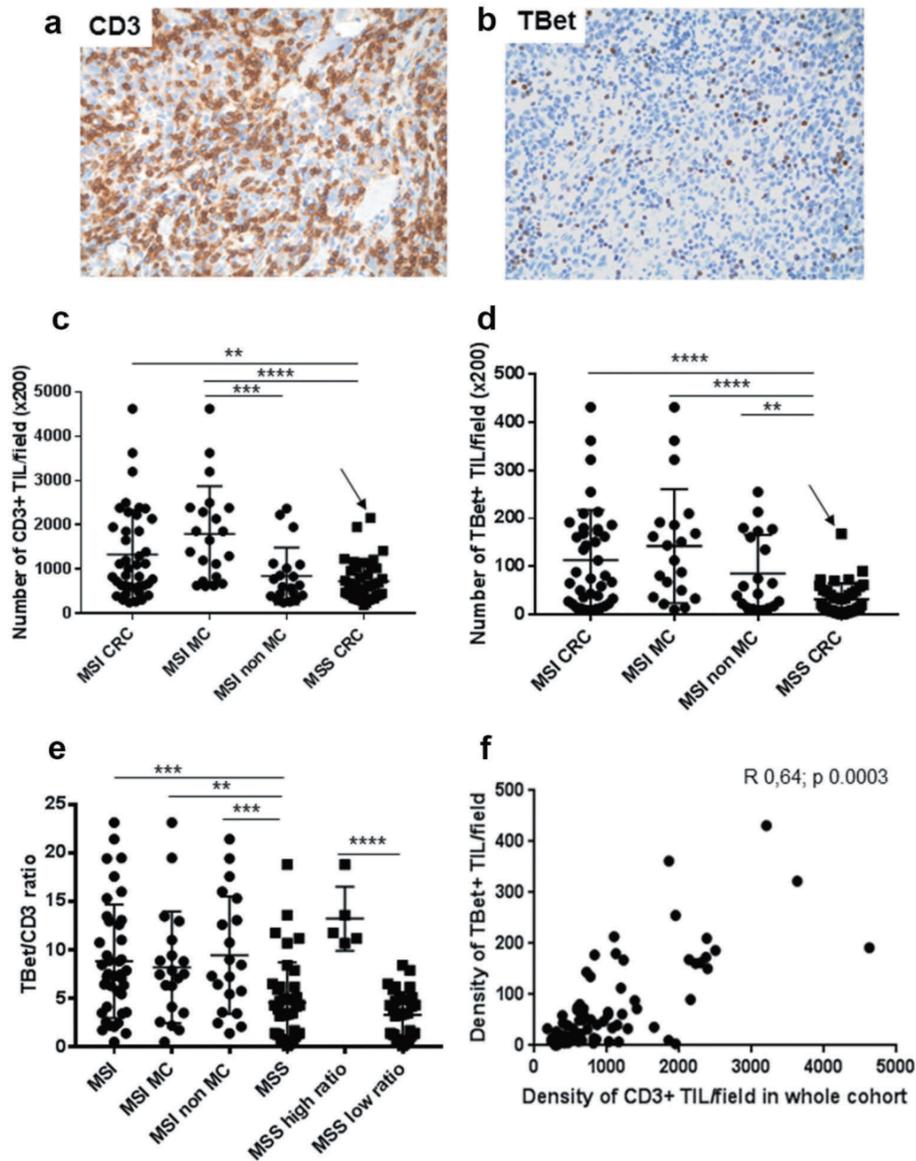
In cohort 1, the density of CD3+ and Tbet+ TILs was heterogeneous among CRC. MSI CRC contained a significantly higher number of Tbet+ TILs compared with MSS CRC (Figure 2(a-d)). Among MSI CRC, no significant difference was observed between MC and non-MC CRC (Figure 2(c-d)). Taking into account the Tbet/CD3 ratio, the density of Tbet+ TILs remained significantly higher in MSI than in MSS CRC (Figure 2(e)). The same results were observed in the prospective cohort 2 (Fig. S1). Interestingly, within MSS CRC of cohort 1, 12.8% (5/39) exhibited a high Tbet/CD3 ratio (mean 13.2% ± 1.4 vs 3.2% ± 0.4 in other MSS; Mann–Whitney test,  $p < 0.0001$ ), exceeding the mean ratio of MSI CRC (8.8%) (Figure 2(e)). This subgroup of MSS CRC with a high Tbet/CD3 ratio corresponded to moderately differentiated adenocarcinomas NOS (n = 3), or mucinous adenocarcinomas (n = 2), mainly of early stage (2 stage I, 2 stage II and 1 stage IV), of the left colon (n = 4) and the majority of them were BRAF or RAS wild type except 1 harboring a RAS exon 2 mutation. In the entire cohort 1 and 2 of MSS CRC, the Tbet/CD3 ratio was

quite similar between wild-type and BRAF or RAS mutated MSS CRC (10.5% vs 12%).

Finally, we found a significant correlation between the densities of CD3+ and Tbet+ TILs in CRC (Figure 2(f)), with the strongest correlation, observed in MSI CRC ( $r 0.76$ ,  $p < 0.0001$  for all MSI CRC;  $0.72$ ,  $p < 0.0003$  in MC and  $0.76$ ,  $p < 0.0001$  in non-MC), but also observed in MSS CRC ( $r 0.46$ ,  $p 0.002$ ) especially those with a high Tbet/CD3 ratio ( $r 1$ ,  $p 0.01$ ). The correlation between CD3+ TILs and Tbet+ TILs in MSI and MSS CRC was also observed in the prospective cohort 2 (Fig. S2).

#### **The density of Tbet+ TILs is an independent prognostic factor for overall survival**

Due to the previously reported favorable prognostic impact of the Th1/Tc1 gene signature in CRC,<sup>18</sup> we then analyzed the prognostic influence of the density of Tbet+ TILs in the retrospective cohort of CRC (cohort 1). After a 5-year follow-up, 29 patients had died (36.25%), and 20 exhibited a disease progression (25%). In univariate analysis, age (HR 1.05,  $p 0.008$ ), pTNM stage IV (HR 3.41,  $p 0.001$ ), and density of CD3+ (cut-off  $\geq 591.6$ /field; HR 0.43,  $p 0.02$ ) or Tbet+ TILs (median value,  $\geq 40$ /field, HR 0.42,  $p 0.03$ ) influenced the 5-year overall survival (OS). However, the microsatellite status (MSI, HR 1.86,  $p 0.1$ ), the density of PD1+ TILs (irrespective of the cut-off value), or the expression of IDO-1 by tumor cells (HR 0.48,  $p 0.09$ ) did not influence the OS. In multivariate analysis using the cox



**Figure 2.** Density of CD3+ and Tbet+ TILs in CRC of cohort 1. (a) (b) Representative examples of an MSI medullary carcinoma infiltrated by numerous CD3+ or Tbet+ TILs (x 200 magnification). (c) (d) Density of CD3+ or Tbet+TILs depending on the microsatellite status and the histological subtypes of CRC. The arrow indicates the MSS medullary carcinoma in each graph. (e) Percentages of Tbet+ TILs among CD3+ TILs in CRC depending on the microsatellite status and histological subtypes. (f) Correlation between CD3+ and Tbet+ TILs (Spearman correlation test). Asterisks indicate the statistical significance between subgroups of CRC (Mann–Whitney test; \*\*p < 0.01; \*\*\*p ≤ 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001). Bars indicate mean ± SD.

**Table 2.** Multivariate analysis in the whole cohort of patients (Cox regression model).

Variables	HR	CI	p-value
pTNM stage IV vs. others	4.52	1.91;10.7	0.0006
Age	1.06	1.01;1.12	0.012
MSI vs. MSS	2.13	0.9;5.04	0.08
Density of Tbet ≥40/field	0.31	0.13;0.75	0.009
Density of CD3 ≥ 591/field	0.72	0.3;1.74	0.466

HR: Hazard Ratio; CI: Confidence Interval

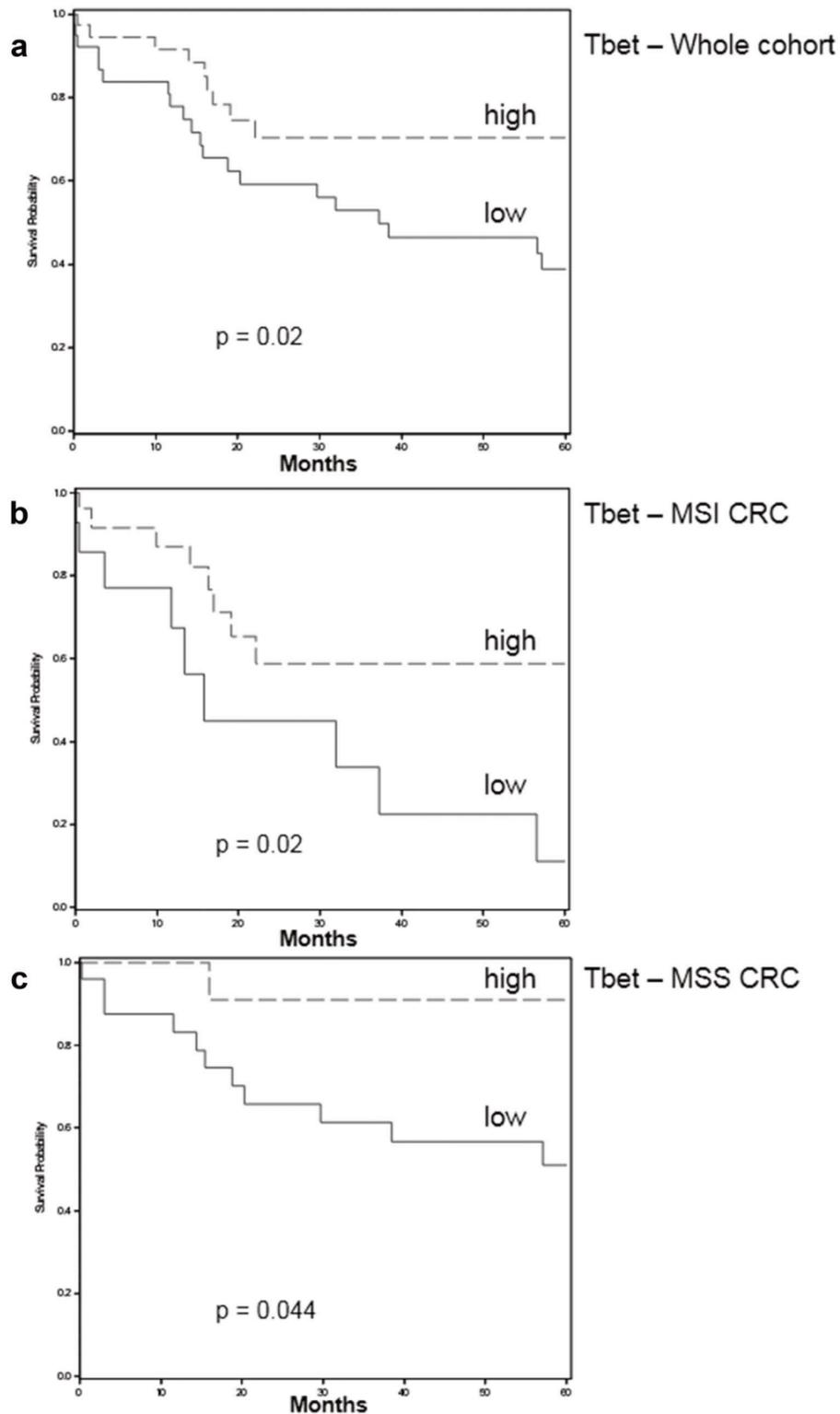
regression model and taking into account the confounding factors (age, stage, the density of Tbet+ TILs (median value) and microsatellite status), the density of Tbet+ TILs was an independent favorable prognostic factor (Table 2). The Kaplan Meier

curves shown in Figure 3(a) confirmed the prognostic value of the density of Tbet+ TILs (threshold = 2nd quartile, median value) in terms of 5-year OS in the whole cohort but also in MSI and MSS subgroups (Figure 3(b, c)).

#### Expression profiles of immunoregulatory molecules (IDO-1, PDL1, and PD1) among CRC

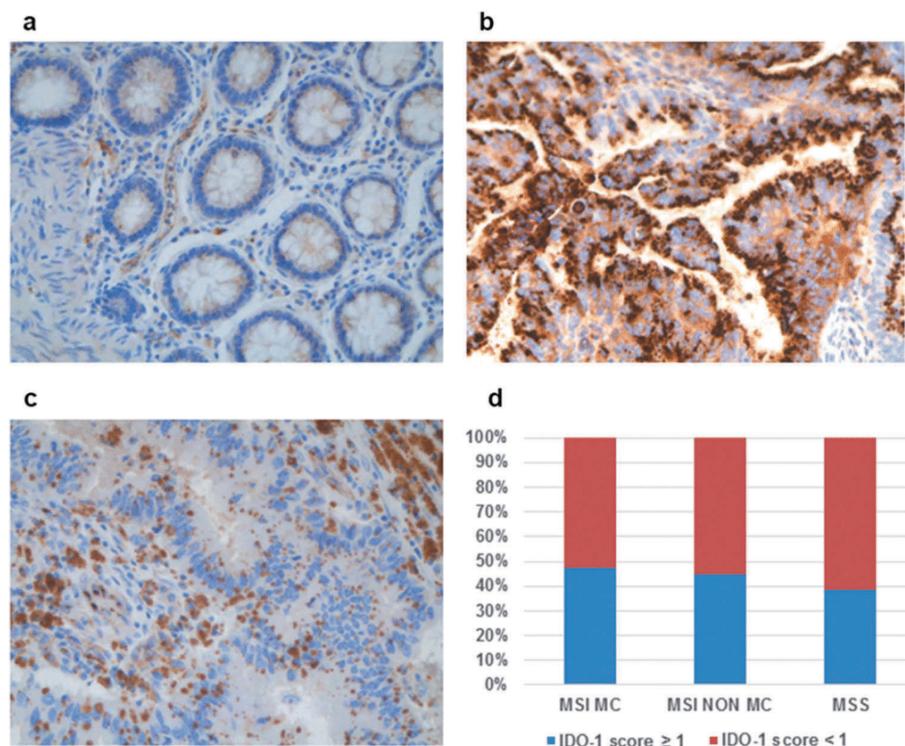
##### IDO-1 expression profile among CRC

In the normal colonic mucosa, IDO-1 was only expressed in some rare mononuclear cells and endothelial cells (Figure 4(a)). In CRC, IDO-1 was aberrantly expressed by tumor cells (Figure 4(b)), and also by some endothelial



**Figure 3.** Five-year overall survival rates depending on the density of Tbet+ TILs (Kaplan Meier curves; cut-off: median value  $\geq 40/\text{field}$  = high or  $< 40$  = low) in the whole (a) cohort 1 of patients, in MSI (b), or in MSS (c) patients. The Logrank test was used to determine p-values.

In only 1 CRC, IDO-1 was also expressed by immune cells (Figure 4(c)). This aberrant expression profile of IDO-1 by tumor cells was observed in about 40% CRC, irrespective of the microsatellite status, and without any difference between MC and non-MC among MSI CRC (Figure 4(d)).



**Figure 4.** Expression profile of IDO-1 among CRC. (a) In the normal colonic mucosa, epithelial cells do not express IDO-1. (b) In some CRC, tumor cells aberrantly express IDO-1. (c) In rare CRC, IDO-1 was expressed by immune cells (x 200 magnification). (d) The percentage of IDO-1-positive CRC (score  $\geq 1$  in tumor cells) was similar in MSI (MC and non-MC) and in MSS CRC.

#### **PDL1 expression profile among CRC**

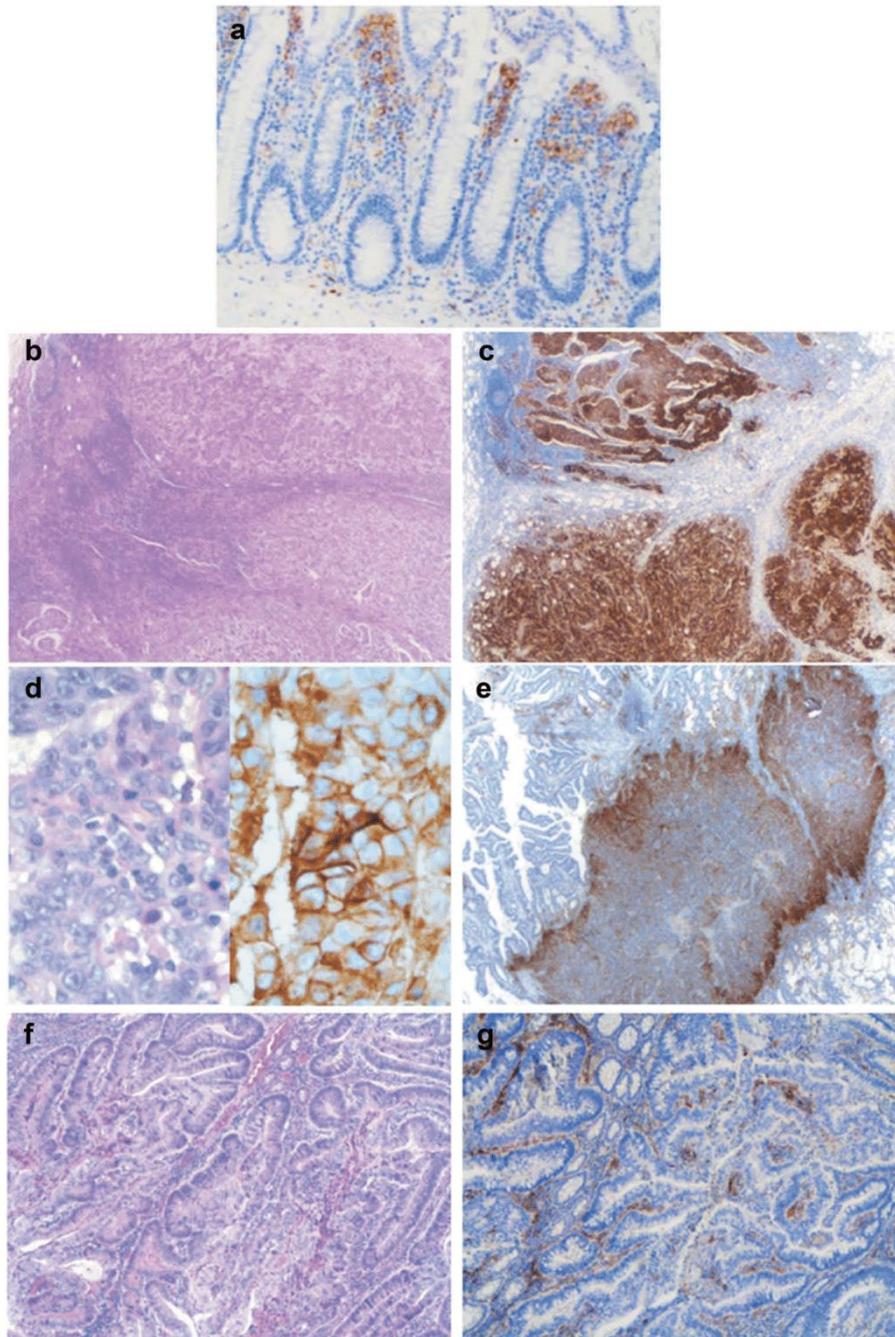
In the normal colonic mucosa, PDL1 expression was exclusively observed in some subepithelial macrophages of the lamina propria (Figure 5(a)). In CRC, in contrast to IDO-1, PDL1 expression was extremely heterogeneous among and within CRC. Representative PDL1 expression profiles are shown in Figure 5(b-g). Three expression patterns were observed: absence of PDL1 expression (17.5%), focal expression (51%) or diffuse expression (31%) (Table S1). PDL1 expression by tumor cells and immune cells (TC + IC) was preferentially observed in MSI CRC (78%), especially in MC (90%), compared with MSS CRC (46%) (Figure 6(a,b)). In order to precise the expression profile of PDL1, we investigated separately its expression on tumor cells and immune cells. PDL1-positive tumor cells were exclusively observed in MSI CRC, preferentially in MC frequently exhibiting a strong and diffuse expression pattern, often associated with PDL1+ immune cells (Figures 5(c) and 6(c-d)). In MSI non-MC, PDL1 expression always exhibited a focused pattern (scores 1 to 3) characterized by clusters of PDL1-positive tumor cells localized at the interface with the stroma, especially at the invasion front (Figure 5(e)). We then assessed the possible relation between the strong tumor cell pattern of PDL1 expression observed exclusively in MC and their mutational profile, since some *in vitro* experiments demonstrated a possible regulation of PDL1 expression by tumor cells through activation of the MEK/ERK pathway due to oncogenic driver mutations (PDL1-mediated innate immune resistance).<sup>29</sup> Although

the number of PDL1+ MC was higher among mutated (66%, 8/12) than wild-type tumors (33%), the difference was not statistically significant ( $p$  0.17, Fisher exact test). PDL1 expression by immune cells was observed in almost the same proportions in MSI and MSS CRC, a finding contrasting with the tumor cell pattern (Figure 6(e)). PDL1+ immune cells most often surrounded tumor cell nests, in aggregates or in bands, at the invasive front but also in the center of the tumor (Figure 5(g)). The majority of these PDL1+ immune cells expressed CD163 (Figure 6(g)), an activation marker of M2-type Tumor-Associated Macrophages (TAM).<sup>30,31</sup>

By comparing the expression profiles of PDL1 and IDO-1 among CRC (Table 3), no significant association was found ( $p$  0.5; Fisher exact test). We then assessed the relation between PDL1 or IDO-1 expression profiles and tumor characteristics. Overall, a strong expression of PDL1 (pattern TC + IC, score  $\geq 3$ ) was preferentially observed in large tumors, of early stage, of the right colon, in the medullary subtype, and of MSI/dMMR phenotype. IDO-1 was preferentially expressed in right-sided CRC. The main clinicopathological and molecular features of PDL1- or IDO1-positive tumors are summarized in Table S2.

#### **PDL1 expression profile among CRC**

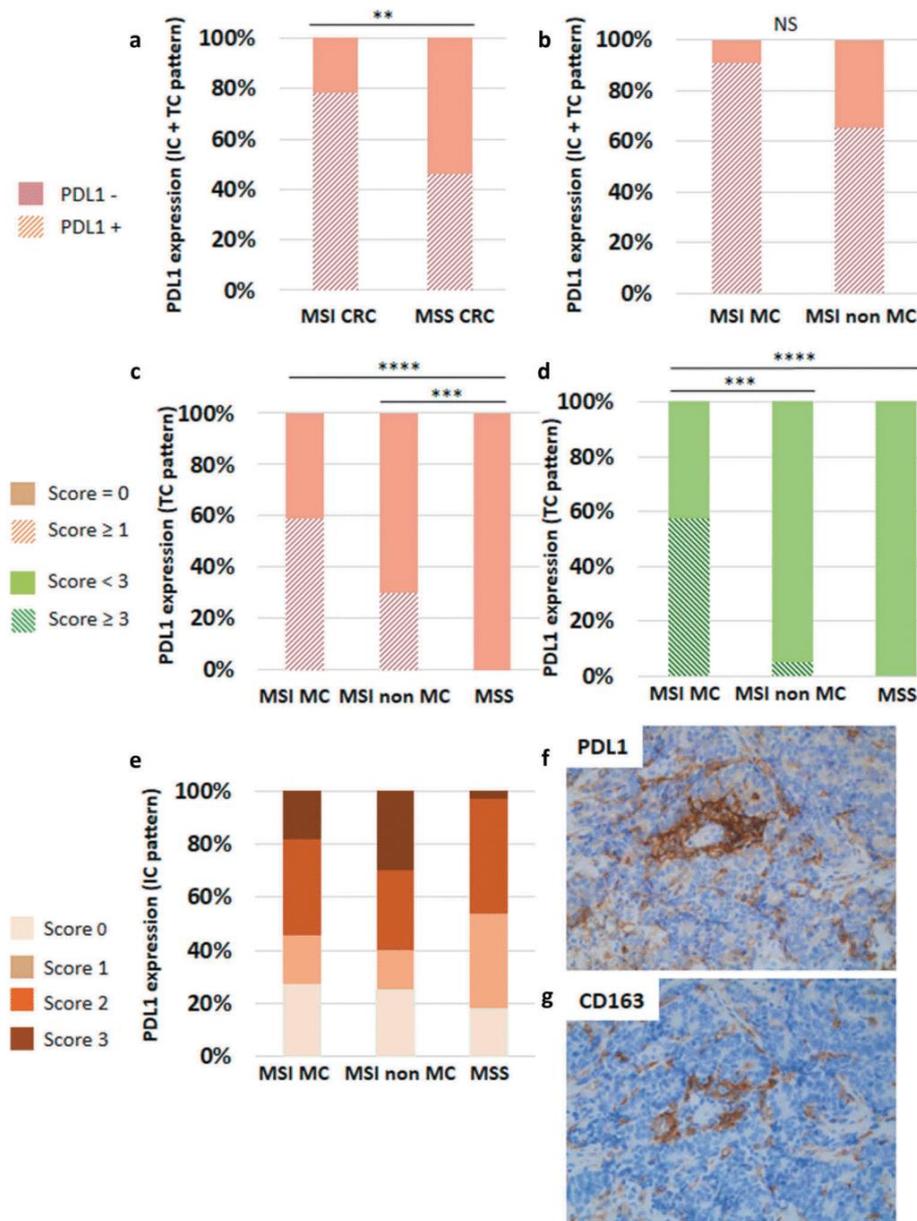
The density of PD1+ TILs, as well as the ratio PD1/CD3, were higher in MSI than in MSS CRC (Figure 7(a-c)). Among MSI CRC, the density of PD1+ TILs was higher



**Figure 5.** Representative examples of PDL1 expression patterns in CRC. (a) In the normal colonic mucosa, PDL1 was only expressed by subepithelial mononuclear cells, and not by epithelial cells. (b) (c) (d) Diffuse pattern of PDL1 expression by tumor cells (score 4) in an MSI medullary carcinoma (b, c: x250 magnification and d: x400 magnification). Heterogeneous expression of PDL1 by tumor cells (focal pattern) in an MSI, well- to moderately differentiated adenocarcinoma NOS (e: x250 magnification) and by immune cells in the stroma, around tumor glands in an MSS, well-differentiated adenocarcinoma NOS (f, g: x100 magnification).

in MC than in non-MC (Figure 7(b)), whereas the PD1/CD3 ratio was quite similar between these two subgroups (Figure 7(c)). Interestingly, the subgroup of MSS CRC with a high Tbet/CD3 ratio was also infiltrated by a higher number of PD1+ TILs than MSS CRC with a low Tbet/CD3 ratio (5.74/field vs 3.4/field). As this co-

inhibitory receptor PD1 interacts with PDL1 expressed by tumor cells or immune cells, we assessed the relation between these two markers. As expected, PDL1+ CRC were enriched in PD1+ TILs, surprisingly only when PDL1 was expressed by immune cells (Figure 7(d)). Moreover, we found a positive correlation between the



**Figure 6.** Heterogeneous expression profile of PDL1 in CRC. (a) PDL1 was preferentially expressed in MSI compared to MSS CRC. (b) Among MSI CRC, PDL1 expression was preferentially observed in the medullary subtype of CRC. Considering the expression of PDL1 by tumor cells (TC), only MSI CRC featured this expression pattern (c), especially the medullary subtype (d). PDL1 expression by immune cells (IC) was also heterogeneous. (e) Percentages of PDL1-positive IC among the three groups of CRC, depending on the scores (0 to 3). (f) A representative case of non-MC MSI CRC containing numerous PDL1-positive IC (score 3) surrounding PDL1-negative TC islets. (g) Most of PDL1-positive IC in close contact with TC are CD163+ M2 macrophages (x200 magnification). Asterisks indicate the statistical significance between subgroups of CRC (Mann-Whitney test; \*\*p < 0.01; \*\*\*p ≤ 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001).

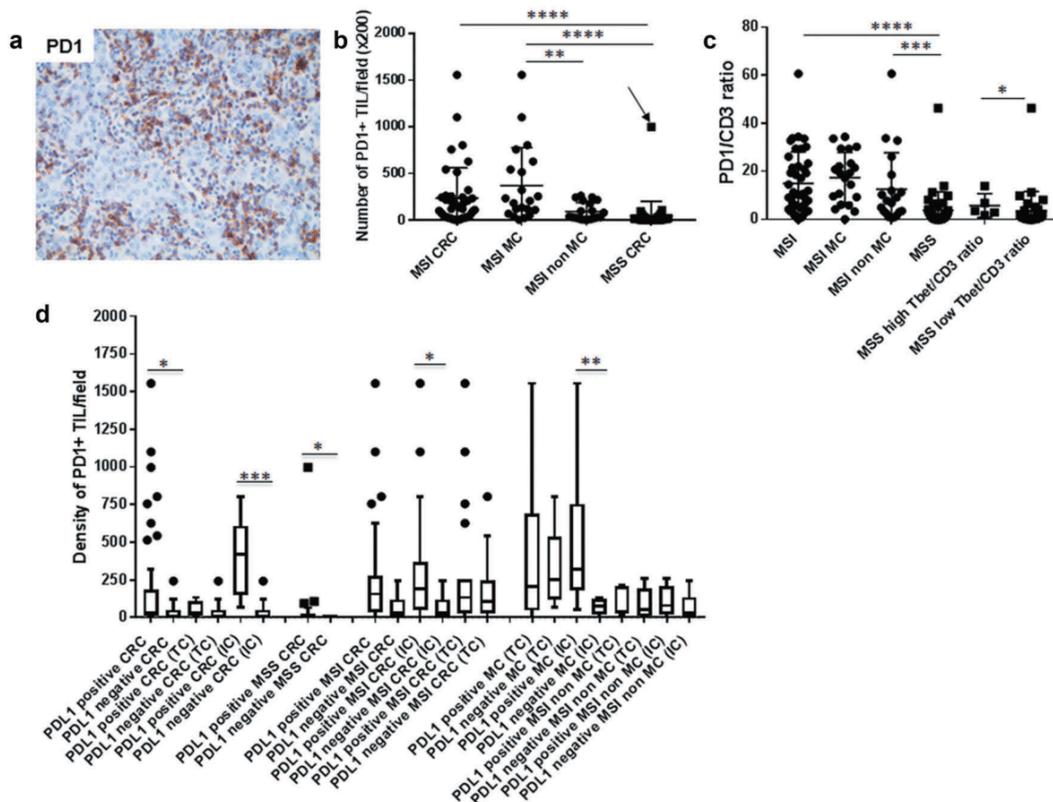
**Table 3.** Expression profiles of PDL1 and IDO-1 in CRC (cohort 1).

	IDO-1 + PDL1 +	IDO-1 - PDL1 +	IDO-1 + PDL1 -	IDO-1- PDL1 -
MSI MC	43% (9/21)	47% (10/21)	4.7% (1/21)	4.7% (1/21)
MSI non MC	40% (8/20)	35% (7/20)	15% (3/20)	10% (2/20)
MSS	38% (15/39)	43.5% (17/39)	2.5% (1/39)	15% (6/39)

extent of PDL1 expression (TC + IC) and the density of PDL1+ TILs, significant only in MSS CRC (r 0.4, p 0.006 in MSS vs r 0.2, p 0.06 in MSI CRC).

**The density of Tbet+ TILs correlates with PD1/PDL1 expression, but not with IDO-1, irrespective of the microsatellite status of CRC**

Since Tbet+ TILs could be the main source of IFN $\gamma$ , able to induce both PDL1 and IDO-1 expression, we assessed the relation between these markers. As expected, the density of Tbet+ TILs was strongly associated with PDL1 expression, irrespective of the microsatellite status or the PDL1+ cell type (TC or IC) (Figure 8(a)). In addition, Spearman correlation test revealed



**Figure 7.** Density of PD1+ TILs among CD3+ T cells in CRC and correlation with PDL1 expression patterns. (a) A representative example of an MSI MC infiltrated by numerous PD1+ TILs. (b) (c) Density of PD1+ TILs and PD1+/CD3+ ratio depending on the microsatellite status and histological subtypes of CRC (arrow indicates the MSS MC). (d) Relationship between the density of PD1+ TILs and PDL1 expression patterns (TC + IC, TC or IC) in MSI and MSS CRC. Lines show medians; Tukey whisker plots. Asterisks indicate the statistical significance between subgroups of CRC (Mann–Whitney test; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

a significant positive correlation between PDL1 expression and the density of Tbet+ TILs in MSI, but also and more noticeably in MSS CRC (Figure 8(b,c)). These data were confirmed in the prospective cohort 2 (Fig. S3). Moreover, we observed a strong correlation between the density of Tbet+ TILs and the density of PD1+ TILs, in each group of CRC (Figure 8(d-f)). This correlation was also observed in cohort 2 (Fig S2C).

However, no significant correlation was found between IDO-1 expression and the density of Tbet+ TILs or PD1+ TILs (data not shown).

#### **The density of Tbet+ TILs correlates with the levels of IFN $\gamma$ secreted at baseline and under PD1 blockade in CRC explant cultures**

In order to confirm the link between the density of Tbet+ TILs and the magnitude of IFN $\gamma$  response at baseline in CRC, we measured the levels of IFN $\gamma$  secreted in the tumor microenvironment, in relation with Tbet+ TILs. To this end, we developed explant cultures of CRC, a 3-D model maintaining the interactions between tumor cells and the resident immune cells of the microenvironment. IFN $\gamma$  was measured by Elisa in the supernatants of the 26 CRC explant cultures of the prospective cohort 2 (4 MSI and 22 MSS) after 24 h culture (baseline IFN $\gamma$  levels), in relation with the density of Tbet+

TILs. We detected a basal IFN $\gamma$  secretion in the supernatants of the majority of CRC (21/26) with a mean of 74pg/ml  $\pm$  23 (range 3–289). As expected, a positive correlation was observed between the density of Tbet+ TILs and the level of IFN $\gamma$  secreted (Figure 9(a)). We next investigated the relation between IFN $\gamma$  secretion and the expression profile of immunoregulatory molecules. Interestingly, we found a positive correlation between IFN $\gamma$  secretion and PDL1 expression (TC + IC) (Figure 9(c)). In addition, the majority of CRC including three out of four MSI CRC, devoid of IFN $\gamma$  secretion, exhibited a high density of PD1+ TILs (Figure 9(b)). In order to explore the involvement of the co-inhibitory receptor PD1 in TILs anergy/exhaustion, we blocked PD1 using neutralizing anti-PD1 antibody in eight CRC. As shown in Figure 10(a), PD1 blockade resulted either in an induction or an increase in basal IFN $\gamma$  secretion, arguing for the presence of exhausted TILs. In addition, in most cases (6/8), the magnitude of IFN $\gamma$  secretion under PD1 blockade was related both with high Tbet/CD3 and PD1/CD3 ratios. In all eight cases, PDL1 was expressed, mainly by immune cells (Figure 10(b)). However, in two cases, IFN $\gamma$  was undetectable either at baseline or under PD1 blockade. In one case, the absence of IFN $\gamma$  response was associated with the absence of Tbet+ TILs (CRC7). At the opposite, in the second case (CRC6), the absence of IFN $\gamma$  response was associated with a high Tbet/

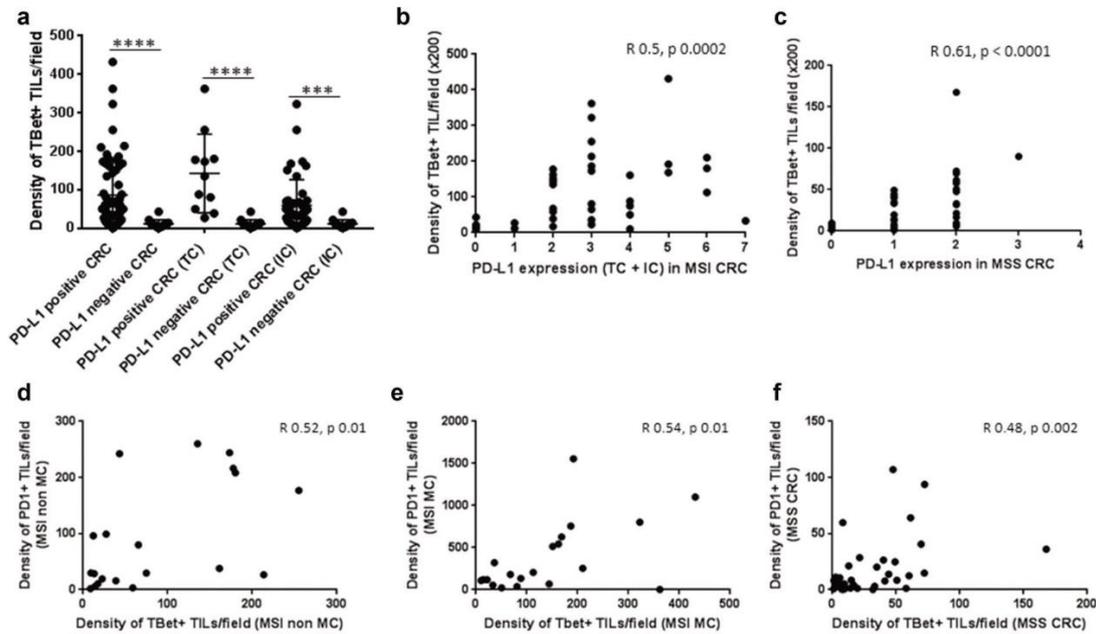


Figure 8. Relation between the density of Tbet+ TILs and the expression of the immunoregulatory markers PD1 and PDL1 among CRC. (a) Relation between Tbet+ TILs and PDL1 expression patterns (TC + IC, TC or IC; Mann–Whitney test; \*\*\*\*p ≤ 0.001; \*\*\*p < 0.0001) and correlation between these two markers in MSI (b) and MSS CRC (c). (d) (e) (f) Correlation between Tbet+ TILs and PD1+ TILs in the different subgroups of CRC was assessed by the Spearman correlation test.

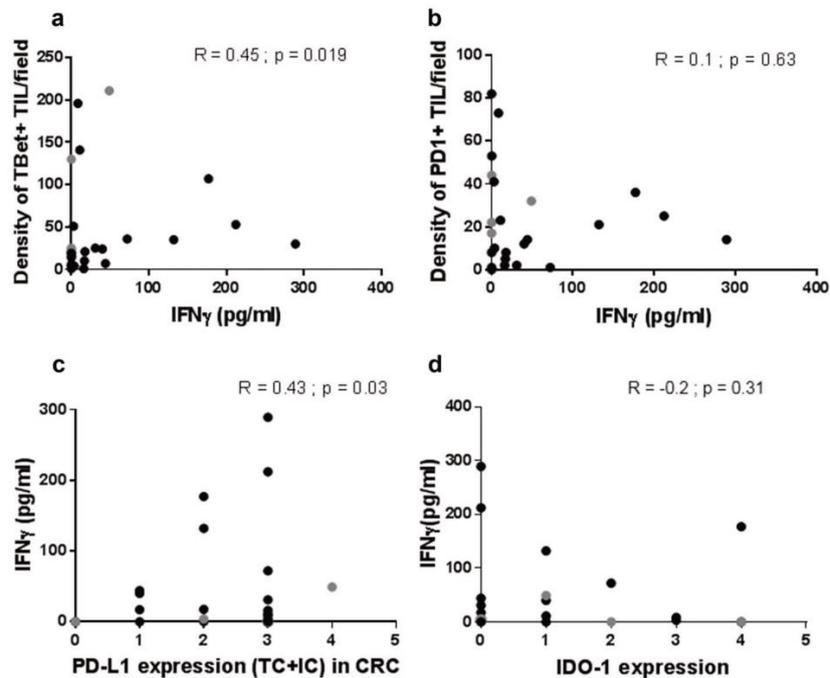
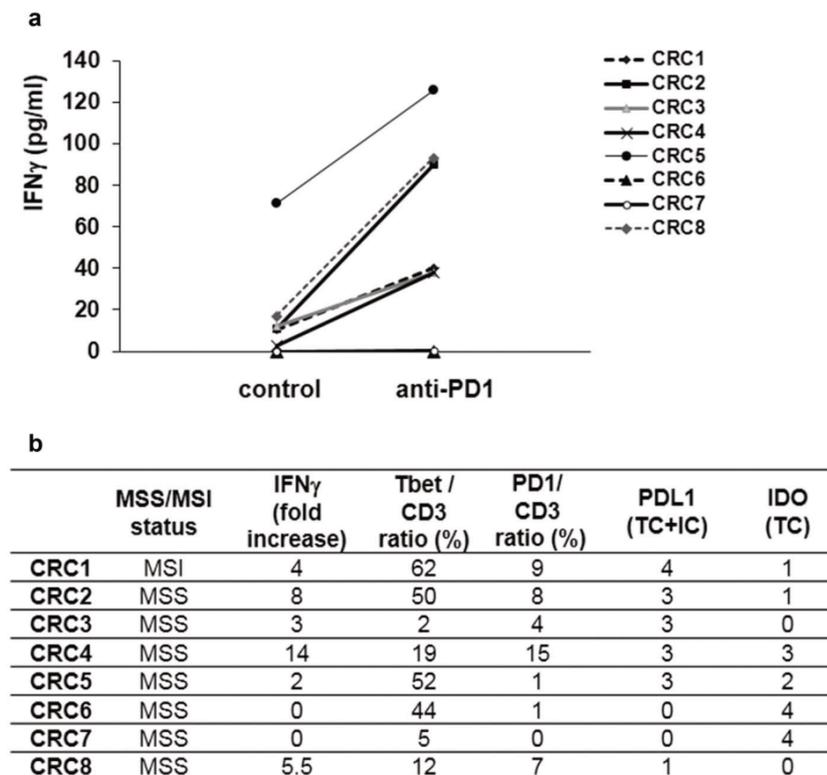


Figure 9. Relation between the IFN $\gamma$  response of CRC explant cultures and the density of Tbet+ or PD1+ TILs, and the expression profile of PDL1 or IDO-1. The level of IFN $\gamma$  secreted in 24 h explant cultures of CRC is positively correlated with the density of Tbet+ TILs (a) and the PDL1 expression profile (c). Most of CRC devoid of an IFN $\gamma$  response displayed high numbers of PD1+ TILs (b) or a high IDO-1 score in tumor cells (d). Black dots: MSS CRC. Grey dots: MSI CRC. Spearman correlation test.

CD3 ratio, no PD1+ TILs but a strong expression of IDO-1 (Figure 10(b)), suggesting the immunosuppressive effect of this enzyme on those TILs.

Finally, we did not observe any correlation between basal IFN $\gamma$  secretion and IDO-1 expression (Figure 9(d)), a finding in line with the above-mentioned absence of correlation



**Figure 10.** Effect of PD1 blockade on the IFN $\gamma$  response of CRC explant cultures, in relation with the density of Tbet+ and PD1+ TILs, and with the expression profile of PDL1 and IDO-1. (a) In eight cases (seven MSS, one MSI), explant cultures of CRC were treated or not with an anti-PD1 neutralizing antibody (10  $\mu$ g/ml for 24 h). (b) Fold increase IFN $\gamma$  response upon anti-PD1 treatment versus control cultures, in relation with the density of Tbet+ or PD1+ among CD3+ TILs, and with the expression of PDL1 or IDO-1.

between the density of Tbet+ TILs and IDO-1 expression, arguing for the presence of other regulatory mechanisms controlling IDO-1 expression.

## Discussion

The multiparametric *in situ* analysis of the immune micro-environment, in relation with the morphological and molecular features of the tumor, represents a major step to better understand the regulation of the antitumor immune response and its clinical relevance in CRC, in terms of tumor progression and therapeutic target in the era of immuno-oncology. More specifically, we are faced with a paradox showing a very low or lack of clinical benefit to PD1 blockade observed in MSS CRC patients and in almost 70% of MSI CRC<sup>12,13,32,33</sup> while several compelling evidence suggest that the majority of CRC are immunogenic due to genetic and/or epigenetic alterations.<sup>34</sup> However, these disappointing outcomes, especially in MSS CRC, probably resulted from the very limited number of MSS CRC patients enrolled in clinical studies. Importantly, despite this limited experience, disease control and even objective responses were recorded in MSS CRC patients treated with anti-PD1 antibodies, allowing a real promise of those immunotherapies in fine-tuned selected patients.<sup>12,13</sup> This apparent paradox highlights the fact that

microsatellite status is not perfectly predicting the response to anti-PD1 and thus, identification of new relevant predictive biomarkers is a critical issue to select patients that can likely benefit from this therapy. One of the main goals of immunotherapies is to re-invigorate the pre-existing effector T cells of the anti-tumor immune response, i.e. the activated Th1 and Tc1 in so-called “inflamed tumors”, that can be exhausted or anergized by the engagement of co-inhibitory receptors or other immunosuppressive molecules such as IDO-1. Indeed, as cytotoxic CD8 + T lymphocytes (Tc1) represent the main effectors of antitumor immunity, able to kill off tumor cells, tumor-specific CD4+ Th1 lymphocytes also play an important role for the maintenance, activation and expansion of Tc1 cells, in the draining lymph nodes during the priming phase, but also during the post priming phase at the tumor site. This phenomenon – called CD4 + T cell help –,<sup>35,36</sup> involves direct cell-cell interactions between Th1 and Tc1. However, tumor-specific CD4+ Th1 *per se* may be direct effector cells of antitumor response in developing cytotoxic activity on tumor cells<sup>37</sup> via IFN $\gamma$  secretion. With this knowledge in mind, the simple and accurate *in situ* evaluation of these strategic immune effector cells – Tc1 and Th1 – could be a more direct indicator of antigenicity and ongoing antitumor immune response, and thus a more sensitive predictive biomarker for response to immune checkpoint inhibition and/or

other immunotherapies. The present study provides key findings to support the clinical relevance of the assessment of the density of Tbet+ TILs – a marker that capture both Th1 and Tc1 TILs – by quantitative immunohistochemistry in a predictive and a prognostic setting.

The main findings of the current study, based on a multiparametric descriptive and functional analysis demonstrate that i) quantification of Tbet+ TILs among CD3+ TILs in the tumor microenvironment of primary tumors recapitulates, at the protein level, the prognostic and predictive roles of the Th1/Tc1/IFN $\gamma$  immune response, irrespective of the microsatellite status, ii) preexisting Tbet+ TILs have a role in local IFN $\gamma$  secretion that in turn can induce PDL1 expression and thus exhaustion of these effector TILs via engagement of the PD1 receptor and iii) a majority of CRC, irrespective of the microsatellite status, aberrantly express IDO-1 that could participate in the dysfunction of these effector TILs beyond the engagement of PD1.

The current study provides for the first time convincing arguments to support the role of preexisting Tbet+ TILs in local IFN $\gamma$  secretion, in MSI as well as in MSS CRC. Indeed, we demonstrate a positive correlation between the density of Tbet+ among CD3+ TILs (both intra and peritumoral) and the magnitude of IFN $\gamma$  secretion at baseline from *ex vivo* CRC explant cultures. We observed this functional profile in some MSI as expected, but also and most interestingly in a subgroup of MSS CRC (12%) featuring a high Tbet/CD3 ratio as high as in MSI CRC. Thus, our results are in line with and extend those of Galon et al. who clearly demonstrated that a subgroup of MSS CRC exhibits a high Th1/Tc1/IFN $\gamma$  gene signature, as the majority of MSI CRC.<sup>11,18,38</sup> Moreover, we recapture the favorable prognostic impact of this Th1/Tc1/IFN $\gamma$  gene signature in MSI as well as in MSS CRC by quantifying the density of Tbet+ TILs. The identification of Tbet+ TILs by immunohistochemistry was previously reported in CRC in only few studies, with a higher density in MSI than in MSS CRC in line with our results.<sup>39,40</sup> However, these studies did not precise the heterogeneous expression of this biomarker, especially among MSS CRC between inflammatory versus noninflammatory tumors, a major issue in this therapeutic and prognostic context. Furthermore, Ling et al. reported the favorable prognostic impact of Tbet+ TILs in MSI CRC, and observed the same trend (not statistically significant however) in MSS CRC.<sup>40</sup> Thus, our results demonstrate that quantification of Tbet+ can recapitulate the favorable ongoing IFN $\gamma$  response induced by Th1/Tc1 TILs, more frequent in MSI but also in some “inflamed” MSS CRC. To further characterize these “inflamed” MSS CRC, especially the potential immunogenicity of *BRAF* or *RAS* mutations in those tumors, we correlated the Tbet/CD3 ratio with the tumor *BRAF* or *RAS* mutational status but did not find any significant difference between mutated or wild-type MSS CRC. These findings suggest that *BRAF* or *RAS* mutations do not influence solely the number of *in situ* Th1/Tc1 TILs and that MSS inflamed CRC could harbor other more immunogenic mutations.

In addition, our *ex vivo* experiments clearly demonstrated for the first time that a high number of both preexistent Tbet+ and PD1+ TILs among CD3+ TILs is highly predictive of

either an induction or an improvement of this IFN $\gamma$  response under PD1 blockade, irrespective of the microsatellite status. Indeed, the majority of CRC devoid of IFN $\gamma$  secretion exhibited either no preexisting Tbet+ TILs and could be low immunogenic CRC corresponding to “immune desert” tumors,<sup>41,42</sup> or a high preexisting number of both Tbet+ and PD1+ TILs, reflecting an exhaustion of these Th1/Tc1 TILs by engagement of this co-inhibitory receptor. Thus, our *ex vivo* experiments argue that a combined assessment of Tbet (that recapitulates the adaptive Th1/Tc1/IFN $\gamma$  response) and PD1 by a reproducible quantitative immunohistochemical analysis is more effective than the microsatellite status to predict the response to anti-PD1 therapy. Indeed, based on these *ex vivo* experiments, CRC patients exhibiting a high Tbet and PD1 immune score can be potentially eligible to anti-PD1 therapy. Our results deepen and complete, by *ex vivo* functional proofs, some previous descriptive and clinical data based on gene expression profiling. Indeed, the Th1/Tc1 gene signature is associated with the expression of multiple immune checkpoints including the PD1/PDL1 axis that counterbalance this antitumor immune response,<sup>10</sup> in MSI but also in some MSS CRC.<sup>11</sup> The relation between the clinical response to anti-PD1 and an upregulated Th1/Tc1 or IFN $\gamma$  gene signature has been demonstrated in pretreatment biopsies in multiple tumor types including CRC.<sup>23–26,43</sup>

Thus, our findings are of major clinical importance as up to now, this adaptive Th1/Tc1/IFN $\gamma$  immune response was only assessed by specific gene expression, a time-consuming and expensive approach, difficult to perform in daily clinical practice on FFPE tissue samples. Thus, this combined score – Tbet/CD3 and PD1/CD3 – measurable by an automatic computer-assisted method that minimizes observers’ bias, could be a valuable tool in clinical practice to define subsets of CRC that might be more amenable to PD1 blockade. Therefore, a prospective evaluation of this Tbet-PD1 score as a predictive biomarker could be investigated in ongoing or future clinical trials testing the efficacy of anti-PD1/PD-L1 immunotherapies, especially to define the most appropriate cut-off value of this combined score, in order to capture more likely responder patients.

PDL1 expression was highly heterogeneous among and within CRC, depending on the morphological subtypes of CRC, the microsatellite status and the PDL1+ cell type (tumor and/or immune cells). Indeed, our current results showing a high rate of PDL1+ CRC (78% of MSI CRC including 90% of medullary carcinomas, and 46% of MSS CRC) are not in agreement with previous studies, although the same monoclonal antibody (E1L3N) and the same 5% cut-off value have been used.<sup>44–47</sup> Possible explanations for these conflicting results could be either technical issues (mainly Tissue Micro-Arrays vs whole tissue sections) and/or interpretation criteria (staining intensity, membranous vs cytoplasmic staining, tumor vs immune PDL1+ cells). Only the recent studies reported by Korehisa et al. and Valentini et al.<sup>48,49</sup>, based on whole tissue sections, are consistent with our results, showing that PDL1 expression should be evaluated on whole tissue sections to take into account its spatial heterogeneity. Furthermore, our results showing a significant association between PDL1 expression by immune cells, but not by

tumor cells, and the density of PD1+ TILs, suggest the importance of assessing the PDL1 expression pattern by immune cells, more frequent than the tumor cell pattern in CRC (except in medullary carcinomas), to better appreciate its biological impact on the antitumor immune response. The lack of correlation that has been reported between the clinical response to anti-PD1 and PDL1 expression<sup>12,13,32</sup> could be due both to the absence of a standardized score of PDL1 expression by immune cells and to its heterogeneity. In addition, assessing PDL1 expression in isolation probably offers only limited insight into the biology of the immune microenvironment.

Some experimental studies in murine models or tumor cell lines have previously demonstrated the key role of IFN $\gamma$  in the induction of immunoregulatory molecules, especially IDO-1 or PDL1. This mechanism, first described in melanoma,<sup>50</sup> corresponds to an adaptive immune resistance that inhibits the adaptive antitumor immune response via PD1 engagement and favors tumor progression.<sup>20,21</sup> In addition, it was also demonstrated in Esophageal Squamous Cell lines that the EGFR-Ras-Raf-Erk signaling pathway participates in the regulation of PDL1 expression,<sup>51</sup> and that BRAF inhibitors in melanoma patients induce a down-regulation of PDL1 expression.<sup>52</sup> Some of our results support the first hypothesis since PDL1 expression was positively correlated with both basal levels of IFN $\gamma$  and the density of Tbet+ TILs, and since no correlation was observed between PDL1 expression and BRAF/RAS mutational status, a finding in line with other studies.<sup>49</sup> However, the strong and specific tumor cell pattern of PDL1 expression in almost all MSI medullary carcinoma, previously observed by others but at a lower and variable frequency (18% to 62% cases)<sup>46,49,53</sup>, raises the issue of its oncogenic regulation, taking into account the high rate of BRAF mutations we found in these CRC. Indeed, this association has been previously reported by Valentini et al.<sup>49</sup> However, we failed to demonstrate such an association between PD-L1 expression and BRAF mutations in our series of MC CRC. Therefore, we cannot exclude that BRAF mutations modulate PDL1 expression in tumor cells in MC through activation of the MAPK signaling pathway. Beyond this potential oncogenic regulation, the hypothesis of an immune-regulated mechanism is sustained by our demonstration of a high density of effector TILs especially Tbet+ TILs and PD1+ TILs, in MC CRC, also associated with a high number of PDL1+ immune cells. In any case, with this “ideal” adaptive immune profile – Tbet high, PD1 high and PDL1 high – associated with a high BRAF mutation rate, medullary carcinoma could represent a target of choice for anti-PD1 therapy, as BRAF-mutated CRC exhibit a high clinical response rate upon nivolumab.<sup>13</sup>

Finally, regarding IDO-1, an immunosuppressive enzyme that catabolizes tryptophan, an essential amino acid for vital cellular function, and induces consequently the suppression of T cell function, its expression in cancer might be a potential new candidate for immunotherapy. Here we show that a large proportion of CRC among MSI as well as MSS subgroups aberrantly overexpress IDO-1, especially in tumor cells, a result in line with previous studies using the same monoclonal antibody.<sup>54</sup> Surprisingly, as IFN $\gamma$  is widely considered

to be the major inducer of IDO-1 in most cells,<sup>55</sup> especially in tumor cell lines,<sup>22,56</sup> we did not find any correlation between IDO-1 expression and IFN $\gamma$  levels (either basal or induced) or Tbet+ TILs density, suggesting that IDO-1 expression is not a surrogate marker of an ongoing antitumor Th1/Tc1 immune response, and that the adaptive Th1/Tc1/IFN $\gamma$  immune microenvironment is not the only modulator of IDO-1 expression by tumor cells in CRC. Most interestingly, from a therapeutic point of view, our *ex vivo* experiments suggest the role of IDO-1 in promoting Th1/Tc1 immune dysfunction since, among CRC explants, one case with no detectable IFN $\gamma$  contained a high number of Tbet+ TILs, no PD1+ TILs, but a strong expression of IDO-1. Yet, experimental data have demonstrated that IDO-1+ tumor cells can inhibit cytotoxic T cells.<sup>57</sup> Thus, this rich Tbet+ immune profile could be first switched on by the new IDO-1 inhibitors that are currently being tested in other solid tumors.

In conclusion, the current study provides evidence that: i) a preexisting Th1/Tc1 immune response is present in some MSI but also in a subgroup of MSS CRC and positively impacts prognosis; ii) this Th1/Tc1 immune response can be recapitulated by the quantification of Tbet+ TILs among CD3+ TILs by immunohistochemistry/image analysis, and iii) a combined assessment of Tbet+ and PD1+ TILs along with IDO-1 expression can predict the exhaustion of this preexisting Th1/Tc1 immune response and thus effectiveness of PD1 blockade and/or IDO-1 inhibition. Altogether, our results highlight the need for an *in situ* multiparametric approach to identify the most appropriate immune profile able to predict the response to immunotherapy. The clinical relevance of this combined immune profile associating Tbet, PD1, and IDO-1 should be investigated in the future clinical trials testing anti-PD1 or other immunotherapies in order to reinvigorate the preexisting Th1/Tc1 antitumor immune response.

## Patients and methods

### Patients and samples

One hundred and seven patients were included in the current study in two independent cohorts (Figure 1). For the purpose of the study, the retrospective cohort (cohort 1) was enriched in medullary carcinomas, a morphological subtype of CRC, due to their known high number of TILs. To this end, the database of the Department of Pathology at the CHU of Nantes was searched to identify all cases of surgically resected CRCs of the medullary subtype between 2002 and 2015 using the keywords « medullary carcinoma » (MC) or « poorly differentiated adenocarcinoma ». The cases were reviewed by two specialized gastrointestinal pathologists (JFM, CB) to confirm the diagnosis of MC based on a strict interpretation of the WHO criteria which required that at least 80% of the invasive tumor featured a solid and syncytial growth pattern containing medium-sized cells with vesicular nuclei and prominent nucleoli.<sup>58</sup> Finally, we collected a total of 21 MC. In addition, 20 non-MC MSI CRC and 39 MSS CRC resected in our institution served as control groups. The clinicopathological data collected included gender, age at surgery, tumor localization and size, pTNM, histological subtype, and overall survival (OS) data.

For functional experiments, an independent prospective cohort (cohort 2) of patients was enrolled in this study, including 27 successive patients with surgically removed CRC in our institution between 2017 and 2018.

This study was approved by the institutional board of the University Hospital of Nantes. This tissue biocollection has been registered by the French Ministry for Higher Education and Research (DC-2014–2206) with approval from EC (CPP ouest IV – Nantes). Our study was conducted in accordance with Helsinki declaration. Each patient included in this study signed an informed consent.

### Immunohistochemistry

Five-micrometer-thick full sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were cut from a representative block of tumor for each case included in this study. Immunohistochemistry was performed on an automated platform (DAKO autostainer) according to a standard protocol with the following antibodies: Tbet (clone 4B10) to identify Th1/Tc1 TILs, PD-L1 (clone E1L3N), a clone already validated,<sup>59</sup> PD1 (clone nat 105), CD3 (polyclonal rabbit antibody, DAKO), IDO-1 (mouse monoclonal, clone 10.1) and CD163 (clone 10D6) a specific marker of monocyte/macrophage lineage.<sup>60</sup> Some paired normal colonic mucosae taken at distance from the tumor were used as controls.

### Evaluation of immunostaining scores

PDL1 immunostainings with high or moderate intensity were scored using a semi-quantitative evaluation of the percentage of PDL1+ cells. Membranous PDL1 staining, the most biologically relevant pattern of expression of this transmembrane molecule, was scored separately for tumor cells (score 0 to 4) and stromal cells (score 0 to 3) in a five- and four-tiered scale, respectively (Table 4). IDO-1 immunostainings with high or moderate intensity were also scored using a semi-quantitative evaluation of percentage of IDO-1+ tumor cells (Table 5). Indeed, IDO-1 positive tumor cells were only considered since scarce IDO-1 positive immune cells were noticed within the tumor except in one case. The number of CD3+, Tbet+ and PDL1+ TILs were counted with the Digital Pathology (DP) software (Leica), after scanning the 3 most representative microscope fields at a x200 magnification. The average count per field was calculated and recorded, without analyzing separately the center and the invasive front of the tumor since the clinical impact of Tbet+ TILs seems to be independent of the

**Table 4.** Semi-quantitative assessment of PDL1 expression by tumor cells or immune cells in CRC.

Score	Tumor cells	Immune cells
0	<5%	<4 clusters of at least 50 stained immune cells/cm <sup>2</sup> or isolated cells
1	5–25%	4 to 5 clusters of at least 50 stained immune cells/cm <sup>2</sup>
2	26–50%	>5 clusters of at least 50 stained immune cells/cm <sup>2</sup> with heterogeneous staining
3	51–70%	Diffuse staining
4	>70%	

**Table 5.** Semi-quantitative assessment of IDO-1 expression by tumor cells in CRC.

Score	Tumor cells
0	<5%
1	6%–25%
2	26%–50%
3	51%–70%
4	>70%

intratumoral subsite.<sup>40</sup> Two pathologists (EO and CB) independently scored all cases and discrepant cases were reviewed on a multiheaded microscope.

### Microsatellite instability and mismatch repair status

Microsatellite instability (MSI) or mismatch repair (MMR) status was performed as part of the diagnosis or for the purpose of the study by PCR or immunohistochemistry, respectively. The microsatellite instability status was determined using a pentaplex PCR with five markers: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-22, NR-24.<sup>61</sup> Briefly, genomic DNA was extracted from 10 µm thick tissue sections of formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal tumor tissue after manual macrodissection using iPrep™ ChargeSwitch® Forensic kit (Invitrogen), and according to the manufacturer's instructions. A CRC was considered as MSI (MSI-high) if at least two of these five markers showed MSI.<sup>62</sup> The mismatch repair status was assessed by immunohistochemistry using the following antibodies: MLH1 (clone E505), MSH2 (clone FE11), MSH6 (clone EP49) and PMS2 (clone EP51).

### Mutational analysis of RAS and BRAF

Mutational analysis of *RAS* and *BRAF* genes was completed for CRC that was not previously tested in clinical practice. Ten µm tissue sections were prepared from Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tumors. DNA was extracted using the Maxwell DNA FFPE kit (Promega, France) according to the manufacturer's recommendations. Molecular testing was performed by Sanger sequencing of KRAS and NRAS exons 2, 3 and 4. For the latest samples tested, a prescreening was performed using the RAS mutations screening panel (RAS-RT50, Entrogen, Woodland Hills, CA). This PCR-based assay uses allele-specific probes to identify the presence of mutations in KRAS (19 mutations) and NRAS (13 mutations). This assay is approved for *in vitro* diagnosis (CE-IVD) and is used in routine practice in our laboratory, which is accredited in accordance with the International Standard ISO15189.

### Ex vivo CRC explant cultures

Fresh fragments of tumor were collected from the 27 CRC patients included prospectively in the study. These fragments (40 mg, n = 3 to 4 per patient) were maintained in culture for 24 h in RPMI/HAMF12 + Bovine Serum Albumin (BSA) and antibiotics (penicillin/streptomycin) in 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> humid atmosphere on a rocking platform at low speed, according to a protocol adapted from that of human normal colonic mucosa we previously validated.<sup>63,64</sup> In eight cases of

these CRC with a sufficient amount of tissue, the effects of anti-PD1 blocking antibody (Biolegend; 10µg/ml) were assessed in 24 h explant cultures. The supernatants of all explant cultures were collected, centrifuged, stored at -80°C and further analyzed for IFN $\gamma$  secretion.

### IFN $\gamma$ ELISA

IFN $\gamma$  was measured in the explant culture supernatants using an ELISA (Diaclone). Results are expressed as pg/ml as the mean of 3 to 4 explants per condition and per patient. IFN $\gamma$  levels were correlated with the number of CD3+, Tbet+ or PD1+ TILs and the expression profile of PDL1 and IDO-1, assessed by immunohistochemistry and scored as described above.

### Statistics

Clinical and pathological information, as well as the results from the quantification of CD3+, Tbet+, PD1+ TILs and PDL1, IDO-1 expression, were entered into a database. The relationship between the number of CD3+, Tbet+, PD1+ TILs, PDL1 and IDO-1 status, clinicopathological features, microsatellite status, and mutational status were assessed using Chi-square test or Fisher's exact test for qualitative variables and a nonparametric Mann-Whitney test for continuous variables. Correlations between PDL1 or IDO-1 expression and the density of the different TILs were tested by the Spearman test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software. Five-year OS was measured from date of surgery to date of death related to CRC or latest follow-up. The prognostic influence of the different parameters (stage, age, PDL1 or IDO-1 expression and CD3+, Tbet+ or PD1+ TILs) in terms of OS was evaluated using the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test according to two cut-offs (median and first quartile) and the most significant was chosen. For CD3+ TILs, as the median value was not the best cut-off value, we searched for a new cut-point for patient stratification. Strategy has consisted in determining the appropriateness of a cut-point model (graphical diagnostic plot) and, if relevant, estimate this cut point based on the method proposed by Contal and O'Quigley (macro SAS % findcut).<sup>65</sup>

Cox regression model was used to perform univariate analysis, and multivariate analysis was performed using a Cox proportional hazards regression model including all factors with  $p < 0.1$ . A  $p$  value of less than 0.05 was considered as statistically significant. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### Acknowledgments

The authors thank the Department of Pathology of CHU de Nantes for expert technical assistance in immunohistochemistry and the MicroPicel facility (SFR Bonamy, Nantes) for assistance in image analysis.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Funding

This work was supported by the Cancéropole Grand Ouest [Réseau Immunothérapie - Amgen RC16-0212-1]; Ligue contre le cancer [Grand Ouest (44, 37, 29)], and DHU Oncogreffre CHU Nantes [RC14-0416-1]. LB is the recipient of a CIFRE PhD grant from Roche and ANRT [Cifre PhD thesis].

### References

1. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275-287. PMID:27079802. doi:10.1038/nrc.2016.36.
2. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, Elkum N, Alshabanah M, Bin Amer S, Tulbah A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*. 2006;8(3):190-198. PMID:16611412. doi:10.1593/neo.05733.
3. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006;108(1):19-24. PMID:16530813. doi:10.1016/j.acthis.2006.01.003.
4. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(9):3360-3365. PMID:17360651. doi:10.1073/pnas.0611533104.
5. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2151-2157. PMID:17404099. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2746.
6. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, Herbst RS, Gettinger SN, Chen L, Rimm DL. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014;94(1):107-116. PMID:24217091. doi:10.1038/labinvest.2013.130.
7. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, Hundal J, Arthur CD, Krebber WJ, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014;515(7528):577-581. PMID:25428507. doi:10.1038/nature13988.
8. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EM, Schotte R, Calis JJ, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui DE, et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med*. 2015;21(1):81-85. PMID:25531942. doi:10.1038/nm.3773.
9. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-128. PMID: 25765070. doi:10.1126/science.aaa1348.
10. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser RL, Fan H, Wang H, Lubber BS, et al. Vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015;5(1):43-51. PMID: 25358689. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0863.
11. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, Church SE, Lafontaine L, Fischer M, Fredriksen T, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite

- instability. *Immunity*. 2016;44(3):698–711. PMID: 26982367. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.025.
12. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Lubner BS, Azad NS, Laheru D, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–2520. PMID:26028255. doi:10.1056/NEJMoa1500596.
  13. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182–1191. PMID:28734759. doi:10.1016/S1470-2045(17)30422-9.
  14. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107–1111. PMID:11323675. doi:10.1038/35074122.
  15. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN  $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):95–109. PMID: 11900986.
  16. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, Chan R, Diamond M, White JM, Sheehan KC, et al. Interferon- $\gamma$  and cancer immunoediting. *Immunol Res*. 2005;32(1–3):231–245. PMID: 16106075.
  17. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(4):689–713. PMID:29032503. doi:10.1007/s00018-017-2686-7.
  18. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–1964. PMID:17008531. doi:10.1126/science.1129139.
  19. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263–1271. PMID: 21303976. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907.
  20. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(9):1501–1509. PMID:25867264. doi:10.1038/bjc.2015.101.
  21. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, Ritz J. Interferon- $\gamma$ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*. 2015;4(6):e1008824. PMID:26155422. doi:10.1080/2162402X.2015.1008371.
  22. Spranger S, Spaepen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(200):200ra116. PMID:23986400. doi:10.1126/scitranslmed.3006504.
  23. Herbst RS, Soria JC, Kowanz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–567. PMID:25428504. doi:10.1038/nature14011.
  24. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K, Smith D, Artal-Cortes A, Lewanski C, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10030):1837–1846. PMID:26970723. doi:10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
  25. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, Albright A, Cheng JD, Kang SP, Shankaran V, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127(8):2930–2940. PMID:28650338. doi:10.1172/JCI91190.
  26. Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Crespo G, Drozdowskyj A, Aldeguer E, Gimenez-Capitan A, Teixido C, Molina-Vila MA, Viteri S, Karachaliou N, et al. Interferon  $\gamma$ , an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758834017749748. PMID:29383037. doi:10.1177/1758834017749748.
  27. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655–669. PMID: 10761931.
  28. Sullivan BM, Juedes A, Szabo SJ, von Herrath M, Glimcher LH. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15818–15823. PMID:14673093. doi:10.1073/pnas.2636938100.
  29. Liu J, Hamrouni A, Wolowicz D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, Saudemont A, Quesnel B. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296–304. PMID:17363736. doi:10.1182/blood-2006-10-051482.
  30. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23–35. PMID:12511873. doi:10.1038/nri978.
  31. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593–604. PMID: 20510870. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007.
  32. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773–779. PMID:29355075. doi:10.1200/JCO.2017.76.9901.
  33. Le DT, Kavan P, Kim TW, Burge ME, Cutsem EV, Hara H, McKay Boland P, Van Laethem JL, Geva R, Taniguchi H, et al. Pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability-high (MSI-H) colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(suppl; abstr 3514):3514. doi:10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.3514.
  34. de Vries NL, Swets M, Vahrmeijer AL, Hokland M, Kuppen PJ. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1030. PMID:27367680. doi:10.3390/ijms17071030.
  35. Keene JA, Forman K. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T cells. *J Exp Med*. 1982;155:768–782. PMID:6801178.
  36. Yo-Ping L, Chung-Jiuan J, Shu-Ching C. The roles of CD4+ T cells in tumor immunity. *ISRN Immunology*. 2011;2011: Article ID 497397, 6. doi:10.5402/2011/497397.
  37. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med*. 2010;207(3):637–650. PMID:20156971. doi:10.1084/jem.20091918.
  38. Marisa L, Svrcek M, Collura A, Becht E, Cervera P, Wanherdrick K, Buhard O, Goloudina A, Jonchère V, Selves J, et al. The balance between cytotoxic T-cell lymphocytes and immune checkpoint expression in the prognosis of colon tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(1). PMID:28922790. doi:10.1093/jnci/djx136.
  39. Boissière-Michot F, Lazennec G, Frugier H, Jarlier M, Roca L, Duffour J, Du Paty E, Laune D, Blanchard F, Le Pessot F, et al. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2014;3:e29256. PMID: 25101223. doi:10.4161/onci.29256.
  40. Ling A, Lundberg IV, Eklöf V, Wikberg ML, Öberg Å, Edin S, Palmqvist R. The infiltration, and prognostic importance, of Th1

- lymphocytes vary in molecular subgroups of colorectal cancer. *J Pathol Clin Res.* 2015;2(1):21–31. PMID:27499912. doi:10.1002/cjp2.31.
41. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75(11):2139–2145. PMID: 25977340. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.
  42. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 2017;541(7637):321–330. PMID:28102259. doi:10.1038/nature21349.
  43. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu WJ, Weber JS, Zarour HM, Kefford R, Loboda A, et al. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol.* 2015;33:15\_suppl, 3001. doi:10.1200/jco.2015.33.15\_suppl.3001.
  44. Kim JH, Park HE, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer.* 2016 Aug 9;115(4):490–496. MID: 27404452. doi:10.1038/bjc.2016.211.
  45. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ, Garcia-Aguilar J, Sadot E, Ntiamoah P, Markowitz AJ, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol.* 2016;29(11):1433–1442. PMID: 27443512. doi:10.1038/modpathol.2016.139.
  46. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PDL1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol.* 2016;29(9):1104–1112. PMID: 27198569. doi:10.1038/modpathol.2016.95.
  47. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Felisiak-Golabek A, Ikeda H, Miettinen M. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274(PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Mod Pathol.* 2017;30(2):278–285. PMID: 27813511. doi:10.1038/modpathol.2016.185.
  48. Korehisa S, Oki E, Iimori M, Nakaji Y, Shimokawa M, Saeki H, Okano S, Oda Y, Maehara Y. Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability. *Int J Cancer.* 2018;142(4):822–832. PMID: 29044503. doi:10.1002/ijc.31107.
  49. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso ML, Pirrelli M. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget.* 2018;9(9):8584–8596. PMID: 29492219. doi:10.18632/oncotarget.24196.
  50. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37. PMID: 22461641. doi:10.1126/scitranslmed.3003689.
  51. Zhang W, Pang Q, Yan C, Wang Q, Yang J, Yu S, Liu X, Yuan Z, Wang P, Xiao Z. Induction of PD-L1 expression by epidermal growth factor receptor-mediated signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Onc Targets Ther.* 2017;10:763–771. PMID: 28243112. doi:10.2147/OTT.S118982.
  52. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(3):598–609. PMID:23095323. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2731.
  53. Friedman K, Brodsky AS, Lu S, Wood S, Gill AJ, Lombardo K, Yang D, Resnick MB. Medullary carcinoma of the colon: a distinct morphology reveals a distinctive immunoregulatory microenvironment. *Mod Pathol.* 2016;29(5):528–541. PMID:26965581. doi:10.1038/modpathol.2016.54.
  54. Engin A, Gonul II, Engin AB, Karamercan A, Sepici Dincel A, Dursun A. Relationship between indoleamine 2,3-dioxygenase activity and lymphatic invasion propensity of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2016;22(13):3592–3601. PMID:27053851. doi:10.3748/wjg.v22.i13.3592.
  55. Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem.* 1996;271(29):17247–17252. PMID:8663541.
  56. Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Yoshida R. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor cells transplanted into allogeneic mouse: interferon-gamma is the inducer. *Adv Exp Med Biol.* 1991;294:437–444. PMID:1772076.
  57. Brochez L, Chevolet I, Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2017;76:167–182. PMID:28324751. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.011.
  58. Knox RD, Luey N, Sioson L, Kedziora A, Clarkson A, Watson N, Toon CW, Cussigh C, Pincott S, Pillinger S, et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(9):2988–2996. PMID:25572685. doi:10.1245/s10434-014-4355-5.
  59. McLaughlin J, Schalper K, Carvajal-Hausdorf D, Velcheti V, Haack H, Silver M, Goldberg SB, Herbst RS, Rimm DL. Domain-specific PD-L1 protein measurement in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2014;5(suppl, abst 8064):8064.
  60. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(5):794–801. PMID:15491976. doi:10.1309/QHD6-YFN8-1KQX-UUH6.
  61. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1804–1811. PMID:12454837. doi:10.1053/gast.2002.37070.
  62. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261–268. PMID:14970275.
  63. Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, Laboisie CL. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1132–1142. PMID:18259614. doi:10.1172/JCI32140.
  64. Jarry A, Bossard C, Sarrabayrouse G, Mosnier JF, Laboisie CL. Loss of interleukin-10 or transforming growth factor beta signaling in the human colon initiates a T-helper 1 response via distinct pathways. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1887–96.e1–2. PMID:21839042. doi:10.1053/j.gastro.2011.08.002.
  65. Mandrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. Cutpoint determination methods in survival analysis using SAS®. Proceedings of the 28th SAS Users Group International Conference (SUGI), Philadelphia, PA, 2003; Paper 261–28.

*Annexe à l'article 1 : Profil d'expression des principaux points de contrôle immunitaires dans les CCR (PD1, TIGIT, TIM3, LAG3)*

L'expression des ICP a été étendue au delà de l'axe PD1/PDL1, en recherchant le profil d'expression d'autres ICP dont TIGIT, TIM3, LAG3 encore mal connus dans les CCR. Ce profil a été recherché *ex vivo* après dissociation mécanique de CCR (n=26, 4MSI et 22MSS) et cytométrie en flux multiparamétrique. La suspension cellulaire obtenue après dissociation mécanique a été incubée pendant 30min à 4° soit en présence des différents anticorps (CD3, PD1, TIGIT, TIM3 et LAG3) ou des contrôles isotypiques correspondants. Les différents anticorps utilisés sont mentionnés dans le tableau 5. Un marqueur de viabilité a été également utilisé dans ce multimarquage afin d'exclure les cellules mortes. Après marquage, la suspension cellulaire a été analysée à l'aide d'un cytomètre LSR Fortessa X20 et du logiciel DIVA 8.0.2. La figure 26A (panel du haut) illustre la stratégie de sélection des TILs CD3+.

Tableau 5. Anticorps utilisés pour le profil d'expression des principaux ICP et leurs contrôles isotypiques

Anticorps-fluorochromes	Clone	Contrôle isotypique	Fournisseur
FVS780-APCH7	Marqueur de viabilité		BD Biosciences
CD3-BUV395	UCHT1	IgG1κ-BUV395	BD Biosciences
PD1-BV421	EH12.1	IgG1κ-BV421	BD Biosciences
TIGIT-PECy7	A15153G	IgG2A-PECy7	Biolegend
TIM3-PE	F38-2E2	IgG1κ-PE	Biolegend
LAG3-BV650	11C3C65	IgG1κ-BV650	Biolegend

Puis nous avons recherché parmi les TILs CD3+ ceux qui expriment l'un des ICP (Figure 26A panel du milieu et Figure 26B) ou ceux qui co-expriment PD1 et l'un des 3 autres principaux ICPs (TIGIT, TIM3 et LAG3) (Figure 26A panel du bas et Figure 26C).

Comme le montre la figure 26B, dans la majorité des cas, les TILs CD3+ expriment fortement non seulement PD1, mais aussi TIGIT (médiane : environ 75%) et à moindre degré TIM3 et LAG3 (médiane à 25% et 10% respectivement). De plus, les TILs double positifs PD1+TIGIT+ sont plus fréquents (60%) que les TILs PD1+TIM3+ (20%) ou PD1+LAG3+ (2%). Ces TILs double positifs pourraient représenter des TILs particulièrement dysfonctionnels et épuisés, comme cela été suggéré dans certaines tumeurs solides (Li *et al.*, 2019) ce qui expliquerait l'absence de production d'IFN $\gamma$  dans certains CCR qui sont riches en

TILs Tbet+. Une étude en cours vise à rechercher l'effet des anti-Tigit seuls ou en combinaison avec les anti-PD1 dans le modèle de culture d'explants sur la réponse IFN $\gamma$ . Cette étude préliminaire sera complétée par l'inclusion d'un plus grand nombre de cas, en particulier de CCR MSI.

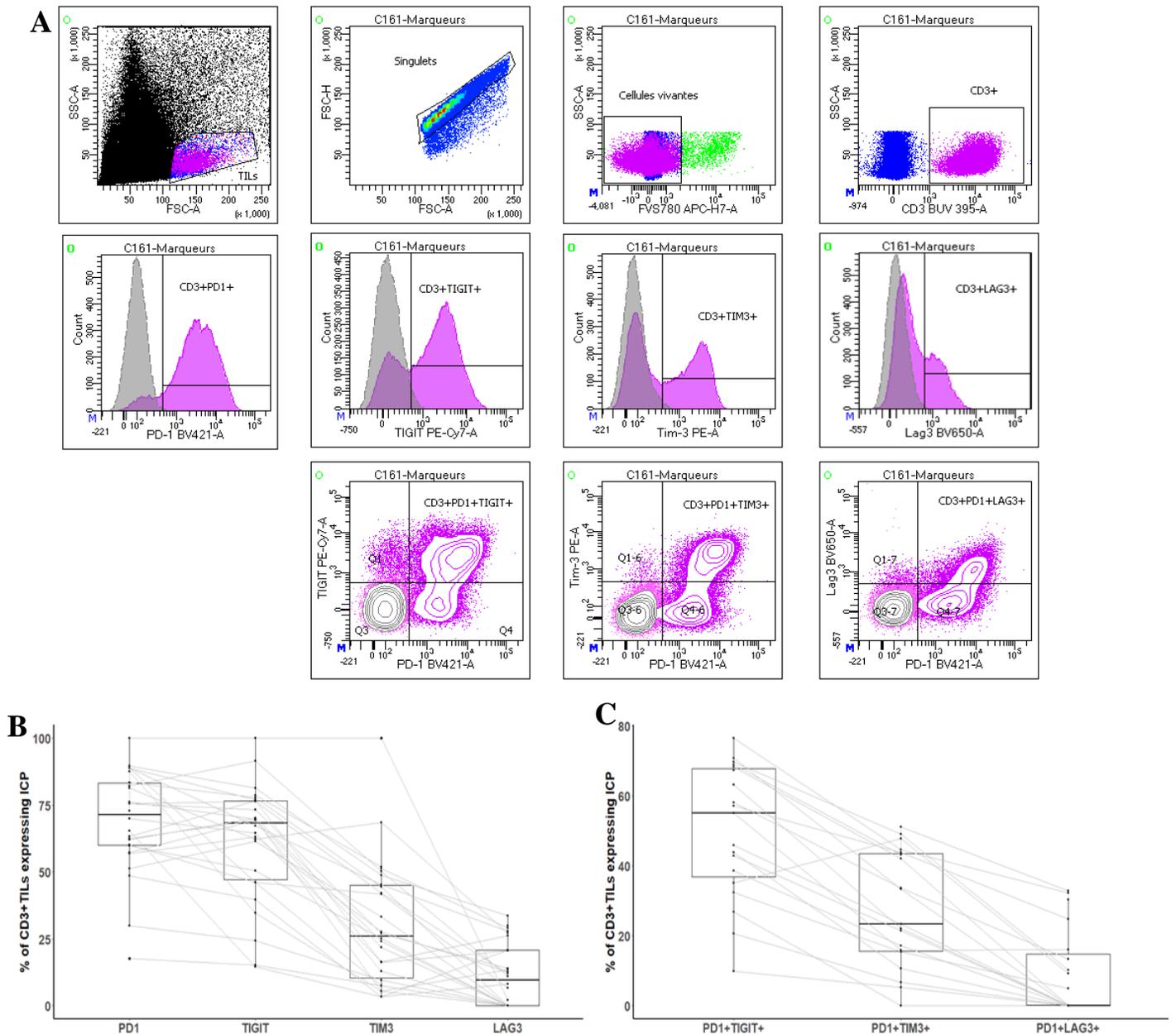


Figure 26. Profil d'expression des principaux ICP (PD1, TIGIT, TIM3 et LAG3) sur TILs *ex vivo* isolés de CCR. A- Exemple représentatif de la stratégie de sélection des TILs CD3+ (panel du haut) positifs pour l'un des ICP (panel du milieu) ou la combinaison entre PD1 et les autres ICP (panel du bas). Les histogrammes et/ou contours plots de couleur grise représentent le contrôle isotypique. B- Pourcentage des TILs CD3+ exprimant l'un des ICP (n=26) ; C- Pourcentage des TILs CD3+ co-exprimant PD1 et les autres ICP (TIGIT, TIM3, LAG3).

## Objectifs et résumé de l'article 2

En physiologie et en physiopathologie intestinale notamment dans les MICI, les cellules épithéliales intestinales sont de véritables cellules sentinelles ayant des fonctions immunomodulatrices sur les cellules immunitaires avoisinantes. Ces cellules épithéliales possèdent un ou des inflammasomes, plateformes de l'immunité innée, dont la protéine effectrice est la caspase-1 qui entraîne la maturation de l'IL-18, cytokine pro-inflammatoire capable de générer une réponse Th1/Tc1. Ainsi, l'axe caspase-1/IL-18 fait le lien entre immunité innée et adaptative. La stimulation de cet inflammasome peut engendrer, en fonction du contexte, une inflammation modérée pouvant protéger la muqueuse ou au contraire une réaction immunitaire exacerbée aboutissant à une inflammation chronique délétère.

Dans les CCR chez l'homme, le statut et le rôle de l'inflammasome des cellules tumorales dans la modulation de la réponse adaptative des TILs sont très mal connus. Notre hypothèse de travail était que les cellules tumorales, si elles conservent un inflammasome fonctionnel, pourraient contribuer à moduler la réponse adaptative des TILs.

Le but de cette deuxième étude était donc de préciser le statut de l'axe caspase-1/IL-18 de l'inflammasome dans les cellules tumorales des CCR et de déterminer son implication potentielle dans la modulation de la réponse Th1/Tc1 des TILs.

Cette étude est basée sur l'exploitation rétrospective d'une cohorte de 192 patients et sur une cohorte prospective de 96 patients issus de la biocollection du CHU de Nantes. L'étude rétrospective a permis une analyse descriptive du statut de l'IL-18 en relation avec la densité en TILs et les caractéristiques clinicopathologiques des CCR. L'étude prospective a permis une analyse fonctionnelle de l'axe caspase-1/IL-18 et de sa modulation de la réponse IFN $\gamma$  en utilisant le modèle de culture d'explants de CCR et des TILs isolés de CCR en vue de leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle. De plus, des études transcriptomiques à haut débit et de protéomique ont été réalisées afin d'identifier des signatures spécifiques en fonction du statut de l'inflammasome des cellules tumorales et de la réponse IFN $\gamma$  dans le but d'isoler différents sous-types de CCR.

Les principaux résultats de ce travail sont les suivants : 1) les cellules tumorales de la majorité des CCR (70%) possèdent un axe caspase-1/IL-18 fonctionnel ; 2) la réponse IFN $\gamma$  des TILs peut être modulée par l'IL-18 en fonction du niveau d'expression des récepteurs à l'IL-18 sur les TILs ; 3) 3 sous-groupes de CCR ont été mis en évidence en fonction de l'axe caspase-1/IL-18/TILs T-bet+/IFN $\gamma$  ainsi qu'un sous-groupe «paradoxal» qui présente une signature transcriptomique particulière.

Cette étude montre que la cellule tumorale des CCR peut moduler la réponse immunitaire des TILs via son inflammasome dans certains sous-groupes de CCR. La voie de l'inflammasome pourrait constituer une cible pour réactiver ou stimuler une réponse immunitaire adaptative dans les CCR.

Cette étude, dans laquelle je suis premier auteur, sera publiée dans la revue *Cancers* (Basel) en 2021.

Article

# The Caspase-1/IL-18 Axis of the Inflammasome in Tumor Cells: A Modulator of the Th1/Tc1 Response of Tumor-Infiltrating T Lymphocytes in Colorectal Cancer

Linda Bilonda Mutala <sup>1,2,3</sup>, Cécile Deleine <sup>2,3</sup>, Matilde Karakachoff <sup>4</sup>, Delphine Dansette <sup>5</sup>, Kathleen Ducoin <sup>2,3</sup>, Romain Oger <sup>2,3</sup>, Olivia Rousseau <sup>4</sup>, Juliette Podevin <sup>6</sup>, Emilie Duchalais <sup>6</sup>, Pierre Fourquier <sup>7</sup>, Wassila El Alami Thomas <sup>8</sup>, Pierre-Antoine Gourraud <sup>4</sup>, Jaafar Bennouna <sup>9</sup>, Camille Brochier <sup>1</sup>, Nadine Gervois <sup>2,3</sup>, Céline Bossard <sup>2,3,5</sup> and Anne Jarry <sup>2,3,\*</sup>

**Citation:** Mutala, L.B.; Deleine, C.; Karakachoff, M.; Dansette, D.; Ducoin, K.; Oger, R.; Rousseau, O.; Podevin, J.; Duchalais, E.; Fourquier, P.; et al. The Caspase-1/IL-18 Axis of the Inflammasome in Tumor Cells: A Modulator of the Th1/Tc1 Response of Tumor-Infiltrating T Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 189. <https://doi.org/10.3390/cancers13020189>

Received: 30 November 2020

Accepted: 4 January 2021

Published: 7 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Institut Roche, 92100 Boulogne-Billancourt, France; linda.bilonda@univ-nantes.fr (L.B.M.); camille.brochier@roche.com (C.B.)

<sup>2</sup> Inserm, CRCINA, Université de Nantes, 44000 Nantes, France; cecile.deleine@univ-nantes.fr (C.D.); kathleen.ducoin@etu.univ-nantes.fr (K.D.); romain.oger@univ-nantes.fr (R.O.); nadine.gervois@univ-nantes.fr (N.G.); celine.bossard@chu-nantes.fr (C.B.)

<sup>3</sup> LabEx IGO, Université de Nantes, 44000 Nantes, France

<sup>4</sup> Clinique des Données, CHU de Nantes, INSERM, CIC 1413, 44093 Nantes, France; matilde.karakachoff@chu-nantes.fr (M.K.); Olivia.Rousseau@univ-nantes.fr (O.R.); pierre-antoine.gourraud@univ-nantes.fr (P.-A.G.)

<sup>5</sup> Pathology Department, CHU Nantes, 44093 Nantes, France; delphine.dansette@chd-vendee.fr

<sup>6</sup> Digestive Surgery Department and IMAD, CHU Nantes, 44093 Nantes, France; juliette.podevin@chu-nantes.fr (J.P.); Emilie.DASSONNEVILLE@chu-nantes.fr (E.D.)

<sup>7</sup> Digestive Surgery Department, Hôpital Privé du Confluent, 44200 Nantes, France; dr.fourquier@groupeconfluent.fr

<sup>8</sup> Institut d'Histopathologie, 44104 Nantes, France; welalami@ihp-pathologie.fr

<sup>9</sup> Digestive Oncology Department and IMAD, CHU, 44093 Nantes, France; jaafar.bennouna@chu-nantes.fr

\* Correspondence: anne.jarry@univ-nantes.fr

**Simple Summary:** The evolution of colorectal cancer (CRC) is influenced by complex interactions between tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Optimized immunotherapies to boost the potential anti-tumor T-cell response are still needed in CRC. A good candidate is the inflammasome pathway that bridges innate and adaptive immunity via the caspase-1/interleukin-18 (IL-18) axis, able to elicit a T-helper/cytotoxic (Th1/Tc1) anti-tumor response. This study aimed to determine the status of the caspase-1/IL-18 axis in tumor cells and its potential modulatory role on TILs in CRC. Using cohorts of CRC patients and an ex vivo explant culture model allowing functional and multiparametric approaches, we demonstrate that tumor cells in the majority of CRCs can be considered as innate immune cells that display a functional caspase-1/IL-18 axis able to modulate the adaptive Th1/Tc1 anti-tumor response of TILs. Furthermore, the identification of three distinct subgroups of CRC will provide a rationale for future strategies targeting the inflammasome pathway in CRC.

**Abstract:** In colorectal cancer (CRC), a high density of T lymphocytes represents a strong prognostic marker in subtypes of CRC. Optimized immunotherapy strategies to boost this T-cell response are still needed. A good candidate is the inflammasome pathway, an emerging player in cancer immunology that bridges innate and adaptive immunity. Its effector protein caspase-1 matures IL-18 that can promote a T-helper/cytotoxic (Th1/Tc1) response. It is still unknown whether tumor cells from CRC possess a functional caspase-1/IL-18 axis that could modulate the Th1/Tc1 response. We used two independent cohorts of CRC patients to assess IL-18 and caspase-1 expression by tumor cells in relation to the density of TILs and the microsatellite status of CRC. Functional and multiparametric approaches at the protein and mRNA levels were performed on an ex vivo CRC explant culture model. We show that, in the majority of CRCs, tumor cells display an activated and

functional caspase-1/IL-18 axis that contributes to drive a Th1/Tc1 response elicited by TILs expressing IL-18R $\alpha$ . Furthermore, unsupervised clustering identified three clusters of CRCs according to the caspase-1/IL-18/TIL density/interferon gamma (IFN $\gamma$ ) axis and microsatellite status. Together, our results strongly suggest that targeting the caspase-1/IL-18 axis can improve the anti-tumor immune response in subgroups of CRC.

**Keywords:** colorectal cancer; inflammasome; caspase-1/IL-18 axis; tumor-infiltrating T lymphocytes (TILs); Th1/Tc1 (IFN $\gamma$ ) response; ex vivo explant culture

## 1. Introduction

The evolution of many solid tumors including colorectal cancer (CRC) is influenced by intricate and complex interactions between tumor and immune cells of the tumor microenvironment, depending on many different intrinsic factors including tissue-specific factors and genetic abnormalities of the tumor. These interactions lead to the development of a local immune response that can have immunosuppressive or immunostimulatory properties. Combining therapeutic strategies that can inhibit immunosuppression while activating tumor-specific T lymphocytes able to kill tumor cells currently represents the most promising therapeutic approach. In CRC, a high density of effector memory and cytotoxic tumor-infiltrating T lymphocytes (TILs) is positively correlated with a favorable prognosis [1–4]. In microsatellite instable (MSI) CRC, which accounts for 15% of all CRCs (as compared to microsatellite stable (MSS) CRC), recent evidence has shown the major role of a T-helper/cytotoxic (Th1/Tc1) gene signature in CRC immune surveillance, caused by frameshift and missense mutations leading to the formation of immunogenic neoepitopes and to an anti-tumor immune response [5,6]. In addition, we recently demonstrated that a preexisting in situ Th1/Tc1 immune response—identified by the expression of the transcription factor T-box expressed in T cells (Tbet)—positively impacted prognosis in MSI as well as in MSS CRC [7]. This anti-tumor immune response can be counterbalanced by inhibitory signaling pathways including immune checkpoint receptors (ICPs), and their ligands such as the programmed death receptor-1 (PD-1) or cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) pathways [7,8], that can be blocked by specific antibodies defined as immune checkpoint inhibitors (ICIs). However, treatment with ICIs only leads to objective and durable responses in 30% to 50% of metastatic MSI CRC cases (mono-or combotherapy) and to a very low response rate in MSS CRC [9–11].

In this context, a better understanding of the immune contexture and of its modulation by tumor cells can lead to new therapeutic combinations in CRC, especially in MSS CRC. Approaches targeting some agents or signaling pathways bridging innate and adaptive immunity may expand the number of immunotherapy strategies able to restore or boost anti-tumor T cell responses. Among those, inflammasomes have recently emerged as players in cancer immunology and immunotherapy [12,13].

Inflammasomes, major components of innate immunity, are large multiprotein complexes that regulate the activation of the effector protein, caspase-1, expressed as an inactive precursor. Upon activation by pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, respectively), active caspase-1 cleaves several substrates including gasdermin D (GSDMD), pro-IL1 $\beta$ , and pro-IL-18 [14–17]. IL-18, originally termed IFN $\gamma$ -inducing factor [18], is considered as a Th1-promoting cytokine since it elicits IFN $\gamma$  production by T cells, which favors the generation and maintenance of a beneficial inflammatory microenvironment around tumor cells, with potential anti-tumor properties. However, IL-18 has been reported to have both anti-cancer and pro-cancer properties, depending on the organ studied and on the tumor environment. The mechanisms underlying these opposite effects are not yet clearly understood [12]. Besides being produced by immune cells including antigen presenting cells, IL-18 is expressed by

epithelial cells and by cancer cells of some solid tumors such as melanoma, lung cancer, prostate, and colon cancer [19–22]. In lung cancer, IL-18 contributes to the expansion of CD8<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> TILs that express IL-18 receptors and produce IFN $\gamma$  within the tumor microenvironment [21]. Several sensors or regulators of inflammasomes, mainly studied in mouse models, have been reported to be expressed in cancer and to play distinct and sometimes opposite roles across tumor types, ranging from tumor promotion to tumor suppression [23]. Furthermore, the relative expression of inflammasome components may differ according to cell types, suggesting that they could exhibit distinct functions in different cell compartments depending on tissue-specific factors [23].

In the normal human colon, epithelial cells display both innate immune functions and immunomodulatory functions, essential for the maintenance of gut homeostasis. They constitutively express pro-IL-18 and pro-caspase-1 that can be rapidly activated upon stimulation by various bacterial or pro-inflammatory stimuli priming the inflammasome pathway and generating a mucosal Th1 (IFN $\gamma$ ) response, a driver of epithelial barrier disruption [24–26]. However, it is not known whether colonic cancer cells retain a functional caspase-1/IL18 pathway that could be activated and able to modulate the Th1/Tc1 response of TILs.

In this study, we used two independent cohorts of CRC patients to assess IL-18 expression and caspase-1 activation profiles in tumor cells and studied their relationship with TILs density and microsatellite status. In addition, functional and multiparametric approaches, at the protein and mRNA levels, were performed both on an ex vivo 3D model of CRC explant cultures that maintained cellular interactions able to build innate/adaptive immune responses (previously validated as a good preclinical model [7]), and on TILs isolated from CRC primary tumors.

## 2. Results

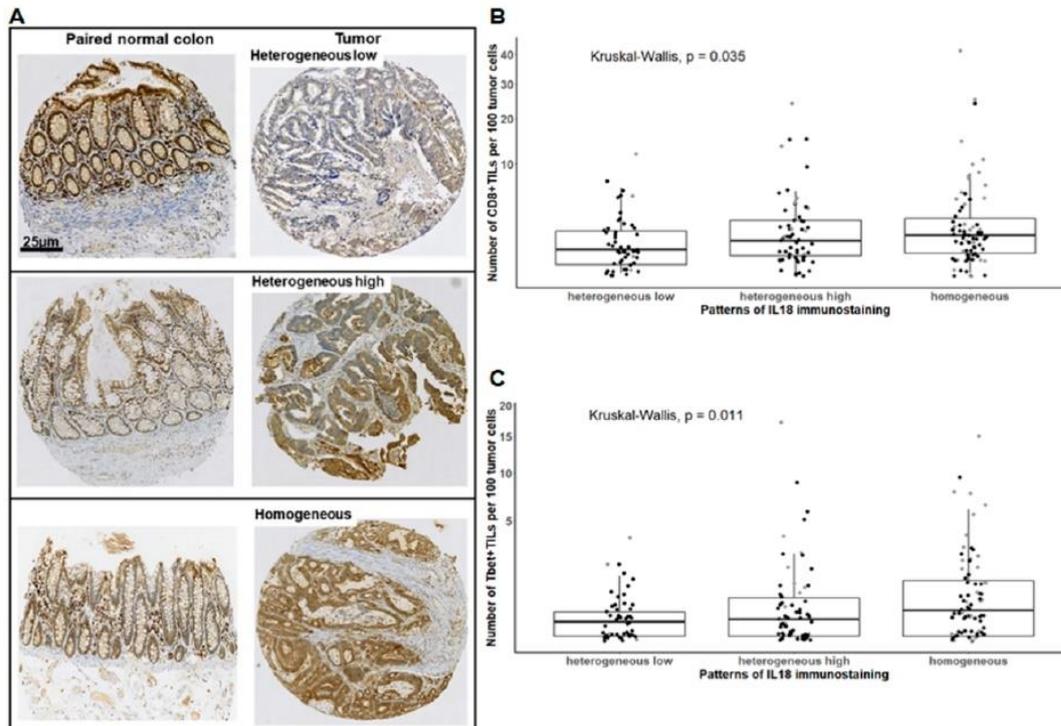
### 2.1. IL-18 Is Expressed by Tumor Cells in the Majority of CRCs and Correlates with the Density of Tbet<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> Intraepithelial TILs

In the retrospective cohort of CRCs ( $n = 192$ ), we first assessed the IL-18 immunostaining pattern using an antibody that detects both the proform and mature form of IL-18. In the normal colonic mucosa all epithelial cells highly expressed IL-18 throughout the colonic crypts (Figure 1A, left panel). The expression profile in tumor cells was compared to that of epithelial cells from paired normal colonic mucosa in terms of staining intensity and percentage of positive cells.

We identified three expression patterns of IL-18 in tumor cells. The “heterogeneous low” pattern included CRC with an IL-18 staining intensity lower in tumor cells than in the paired normal epithelial cells (10/192 = 5%) and CRC with an IL-18 staining intensity equal to that of paired normal epithelial cells in 10–49% of tumor cells (43/192 = 22%) (Figure 1A, upper panel). The other patterns were composed of CRCs with a staining intensity equal or higher than that of normal epithelial cells in 50–80% of tumor cells (“heterogeneous high”) (61/192 = 32) (Figure 1A, middle panel) or in 100% of tumor cells (“homogeneous”) (78/192 = 41%) (Figure 1A, lower panel). Thus, IL-18 was found to be highly expressed in tumor cells in 72% of CRCs. When considering the microsatellite status, 91% of MSI CRCs and 67% of MSS CRCs were found to express the highest percentage of IL-18-positive tumor cells. As IL-18 is known as a driver of the Th1/Tc1 response, we assessed intraepithelial Tbet<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> TIL densities in relation to IL-18 expression in tumor cells. As shown in Figure 1B,C, CRCs with a “homogeneous” or “heterogeneous high” expression pattern of IL-18 were enriched in intraepithelial CD8<sup>+</sup> and Tbet<sup>+</sup> TILs compared to the “heterogeneous low” IL-18 expression pattern ( $p = 0.03$  and 0.01, respectively).

Thus, these findings show that intracellular IL-18 detected by immunohistochemistry, i.e., mainly the proform, is maintained in tumor cells of most CRCs compared with the normal epithelial cells they derive from. In addition, IL-18

expression in tumor cells is associated with the Th1/Tc1 immune microenvironment, suggesting that IL-18 produced by tumor cells could influence the local immune contexture.



**Figure 1.** The interleukin-18 (IL-18) immunostaining pattern in tumor cells correlates with the density of CD8<sup>+</sup> or Tbet<sup>+</sup> intraepithelial tumor-infiltrating T lymphocytes (IEL-TILs) in colorectal cancer (CRC). (A) Representative examples of the IL-18 immunostaining pattern in tumor cells compared to paired normal epithelial cells, determined as mentioned in Materials and Methods. (B,C) Density of CD8<sup>+</sup> or Tbet<sup>+</sup> IEL-TILs according to IL-18 immunostaining pattern. Each dot represents the mean of triplicate counts for a given CRC. The square root function (sqrt) was used to transform Y axis values in order to visualize small value distributions. Black dots: Microsatellite stable (MSS) CRC; grey dots: microsatellite instable (MSI) CRC. Kruskal–Wallis test.

### 2.2. Active Caspase-1 Is Present in Tumor Cells in 70% of CRCs, and Positively Correlates with Up-Regulation of Inflammasome Sensors and Mature IL-18 Levels Secreted in Explant Cultures of CRC

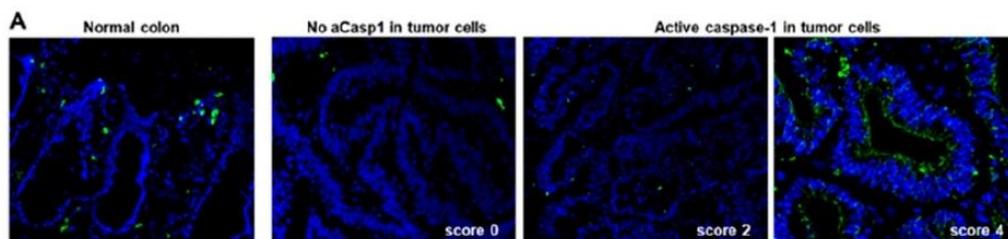
In order to assess whether pro-IL-18 expressed by tumor cells can be processed and secreted as a mature form, we first assessed the expression of active caspase-1, essential for the processing of IL-18. To this end, we used fresh tumor tissues from our prospective cohort of CRC patients ( $n = 96$ ). Caspase-1 activity (“active caspase-1”) was detected in situ on unfixed frozen sections of the tumor in all cases of CRC ( $n = 96$ ) and in the paired normal colonic mucosa at distance from the tumor as a control ( $n = 10$ ), using the fluorescent inhibitor probe FAM-YVAD-FMK (FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspases) assay) that binds to the active form of caspase-1. A semi-quantitative assessment of the percentage of tumor cells with active caspase-1 was performed (scores 0 to 4, see Materials and Methods section). As shown in Figure 2A, in the normal colonic mucosa, epithelial cells did not display active caspase-1; only a few subepithelial macrophages scored positive.

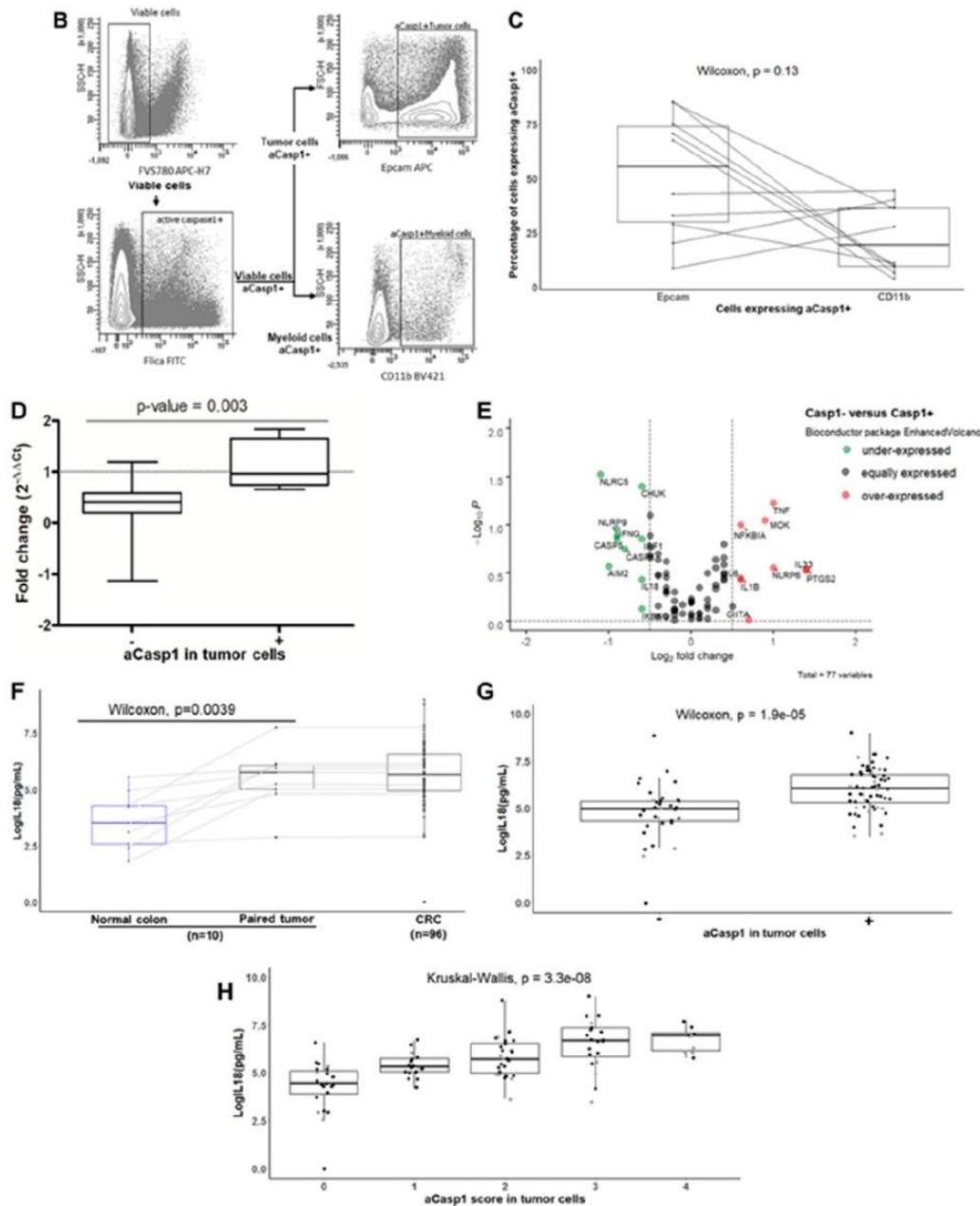
Considering the status of active caspase-1 (aCasp1) in tumor cells, two subgroups of CRC appeared. A minor group representing 30% (32/96) of CRCs, mainly MSS CRCs and

only five MSI CRCs (i.e., 20% of MSI), displayed no or very low levels of active caspase-1 in tumor cells (<10% positive tumor cells, score 0–1) (Figure 2A). By contrast, active caspase-1 was detected in tumor cells in 70% (64/96) of CRCs, both MSS and the majority of MSI CRCs ( $n = 17$ , i.e., 80% of MSI CRCs). Active caspase-1 was located at the plasma membrane and/or in the cytoplasm (Figure 2A). In those aCasp1<sup>+</sup> CRCs, the percentages of aCasp1<sup>+</sup> tumor cells varied among CRCs from 10% to 70% aCasp1<sup>+</sup> cells within tumor glands, with the following distribution—score 2 (10–30% positive cells): 35 cases; score 3 (30–50% positive cells): 20 cases; score 4 (50–70% positive cells): 9 cases.

In all CRCs, a few macrophages, located in the peritumoral areas and at the tumor invasive front, also expressed active caspase-1. To obtain a more quantitative assessment of aCasp1<sup>+</sup> cells in the tumor microenvironment, we set up a multicolor flow cytometry panel combining a viability marker, caspase-1 FLICA assay, Epcam (for tumor cells), and CD11b (for myeloid cells) on cell suspensions obtained just after mechanical dissociation of fresh tumor fragments *ex vivo* ( $n = 10$ ). The flow cytometry gating strategy is shown in Figure 2B, based on a representative case of CRC. Expression of active caspase-1 was observed predominantly in the Epcam<sup>+</sup> tumor cells and at a much lower level in the CD11b<sup>+</sup> myeloid cells in most of the cases studied (Figure 2B,C). Altogether, our results show that, contrary to the normal colonic mucosa, the majority of CRCs (70%) expressed active caspase-1, predominantly in tumor cells.

In order to assess whether the absence of active caspase-1 in some CRCs could be associated with changes in caspase-1 mRNA levels as previously reported [27], we assessed the relative expression of caspase-1 mRNA by qRT-PCR, in the tumor and paired normal colon in the two subgroups, aCasp1<sup>+</sup> ( $n = 8$ ) and aCasp1<sup>-</sup> ( $n = 8$ ). As shown in Figure 2D, the caspase-1 mRNA level was significantly down-regulated in aCasp1<sup>-</sup> CRC compared with aCasp1<sup>+</sup> CRC. To precisely obtain the whole inflammasome profile depending on the active caspase-1 status of CRC, we used the human inflammasome “RT<sup>2</sup> profiler PCR array” to screen genes upstream and downstream of caspase-1 in the two CRC subgroups, aCasp1<sup>-</sup> versus aCasp1<sup>+</sup>. Among the 84 genes screened, 7 genes were not detected, 58 were equally expressed in the two subgroups, 10 were under-expressed, and 9 were over-expressed in aCasp1<sup>-</sup> versus aCasp1<sup>+</sup> CRC. Consistently, under-expressed genes in aCasp1<sup>-</sup> CRC subgroup included caspase-1, IL-18, and IFN $\gamma$  (Figure 2E). Moreover, and interestingly, among inflammasome sensors, *AIM2*, *NLRP9*, and *NLRC5* were under-expressed in aCasp1<sup>-</sup> CRC subgroup, whereas *NLRP6* was over-expressed (Figure 2E).





**Figure 2.** The presence of active caspase-1 (aCasp1) in tumor cells correlates with mature IL-18 levels secreted in explant cultures of CRC. (A) In situ detection of caspase-1 activity by the Figure 1. (membrane and cytoplasmic staining). Nuclei are stained with Dapi (blue). (B,C) Flow cytometry detection of caspase-1 activity on fresh CRC samples, ex vivo after mechanical dissociation, in Epcam+ tumor cells and CD11b+ myeloid cells. Gating strategy of a representative case (B); the histogram (C) shows the percentages of Epcam+ and CD11b+ cells expressing active caspase-1 ( $n = 10$ ). (D) qPCR analysis of Caspase-1 mRNA levels in aCasp1<sup>-</sup> ( $n = 8$ ) versus aCasp1<sup>+</sup> ( $n = 8$ ) CRC relative to paired normal colon and normalized to S6. (E) Volcano plot of differentially expressed mRNA of inflammasome components using RT<sup>2</sup> profiler qPCR array, in aCasp1<sup>-</sup> ( $n = 8$ ) versus aCasp1<sup>+</sup> ( $n = 8$ ) CRC. (F–H) Mature IL-18 secretion assessed by ELISA in the supernatants of 24-h explant cultures. Each dot represents the mean of triplicate cultures. Black dots: MSS CRC; grey dots: MSI CRC. Wilcoxon paired test (F) or unpaired test (D,G); Kruskal–Wallis test (H).

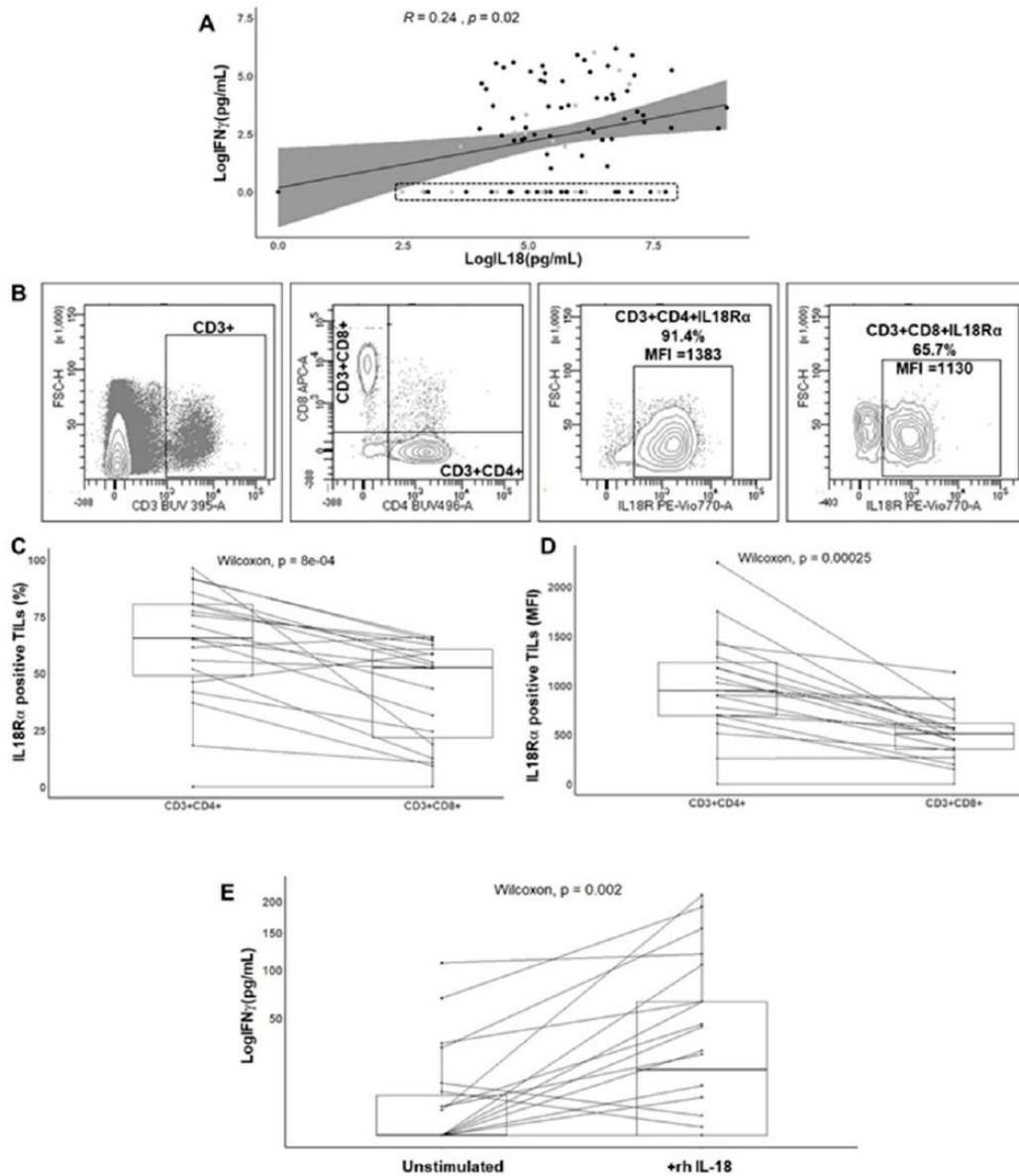
In order to verify whether the activation of caspase-1 in tumor cells was associated with secretion of mature IL-18, we assessed the link between the expression of aCasp1 in tumor cells and the levels of mature IL-18 released in culture supernatants of CRC explant cultures. Firstly, the level of IL-18 secreted in the tumor supernatants was compared with that measured in the supernatants of paired normal colonic mucosa ( $n = 10$  cases). We found that the level of secreted IL-18 was significantly higher in the tumor than in paired normal colon (Figure 2F). When considering all cases of CRC ( $n = 96$ ), we found that the level of IL-18 released in tumor explant cultures was heterogeneous among CRCs (Figure 2F) and correlated with the status of aCasp1 in tumor cells. Indeed, the level of IL-18 secreted was significantly higher in CRCs with aCasp1<sup>+</sup> tumor cells than in those with aCasp1<sup>-</sup> tumor cells (Figure 2G). In addition, a significant association was observed between IL-18 levels and the percentages of aCasp1<sup>+</sup> tumor cells, irrespective of the microsatellite status of CRC (Figure 2H).

Altogether, our results demonstrate the presence of a “functional” inflammasome in tumor cells in the majority of CRCs (70%). However, unlike normal colonic epithelial cells they derive from, a variable proportion of tumor cells per tumor exhibits an aberrantly activated inflammasome (expression of active caspase-1 and release of mature IL-18), irrespective of the microsatellite status. Taking into account the association between IL-18 levels in tumor cells and the density of Th1/Tc1 TILs, our working hypothesis is that this “activated functional inflammasome” of tumor cells can facilitate the IFN $\gamma$  response of TILs in CRC.

### 2.3. Relationship between Mature IL-18 and IFN $\gamma$ Released in Ex Vivo Explant Cultures, and Effect of Recombinant Human IL-18 (rhIL18) on Isolated TILs That Express High Levels of IL-18R $\alpha$

To test this hypothesis, we first assessed the relation between mature IL-18 and IFN $\gamma$  levels in the supernatants of CRC explant cultures ( $n = 96$ ) by ELISA. As shown in Figure 3A, a significant association was found between IL-18 levels and the IFN $\gamma$  response ( $p = 0.02$ ). However, the IFN $\gamma$  response was quite heterogeneous among patients, and two subgroups of CRC were isolated depending on the IFN $\gamma$  levels. We found an expected subgroup with high IL-18 levels and moderate to high IFN $\gamma$  levels ( $n = 63/96$  (65%); 52 MSS (70%) and 11 MSI (50%)) and an unexpected subgroup featuring no IFN $\gamma$  response (undetectable levels in triplicate cultures) despite moderate to high IL-18 levels ( $n = 33/96$  (34%); 22 MSS (30%) and 11 MSI (50%)).

Then, we assessed the effect of recombinant human IL18 (rhIL-18) on the IFN $\gamma$  response of TILs isolated from CRCs ( $n = 19$ ), since IL-18 is known to stimulate IFN $\gamma$  production [16]. We first measured the expression level of IL-18 receptors (IL-18R $\alpha$ ) on the CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> subsets ex vivo from cell suspensions obtained just after mechanical dissociation of fresh tumor fragments ( $n = 19$ ; 11 MSS and 8 MSI CRCs). Flow cytometry gating strategy is shown in Figure 3B based on a representative case of CRC. In all cases except one, TILs expressed IL-18R $\alpha$  in a variable and often high proportion and with a high MFI in most cases. In addition, the IL-18R $\alpha$  level was higher in the CD4<sup>+</sup> subset as compared to the CD8<sup>+</sup> subset for a given CRC, both in terms of frequency and median fluorescence intensity (MFI) (Figure 3C,D). Finally, the frequency of IL-18R $\alpha$  on TILs was not statistically different in MSS compared with MSI CRC. Finally, to test whether stimulation of IL-18 receptors could induce IFN $\gamma$  production by TILs, we added rhIL-18 to the media of TILs expanded in culture from tumor fragments for 20 days ( $n = 20$ ). While expanding TILs from tumor fragments, the IL-18R $\alpha$  expression was maintained and stable. As shown in Figure 3E, a 24-h treatment of TILs with rhIL-18 (50 ng/mL) led to a significant increase in the baseline IFN $\gamma$  level measured by ELISA ( $p = 0.002$ ). In addition, the IFN $\gamma$  fold increase was related to the IL-18R $\alpha$  expression level assessed by flow cytometry.



**Figure 3.** Relationship between IL-18 and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) levels released in explant cultures and effect of recombinant human IL-18 (rhIL-18) on isolated TILs from CRCs expressing IL-18 receptor (IL-18R $\alpha$ ). (A) Correlation between the IFN $\gamma$  response of TILs and mature IL-18 released in the CRC explant culture supernatants ( $n = 96$ ). Spearman correlation test. Each dot represents the mean value of triplicate cultures. The dotted rectangle highlights IFN $\gamma$ <sup>-</sup> CRC ( $n = 33$ ). (B) Expression of IL-18R $\alpha$  by flow cytometry on TILs ex vivo. Gating strategy on a representative case. (C,D) Percentage and median fluorescent intensity (MFI) of IL-18R $\alpha$  on CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILs isolated from CRC ( $n = 19$ ). Wilcoxon paired test. (E) Effect of rhIL-18 (50 ng/mL, 24 h) on the IFN $\gamma$  response of TILs cell lines from CRC ( $n = 20$ ). Each dot represents the mean of triplicate cultures of TILs. The square root function (sqrt) was used to transform Y axis values in order to visualize small value distributions. Wilcoxon paired test.

Thus, our findings show that the majority of CRC exhibits an activated functional caspase-1/IL-18 axis in tumor cells, and that IL-18 is able to modulate the IFN $\gamma$  response of TILs in vitro. However, one-third of CRCs, despite expressing an activated functional

inflammasome and being infiltrated by Th1/Tc1 TILs, did not respond to IL-18 in terms of IFN $\gamma$  secretion based on ex vivo explant cultures. These findings strongly suggest the existence of subgroups of CRC according to the entire caspase-1/IL-18-IFN $\gamma$  axis and microsatellite status.

#### 2.4. Identification of Subgroups of CRC according to the Caspase-1/IL-18/TIL Density/IFN $\gamma$ Axis and Microsatellite Status

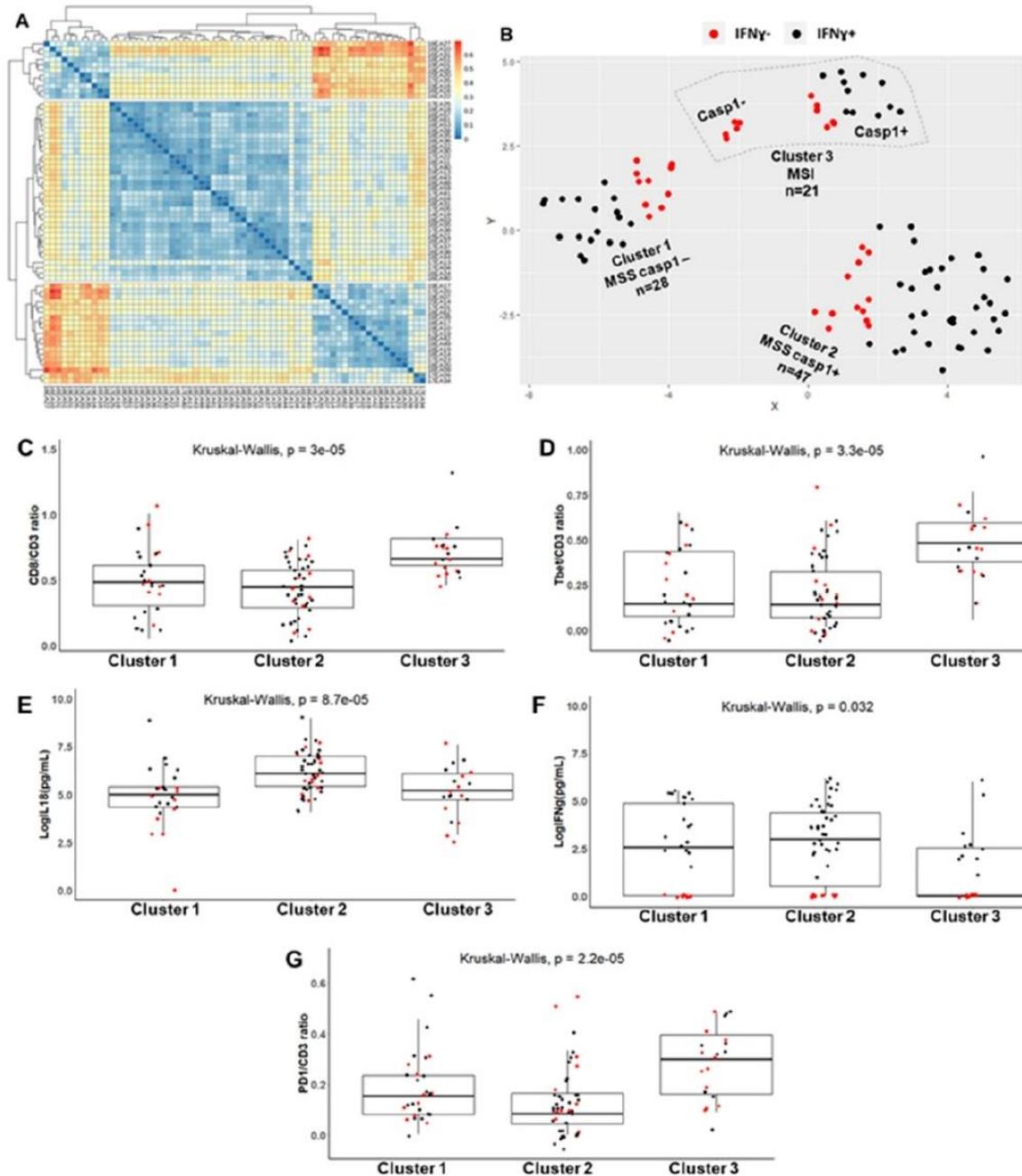
We performed a non-hierarchical cluster analysis, in order to stratify the CRC patients according to the entire axis caspase-1/IL-18/TILs density/IFN $\gamma$  axis, and to their microsatellite status. First, we used the Gower metric to assess the similarity/dissimilarity between CRCs according to the following mixed variables (both categorical and numerical): microsatellite status (MSS, MSI), aCasp1 status in tumor cells (present (+) or not (-)), levels of mature IL-18 and of IFN $\gamma$  secreted in explant cultures, and density of TILs (CD8/CD3, Tbet/CD3, PD1/CD3 ratios).

Figure 4A shows the heatmap representing the similarity/dissimilarity matrix that allowed for the assessment of cluster tendency. Subsequently, a non-hierarchical cluster analysis was performed using partitioning around medoids (PAM), and silhouette analysis was used to choose the optimal number of clusters, i.e., three clusters. *t*-distributed stochastic neighbor embedding (*t*-SNE) two-dimensional projection was used to plot the different clusters. Figure 4B shows the three different clusters: cluster 1, featuring an MSS phenotype with aCasp1<sup>-</sup> tumor cells ( $n = 28$ ; 29%); cluster 2, featuring an MSS phenotype with aCasp1<sup>+</sup> tumor cells ( $n = 47$ ; 49%), and cluster 3, featuring mainly an MSI phenotype with aCasp1<sup>+</sup> tumor cells ( $n = 16$ ; 17%) and only five MSI cases with aCasp1<sup>-</sup>. The CRCs without IFN $\gamma$  response (IFN $\gamma$ <sup>-</sup> red dots on Figure 4B) were more common in cluster 1 (36%, MSS aCasp1<sup>-</sup>) and cluster 3 (50%, MSI), than in cluster 2 (25%, MSS aCasp1<sup>+</sup>). Similar results were obtained using hierarchical clustering (Figure S1).

When examining the numerical variables among clusters, a significantly higher density in CD8<sup>+</sup> or Tbet<sup>+</sup> TILs was observed in cluster 3 (MSI) as compared with clusters 1 and 2 (MSS), as expected (Figure 4C,D). In addition, the levels of mature IL-18 were significantly higher in cluster 2 (MSS with active caspase-1) than in clusters 1 and 3 (MSS, no active caspase-1 and MSI) (Figure 4G). IFN $\gamma$  levels were the lowest in cluster 3 despite the presence of active caspase-1 in tumor cells and high IL-18 levels (Figure 4F). One possible explanation for this finding would be the high density of PD1<sup>+</sup> TILs in cluster 3 (Figure 4E).

The Consensus Molecular Subtypes (CMS) classification could be determined in 39 CRCs (11 CRCs in cluster 1, 20 in cluster 2, and 8 in cluster 3) using 3'-Seq Illumina. As shown in Figure S2 and as expected, CRCs of cluster 3 (MSI CRC) belonged to the CMS1 subgroup. CRCs of cluster 1 and 2 (MSS aCasp1<sup>-</sup> or aCasp1<sup>+</sup>, respectively) both belonged mostly to the CMS2 subgroup.

Altogether, this study (1) identifies several clusters of CRCs according to the caspase-1/IL-18/TIL density/IFN $\gamma$  axis, and microsatellite status, and (2) points out a "paradoxical" subgroup (34% of CRCs) present in all clusters, mostly in clusters 1 and 3, that does not display an IFN $\gamma$  response despite the moderate to high levels of mature IL-18.



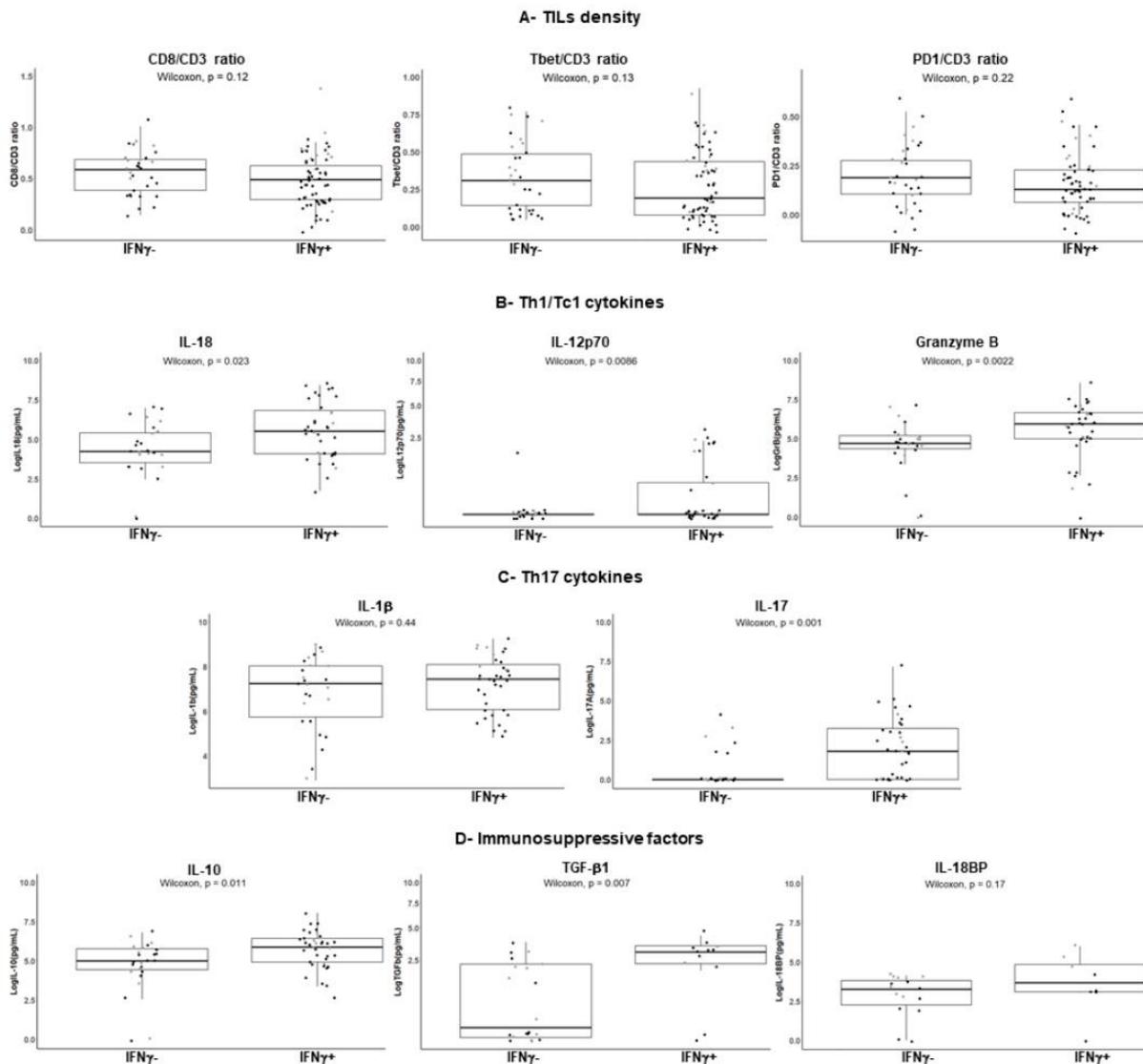
**Figure 4.** Identification of CRC clusters according to the caspase-1/IL-18/TIL density/IFN $\gamma$  axis and microsatellite status. (A) Heatmap on the dissimilarity matrix based on the Gower metric. (B) Cluster visualization using a lower dimensional space with *t*-distributed stochastic neighborhood embedding (*t*-SNE). (C–G) Numerical variables distribution in the three CRC clusters: TIL density (C,D,G); IFN $\gamma$  and IL-18 levels assessed by ELISA in CRC explant cultures (E,F). Each dot represents the mean value of triplicate explant cultures or TIL counts. Black dots: CRC with IFN $\gamma$  response (IFN $\gamma$ ); red dots: CRC without IFN $\gamma$  response (IFN $\gamma$ -).

### 2.5. Distinctive Features of the IFN $\gamma^+$ and IFN $\gamma^-$ Subgroups

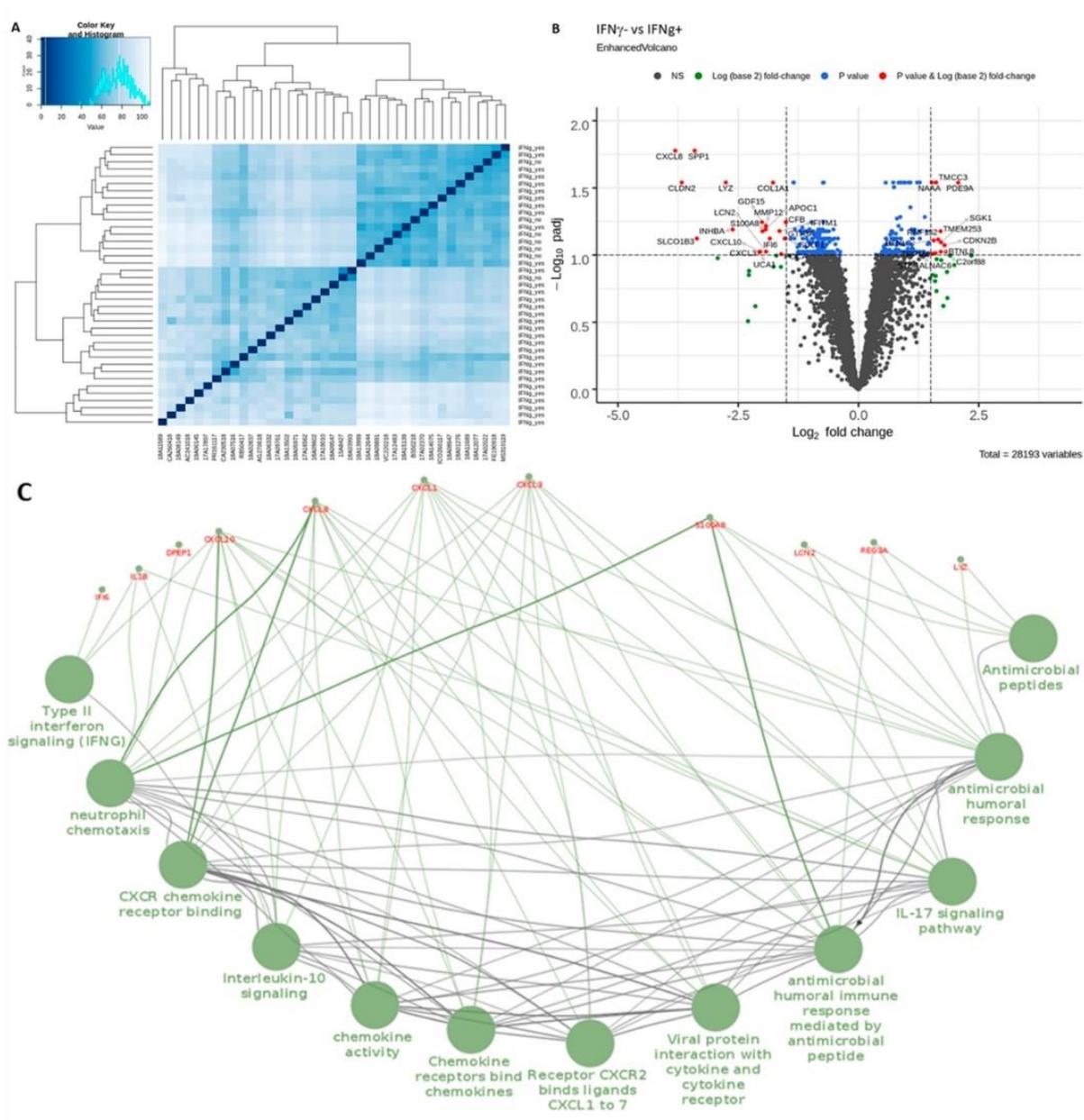
We further investigated the potential distinct features between the IFN $\gamma^-$  versus IFN $\gamma^+$  subgroups of CRC in terms of TIL density and secreted cytokines, as well as immunomodulatory factors such as PD1, IL-10, and Transforming Growth Factor beta 1 (TGF $\beta$ 1), known to suppress the IFN $\gamma$  response. We first examined the TIL density in the IFN $\gamma^+$  and IFN $\gamma^-$  subgroups of CRC. As shown in Figure 5A (upper panel), there was no significant difference in terms of either the density of CD8 $^+$  or Tbet $^+$  TILs or of TILs expressing the immune checkpoint PD1.

Then, we performed a multiplex bead-based assay (13-plex) for simultaneous detection of Th1/Tc1 cytokines and mediators, as well as Th17 and anti-inflammatory cytokines in the culture supernatants of 62 CRCs for which sufficient amounts of remaining supernatant were available prior the assay ( $n = 26$  IFN $\gamma^-$  CRC and  $n = 36$  IFN $\gamma^+$  CRC). As shown in Figure 5B and as expected, the Th1 cytokine and Tc1 marker granzyme B levels were higher in the IFN $\gamma^+$  compared to the IFN $\gamma^-$  subgroups. With respect to the IFN $\gamma$ -inducing cytokines IL-18 and IL-12p70, levels were higher in the IFN $\gamma^+$  subgroup; IL-12p70 was detectable in only 30% of IFN $\gamma^+$  CRCs. Interestingly, IL-17A, a prototypic Th17 cytokine, was undetectable in most of the IFN $\gamma^-$  subgroup (Figure 5C), suggesting that TILs, although present, were not functional in this subgroup. Therefore, we assessed the anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF $\beta$ 1) that could suppress the IFN $\gamma$  response and found that they were not secreted at higher levels in the IFN $\gamma^-$  subgroup (Figure 5D). Finally, we assessed by ELISA the secretion of IL-18 binding protein (IL-18BP), a natural inhibitor of IL-18, part of a negative feedback loop, that can act as an immunosuppressive molecule [28,29]. As shown in Figure 5D (right), IL-18BP was not overexpressed in the IFN $\gamma^-$  subgroup.

To further explore the features of the IFN $\gamma^-$  subgroup, we performed a transcriptomic analysis of the IFN $\gamma^+$  and IFN $\gamma^-$  CRC using 3'-Seq Illumina of 39 CRC (32 IFN $\gamma^+$  and 7 IFN $\gamma^-$ ). Heatmap of Euclidean sample distances after Log transformation shows a homogeneous IFN $\gamma^-$  subgroup, while the IFN $\gamma^+$  subgroup was heterogeneous (Figure 6A). Figure 6B illustrates the most significant differentially expressed genes after  $p$ -value adjustment using the Benjamini and Hochberg method with at least an absolute log $_2$  fold change of 1.5 (11 upregulated and 21 downregulated genes, based on the adjusted  $p$  value), in the IFN $\gamma^-$  versus IFN $\gamma^+$  subgroup (considering IFN $\gamma^+$  as control group). The IFN $\gamma^-$  subgroup was mainly characterized by downregulated genes such as chemokines (CXCL3, CXCL8, CXCL10) and antimicrobial agents (S100A8, REG3A, LYZ, LCN2) (Figure 6B). We next performed pathway enrichment analysis of downregulated genes in the IFN $\gamma^-$  subgroup since the upregulated genes were not associated with any signaling pathway. To this end, we used ClueGO, a Cytoscape plug-in which is continuously updated, that integrates many biological information from different databases such as Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Reactom, and BioCarta. Those downregulated genes were significantly associated with specific signaling pathways related to innate and adaptive immunity such as anti-microbial peptides, neutrophil chemotaxis and migration, chemokines, IFN $\gamma$  signaling, and IL-17 signaling (Table S1). In order to highlight these enriched pathways, we used ClueGO to visualize an organized network and the functional links between those downregulated genes (Figure 6C). Logically, the IFN $\gamma$  signaling pathway was downregulated in the IFN $\gamma^-$  subgroup, together with the IL-17 and IL-10 signaling pathways, a finding in accordance with our results at the protein level.



**Figure 5.** Features of the IFN $\gamma^-$  and IFN $\gamma^+$  subgroups of CRC. (A), Density of TILs ( $n = 96$ ) according to their IFN $\gamma$  response. Results are expressed as the CD8/CD3 ratio, Tbet/CD3 ratio, or PD1/CD3 ratio after immunohistochemistry on serial sections and counts of total TILs (intra- and peri-tumoral) using Imaris software. Each dot represents the mean value of triplicate counts. Wilcoxon unpaired test. (B–D) (left), Cytokine profiles assessed by a bead-based multiplex immunoassay in explant culture supernatants. IFN $\gamma^+$  ( $n = 36$ ); IFN $\gamma^-$  ( $n = 26$ ). Transforming Growth Factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) ( $n = 32$ ) and IL-18 binding protein (IL-18BP) ( $n = 23$ ) levels were assessed by ELISA (D, middle and right). Each dot represents the mean of duplicate cultures for a given CRC. The square root function (sqrt) was used to transform Y axis values in order to visualize small value distributions (IL-12p70, TGF $\beta$ 1). Wilcoxon unpaired test. Black dots: MSS CRC; grey dots: MSI CRC.



**Figure 6.** Differentially expressed genes (DEGs) between the IFN $\gamma^-$  versus IFN $\gamma^+$  subgroups of CRC (IFN $\gamma^+$  ( $n = 32$ ); IFN $\gamma^-$  ( $n = 7$ )). (A) Heatmap of Euclidean sample distance after rlog transformation using the DESeq2 package. (B) Volcano plot of DEGs using the “EnhancedVolcano” package. (C) Functionally organized network of enriched pathway using ClueGO and Cluepedia plugins.

### 3. Discussion

The main findings of this study, based on a multiparametric approach (both descriptive and functional) using freshly dissociated primary tumors and 3D explant cultures of CRC patients, are multiple. Firstly, in the majority of CRCs (70%), tumor cells maintained a functional but aberrantly activated caspase-1/IL-18 axis compared with paired normal colonic epithelial cells. Secondly, this caspase-1/IL-18 axis was able to modulate the IFN $\gamma$  response of resident Th1/Tc1 TILs. Thirdly, three clusters of CRC were

identified according to the status of their caspase-1/IL-18/TIL density/IFN $\gamma$  axis and microsatellite status. Finally, the existence of a “paradoxical” subgroup of CRC (34% of CRCs) was identified that does not display an IFN $\gamma$  response despite the secretion of mature IL-18 by tumor cells and that features downregulated IL-17, chemokines, and antimicrobial agent gene signatures.

First, in the retrospective cohort of CRC patients, we showed herein that intracellular IL-18 detected by immunohistochemistry, i.e., mainly the proform, was maintained in tumor cells in the majority of CRCs compared to the paired normal colonic epithelial cells they derived from, although at variable levels in terms of number of positive cells within the tumor and staining intensity. Interestingly, in 90% of MSI CRCs and 70% of MSS CRCs, an intense IL-18 immunostaining was observed in more than 50% of tumor cells, which was associated with a higher density of intraepithelial CD8 $^+$  and Tbet $^+$  TIL (IEL-TIL). These findings suggest that IL-18 produced by tumor cells can influence the density of the IEL-TIL infiltrate that we and others previously reported to be higher in MSI and a subgroup of MSS CRCs. In addition, these IEL-TILs positively impact overall survival and progression-free survival in our cohort (not shown), consistently with previous studies in CRC [2,7]. In our study, IL-18 was lost in tumor cells in 5% of CRCs and heterogeneously expressed in 10–40% of tumor cells in about 20% of CRC that did not show any distinct clinicopathological or molecular features. This partial or complete loss of IL-18 protein expression in tumor cells could be accounted for by a decrease or loss of IL-18 transcripts, as suggested by our transcriptional analyses on some CRCs of the prospective cohort and as previously reported [19,22,27]. This loss of mRNA expression levels could result from some polymorphisms in the IL-18 gene, previously described in colon cancer [30] and that have been associated with gastrointestinal cancer risk [31].

One can ask whether IL-18 can be considered as a prognostic factor in CRC, as suggested in a small number of CRC patients [19]. In our study, the expression pattern of pro-IL-18 expression by tumor cells did not significantly influence overall survival in univariate or multivariate analyses (not shown), a finding consistent with a previous study performed *in silico* using cancer gene expression databases [22]. These apparently contradictory results highlight the need to look for the mature biologically active form of IL-18.

The next step was to assess whether tumor cells possessed the enzymatic machinery essential for the cleavage of pro-IL-18 into its mature form, i.e., active caspase-1, which is tightly regulated by the inflammasomes (NLRP or NLRC). We designed an experimental approach on fresh tissues allowing us to assess caspase-1 activity, *in situ* and by flow cytometry using the FLICA assay, in relation with inflammasome-dependent cytokines (IL-18, IFN $\gamma$ ) secreted in the supernatants of *ex vivo* explant cultures of the tumor and with TIL density/phenotype. To our knowledge, our findings are the first to show the presence of two subgroups of CRC: a minor subgroup devoid of active caspase-1 (aCasp1 $^-$ ) in tumor cells (an expression profile close to that of normal colonic epithelial cells), and a major subgroup with aberrantly active caspase-1 in tumor cells (aCasp1 $^+$ ). A minor subgroup of CRCs (30%) (aCasp1 $^-$  in tumor cells), mainly MSS CRCs, secrete “basal” mature IL-18 levels close to those of normal colon explant cultures, released by a few activated aCasp1 $^+$  macrophages. Interestingly, the absence of caspase-1 activity in tumor cells was not only associated with decreased mRNA levels of caspase-1 and downstream cytokines IL-18 and IFN $\gamma$ , but also with upstream inflammasome sensors or regulators, among which NLRC5 is of particular interest. Indeed, NLRC5 has been involved in the formation of a functional inflammasome [32] and more recently in the regulation of adaptive immune responses in several cell types via its role as an MHC class I transactivator [33,34]. Its status in human colon cancer and its role in the modulation of the immune response in CRC are as yet unknown; studies are underway to explore this issue.

In the major subgroup of CRCs (70% of CRCs, 63% of the MSS and 80% of the MSI CRCs), tumor cells exhibited an aberrantly active caspase-1 (compared to paired normal

colonic epithelial cells), which was functional since the percentage of aCasp1<sup>+</sup> tumor cells positively correlated with the amount of mature IL-18 secreted in the supernatants of CRC explant cultures. Noticeably, flow cytometry experiments confirmed that active caspase-1 was present predominantly in Epcam<sup>+</sup> tumor cells and in only a few CD11b<sup>+</sup> myeloid cells.

Together, our findings showed that the presence of an activated caspase-1/IL-18 axis in tumor cells in the majority of CRCs led to the secretion of mature IL-18. At this stage, our working hypothesis was that IL-18, which influences the density of Tbet<sup>+</sup> TILs (our study and [22]), can facilitate the IFN $\gamma$  response elicited by resident Th1/Tc1 TILs. This hypothesis was supported by our demonstration that (1) TILs isolated from CRC, mostly CD4<sup>+</sup> and half of the CD8<sup>+</sup> subset, expressed IL-18 receptors, and (2) IL-18 stimulation significantly improved the basal IFN $\gamma$  production of TILs, an increase correlated with the IL-18R expression level and occurring without T cell receptor (TCR) activation. This hypothesis was also sustained by our findings using ex vivo explant cultures whereby TCR activation could occur via retained cellular interactions in this model, showing a significant association between IL-18 and IFN $\gamma$  levels in 65% of CRCs.

Our clustering analysis identified three clusters of CRCs according to the status of their caspase-1/IL-18/TIL density/IFN $\gamma$  axis and microsatellite status. As expected, MSI CRCs were grouped in a single cluster (cluster 3), and nearly all the cases found in this cluster belonged to the CMS1 subtype of the Consensus Molecular Subtypes (CMS) classification, featuring a “MSI, immune phenotype” [35]. We demonstrate for the first time in this study that this cluster is mostly characterized by aCasp1<sup>+</sup> tumor cells and production of mature IL-18 associated with the highest level of Tbet<sup>+</sup> and PD1<sup>+</sup> TILs, possibly resulting in TIL exhaustion, in accordance with the lowest level of IFN $\gamma$ . Furthermore, the clustering analysis identified two distinct clusters of MSS CRCs (cluster 1 (38% of MSS CRCs) and cluster 2 (62% of MSS CRCs)) that both belong mostly to the CMS2 subtype, without any distinct clinicopathological features. Contrary to the MSI CRC of cluster 3, MSS CRC of clusters 1 and 2 displayed an IFN $\gamma$  response in relation with the presence of Tbet<sup>+</sup> PD1<sup>-</sup> TILs. However, the major differences between cluster 1 and cluster 2 was the tumor cell inflammasome status (aCasp1<sup>-</sup> tumor cells in cluster 1 and aCasp1<sup>+</sup> tumor cells in cluster 2) and the IL-18 level, higher in cluster 2 than in cluster 1. These findings suggest that the baseline IFN $\gamma$  level found in cluster 1 is independent of the caspase-1/IL18 axis and that the activation of the caspase-1/IL18 axis in tumor cells could facilitate the anti-tumor IFN $\gamma$  response. Further studies are needed to explore the stimuli able to activate caspase-1 in tumor cells of CRC. In addition, the 5-year follow-up of patients in our prospective cohort that will soon take place will determine whether a functional caspase-1/IL-18 axis can be a favorable prognostic marker in CRC.

Finally, and unexpectedly, we identified a “paradoxical” subgroup of CRC ( $n = 33/96$  (34%)) that did not display any IFN $\gamma$  response although they produced mature IL-18 and featured aCasp1<sup>+</sup> tumor cells in 50% of cases. We showed that this absence of IFN $\gamma$  response in CRC, regardless of the microsatellite status, could not be accounted for by (1) a significant decrease in CD8<sup>+</sup>, Tbet<sup>+</sup> TIL infiltrate, (2) the absence of IL-18R $\alpha$  expression by those TILs, (3) the overexpression of the immune checkpoint PD1 as well as of other ICPs (personal observation), or (4) an increase in the main immunomodulatory cytokines (IL-10, TGF $\beta$ ) in the tumor microenvironment. Another explanation for the absence of IFN $\gamma$  response in this paradoxical subgroup could be the increased expression of the natural inhibitor of IL-18, the so-called IL-18 binding protein (IL-18BP), that represents a potential mechanism of tumor escape from Th1 responses and is now considered as a new immune checkpoint [28,29]. However, our preliminary results indicate that IL-18BP is not over-secreted in the IFN $\gamma$ <sup>-</sup> versus IFN $\gamma$ <sup>+</sup> subgroup.

This absence of IFN $\gamma$  secretion could also be due (downstream from IL-18R) to epigenetic or post-transcriptional alterations of IFN $\gamma$  such as hypermethylation, as previously reported in solid tumors including CRC [36,37]. Interestingly, in our study, the lack of IFN $\gamma$  response was strongly associated with decreased IL-17A secretion in

accordance with down-regulation of the IL-17 signaling pathway at the transcriptomic level. IL-17 is well known to orchestrate the immune response at sites most exposed to microorganisms [38], such as the colonic mucosa. Besides, this down-regulation of the IL-17 signaling pathway was associated with a significant down-regulation of many genes such as those of chemokines, chemokine receptors, neutrophil chemotaxis and migration, and bacterial/viral immune responses. These are known to be involved in immune surveillance, bridging innate and adaptive immune responses associated with a “hot” tumor phenotype and modulating the inflammasome pathway [39,40]. These findings highlight the crucial role of innate immunity (at least with regard to the tumor cell inflammasome that can be triggered by gut microbiota) in facilitating an effective adaptive anti-tumor immune response. Further studies are needed to more precisely explore the complex interactions between tumor cells and the microbiota in CRC.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Patients

This study included 288 CRC patients from two independent cohorts, a retrospective cohort ( $n = 192$ ) and a prospective one ( $n = 96$ ). All tissues were processed according to the Helsinki Declaration and the guidelines of the French ethics committee for research on human tissues. The institutional board of Nantes University Hospital approved the study. Tissue biocollection was registered with the French Ministry for Higher Education and Research (DC-2014-2206) with approval from the ethic committee (CPP Ouest IV-Nantes). Each patient included in this study signed an informed consent form. Table 1 summarizes the clinicopathological features and microsatellite status of CRC patients, as well as the study design with respect to the two cohorts.

**Table 1.** Clinicopathological features of CRC patients and study design.

	I. Clinicopathological Features of CRC Patients			
	Retrospective Cohort ( $n = 192$ )		Prospective Cohort ( $n = 96$ )	
	MSI ( $n = 43$ )	MSS ( $n = 149$ )	MSI ( $n = 22$ )	MSS ( $n = 74$ )
Age: mean (range)	74 (52–84)	68 (35–85)	74 (34–88)	68 (34–95)
Gender				
Men	15	101	6	42
Women	28	48	16	32
Tumor location				
Right	35	49	18	24
Transverse	5	12	0	0
Left	3	77	4	45
Rectum	0	11	0	5
pTNM stage (UICC)				
0	0	1	0	0
I	2	19	2	9
II	21	41	14	34
III	11	42	4	23
IV	9	46	2	8
Histological subtypes				
Adenocarcinoma				
NOS	22	129	13	61
Mucinous	9	13	7	12
Polymorph	2	4	0	0
Medullary	9	1	1	0
Signet ring cell	1	1	0	0
Serrated	0	1	1	1
	II. Study design			
	Retrospective cohort		Prospective cohort	

	➤ Assessment of caspase-1 activity (FLICA assay) ( <i>n</i> = 96)
	➤ Immunostaining and quantification of Tbet, CD8, CD3, PD1-positive TILs (Imaris software) ( <i>n</i> = 96)
➤ Tissue microarray (TMA)	
➤ Immunostaining: IL-18, Tbet and CD8	➤ Ex vivo explant cultures of CRC and assessment of secreted cytokines (ELISA) ( <i>n</i> = 96)
➤ Semi-quantitative score of IL-18 expression in tumor cells	➤ Effect of rhIL-18 on TIL cell lines generated from CRC ( <i>n</i> = 20)
➤ Quantitative evaluation of TILs (Image J)	➤ Transcriptomic analysis by qPCR ( <i>n</i> = 16) or 3'RNA sequencing Illumina ( <i>n</i> = 39)

pTNM: Pathological Tumor Node Metastasis; UICC: Union for International Cancer Control; NOS: not otherwise specified; IHC: immunohistochemistry; rh: recombinant human.

#### 4.2. Tissue Microarray (TMA) Construction

For the retrospective cohort, TMA construction was performed as previously described [41]. Briefly, three representative areas of tumor and one area of paired normal colonic mucosa per patient were selected from hematoxylin–eosin-stained sections, and the tissue cores (1 mm in diameter) were inserted in a recipient paraffin block.

#### 4.3. Quantitative Immunohistochemistry (IHC)

Here, 3- $\mu$ m paraffin sections of TMA blocks from the retrospective cohort and of a representative tumor block from the prospective cohort were labeled with the following primary antibodies: IL-18 (10  $\mu$ g/mL, polyclonal rabbit antibody, MBL), CD8 (3  $\mu$ g/mL, clone C8/144B, Agilent), Tbet (2  $\mu$ g/mL, clone 4B10, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), CD3 (6  $\mu$ g/mL, polyclonal rabbit antibody, Agilent, Santa Clara, CA, USA), and PD1 (2.5  $\mu$ g/mL, clone NAT105, Abcam, Cambridge, UK) on an automated stainer (AutostainerLink 48, Agilent) according to a standard protocol. The immunological reaction was visualized using Peroxidase/DAB Envision system (Agilent) and sections were counterstained with hematoxylin. After IHC, slides were scanned using a NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

The number of CD8<sup>+</sup> and Tbet<sup>+</sup> intraepithelial-TILs (IEL-TILs) were counted per 100 tumor cells on TMA from the retrospective cohort using the ImageJ software, on the three areas of tumor per patient. Concerning the prospective cohort, we assessed the number of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Tbet<sup>+</sup>, and PD1<sup>+</sup> intraepithelial TILs as well as TILs of the stroma (per 100 tumor cells or stromal cells) using Imaris software. Cell counts were performed on three fields of a section of a given tumor. Results were expressed as the mean of the three counts.

Scoring of IL-18 expression patterns in tumor cells, performed on TMAs of the retrospective cohort, was done on the basis of the staining intensity of tumor cells compared with that of paired normal colonic epithelial cells and of the percentage of positive tumor cells. Three expression patterns were identified: a “heterogeneous low” pattern with a staining intensity lower in tumor cells than in paired normal epithelial cells or equal to that of normal epithelial cells in 10–49% of tumor cells; a “heterogeneous high” pattern with a staining intensity equal or higher than in normal epithelial cells in 50–80% of tumor cells; and a “homogeneous” pattern with a staining intensity equal or higher than in normal epithelial cells in 100% of tumor cells. The TMA sections were scored by two independent observers.

The microsatellite status of CRC was assessed by IHC using anti-MLH1 (clone E505), MSH2 (clone FE11), MSH6 (clone EP49), and PMS2 (clone EP51) antibodies, as previously described [7].

#### 4.4. Active Caspase-1 Detection in Tumor Cells

Active caspase-1 was detected on unfixed frozen (8  $\mu$ m) sections of tumor fragments of the prospective cohort (*n* = 96) and of some paired normal colonic mucosa (*n* = 10), using

the fluorescent inhibitor probe FAM-YVAD-FMK (1:150, 1h at room temperature) that binds specifically to the active form of caspase-1, using the FAM FLICA Caspase-1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, IN, USA). Nuclei were counterstained with Dapi (1:1000); sections were post-fixed with 10% paraformaldehyde, washed twice, and mounted in ProLong Gold Antifade medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Slides were imaged using a confocal microscope (Nikon A1-SIM). A semi-quantitative assessment of the percentage of active caspase-1 positive tumor cells (aCasp1<sup>+</sup>) was performed by two independent observers, on three consecutive fields inside the tumor. The scores were as follows: score 0 (absence of aCasp1 in tumor cells); score 1 ( $\leq 10\%$  aCasp1<sup>+</sup> in tumor cells); score 2 (10–30%); score 3 (30–50%) and score 4 ( $>50\%$  aCasp1<sup>+</sup> in tumor cells).

#### 4.5. *Ex Vivo* CRC Explant Cultures of Prospective Cohort

Three fresh fragments of tumor (30 mg each) per CRC patient of the prospective cohort ( $n = 96$ ) were maintained in culture for 24 h, as previously described [7]. In parallel, in some cases ( $n = 10$ ), three paired normal tissue samples (30 mg) at a distance from the tumor were also cultured for 24 h. The supernatants of all explant cultures were collected, centrifuged, and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further assessment of cytokines (see below).

#### 4.6. Cytokine Assays in the Supernatants of CRC Explant Cultures

The following cytokines were measured by ELISA in the supernatants of 24-h CRC explant cultures: IFN $\gamma$  (Diaclone, Besançon, France), IL-18 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), IL-18BP (Bio-Techne), and TGF $\beta$ 1 (Biolegend, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. In addition, in 62 CRCs, a simultaneous detection of pro- or anti-inflammatory cytokines and cytotoxic factors was performed using a bead-based multiplex immunoassay technique (Custom 13-plex LEGENDplex™ multianalyte flow assay kit, Biolegend). The following cytokines and factors were assessed: IFN $\gamma$ , IL-18, IL-12p70, granzyme B, IL-1 $\beta$ , IL-17A, and IL-10. Data were acquired on a Canto II HTS flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using the Legendplex data analysis software. Results were first expressed as pg/mL and then normalized using the natural log (ln) transformation.

#### 4.7. Generation of TILs Cell Lines, Culture and Treatment with rhIL-18

TILs from 22 CRC patients were obtained after culture of tumor fragments for three weeks in RPMI 1640 medium supplemented with 8% human serum, antibiotics, and 150 U/mL IL-2, as previously described [41]. A weekly check for mycoplasma absence was performed using the HEK-Blue Detection Kit (InvivoGen, San Diego, CA, USA). Then, the obtained TIL cell lines were cultured for 24 h in the presence or absence of recombinant human IL-18 (rhIL-18; B001-5 (MBL, Woburn, MA, USA); 50 ng/mL;  $1 \times 10^6$  cells in 12-well plates) and IFN $\gamma$  secreted in culture supernatants was assessed by ELISA as mentioned above.

#### 4.8. Flow Cytometry Analysis

Fresh tumor tissue was minced with scissors and mechanically dissociated in a non-enzymatic solution using the GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described [41]. To precisely identify the cell types expressing active caspase-1,  $5 \times 10^5$  cells were incubated for 30 min at 37 °C with the fluorescent probe FAM-YVAD-FMK (1:150) in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)/10% fetal Bovine serum (FBS), and washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS)/0.1% Bovine Serum Albumin (BSA). Then the cells were incubated for 30 min at 4 °C in the presence of the viability dye FVS eFluor™ 780 (BD Biosciences), and the following antibodies: Epcam-APC (Biolegend), anti-CD11b-BV421 (BD Biosciences), or the isotype control antibodies. To detect IL-18 receptors on TILs,  $1 \times 10^6$  cells were incubated for 30 min at 4 °C with FVS 780 (BD Biosciences) and the following antibodies: IL-18 $\alpha$  PE-Vio 770 (Miltenyi Biotec), CD3-BUV395 (BD Biosciences), CD4-BUV496 (BD Biosciences), CD8-APC (Biolegend), or the isotype control antibodies. After washing twice with PBS/0.1% BSA, positive cells were acquired in the viable cell gate on a LSR Fortessa  $\times$  20 flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using BD FACS Diva software 8.0.2 version.

#### 4.9. Transcriptomic Analysis

##### 4.9.1. RNA Extraction

Fresh samples of tumor and paired normal colonic mucosa were submerged in RNAlater (RNA stabilization reagent, Qiagen, Hilden, Germany) for 24 h at 4 °C and stored at  $-80$  °C after RNAlater removal. Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) and DNase treatment, according to the manufacturer's procedure, after tissue homogenization with Fastprep-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). RNAs were quantified using a NanodropND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and their quality was assessed using Agilent RNA 6000 Nano kit with a 2100 Bioanalyzer instrument according to the manufacturer's protocol.

##### 4.9.2. Quantitative RT-PCR

cDNA was synthesized using 2  $\mu$ g of total RNA with Maxima H Minus reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). qPCR analysis of caspase-1 (forward primer 5'-GCCCACTGAAAGAGTGA-3'; reverse primer 5'-ITCACTTCTGCCAC AGAC-3') and housekeeping gene S6 (forward primer 5'-GCCCAAAAGAGCTAGCAGA-3'; reverse primer 5'-TAGCCTCCTTCATTCTTGGC-3') was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (Thermo Fisher Scientific) with a Mx3005P real-time PCR System (Agilent Technologies). Thermal cycling was: one step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melting curve analysis was performed with a temperature gradient of 70–95 °C to circumvent potential nonspecific amplification. Relative caspase-1 expression in the tumor and paired normal colon was calculated from duplicate values using the  $\Delta\Delta$ Ct method. Data were first normalized to the housekeeping gene S6 and then caspase-1 mRNA levels in the tumor were expressed relative to those of paired normal colon. The human inflammasome RT<sup>2</sup> profiler PCR array (Qiagen) was used to identify genes of the inflammasome pathway. To this end, 2  $\mu$ g of total RNA from tumor samples of 16 CRC were reverse-transcribed using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) and qPCR was performed using the RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR array data were analyzed using The GeneGlobe Data Analysis Center web portal from Qiagen.

##### 4.9.3. 3'RNA Sequencing

The 3'RNA-seq was performed by the Genomics and Bioinformatics Core Facility (GenoBiRD, SFR Bonamy, Nantes, France) as previously reported [42]. The libraries were prepared from 10 ng of total RNA. The mRNA poly(A) tails were tagged with universal

adapters, well-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcriptase. Barcoded cDNAs from multiple samples were then pooled, amplified and tagged using a transposon-fragmentation approach (Nextera DNA Sample Prep kit, FC-121-1030, Illumina, San Diego, CA, USA) which enriches for 3'ends of cDNA. Size library was controlled on 2200 Tape Station System (Agilent Technologies). A library of 350–800 bp length was run on an Illumina HiSeq 2500 using a HiSeq Rapid SBS Kit v2–50 cycles (ref FC-402-4022) and a HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 (ref PE-402-4002) according to the manufacturer's protocol (Denaturing and Diluting Libraries for the HiSeq® and GAIIx, Part # 15050107 v03 protocol, Illumina). Raw fastq pairs matched the following criteria: the 16 bases of the first read correspond to 6 bases for a designed sample-specific barcode and 10 bases for a unique molecular identifier (UMI). The second read (58 bases) corresponds to the captured poly(A) RNAs sequence. We performed demultiplexing of these fastq pairs in order to generate one single-end fastq for each of the 39 samples. These fastq files were then aligned with Burrow-Wheeler Aligner (BWA) to the reference mRNA refseq sequences and the mitochondrial genomic sequence, both available from the UCSC download site. Gene expression profiles were generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of UMIs associated with each gene. Reads aligned on multiple genes, containing more than three mismatches with the reference sequence, or having a polyA pattern were discarded. Finally, a matrix containing the counts of all genes on all samples was produced. The expression values, corresponding to the absolute abundance of mRNAs in all samples, was then ready for further gene expression analysis. The analysis pipeline is available at <https://bio.tools/3SRP>. The R package DESeq2 [43] was used for differential analysis. Further analysis of pathway gene set enrichment was carried out using ClueGo, a Cytoscape plug-in that integrates Gene Ontology (GO) terms as well as KEGG/BioCarta pathways [44].

#### 4.10. Statistical Analyses

Triplicates of TIL counts (CD3, CD8, Tbet, PD1) and cytokine levels (IL-18, IFN $\gamma$ ) were expressed as mean values after assessment of reproducibility using the estimation of the intraclass correlation coefficient. TIL counts were normalized using ratios to CD3; cytokine levels were normalized using the natural log (ln) transformation. Then, the relation between different parameters (numerical and categorical variables) was assessed using the Wilcoxon, Kruskal–Wallis, and Spearman non-parametric tests as appropriate. Multivariate analysis was used to analyze both categorical and numerical variables. Principal component analysis adapted for mixed data (both numerical and categorical variables, Factor Analysis of Mixed Data (FAMD)) was used to summarize and visualize the variance in the prospective cohort of CRC. Then, unsupervised clustering was used to highlight the existence of CRC subgroups by: (1) calculating distances between patients with the Gower metric; (2) partitioning around medoids (PAM), a classification method similar to k-means, but more robust to noise and outliers; and (3) selecting the right number of clusters with the silhouette width metric. Clusters were visualized using the *t*-distributed stochastic neighborhood embedding method (*t*-SNE). Plots were created using the ggplot2 package. Statistical analyses were performed using R software 3.6.0 and Rstudio software (version 1.2.1335). A *p* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

## 5. Conclusions

In conclusion, this study showed that tumor cells of the majority of CRCs display a functional caspase-1/IL-18 axis, part of the inflammasome pathway, that can modulate the IFN $\gamma$  response elicited by Th1/Tc1 TILs from the tumor microenvironment. This study also contributes to improving CRC subclassifications, not only in terms of microsatellite status, but also of the inflammasome pathway and the immune-related gene signature bridging innate and adaptive immunity. Altogether, our findings strongly suggest that

targeting the inflammasome pathway could improve the anti-tumor immune response in subgroups of CRC.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/2072-6694/13/2/189/s1](http://www.mdpi.com/2072-6694/13/2/189/s1). Figure S1: Hierarchical clustering after principal component analysis on CRC. Figure S2: CMS classification of CRC after 3'RNA sequencing using the CMS Classifier package. Table S1: Gene set enrichment analysis using ClueGo.

**Author Contributions:** Concept and design: A.J., L.B.M., C.B. (Céline Bossard), N.G.; Methodology: L.B.M., C.D., D.D., K.D., R.O.; Acquisition, analysis and interpretation of data: L.B.M., A.J., C.D., D.D., M.K., O.R., P.-A.G.; Patients care and inclusion: J.P., E.D., C.B. (Céline Bossard), P.F., W.E.A.T., J.B.; Funding acquisition: A.J., C.B. (Céline Bossard), C.B. (Camille Brochier); Writing—original draft preparation: A.J., L.B.M., C.B. (Céline Bossard); Writing—review and editing: C.B. (Camille Brochier), N.G., M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported in part by the Ligue contre le Cancer Grand Ouest (CD 44, 22, 53), and by the “Association Malades Entraide Cancer”. L.B.M. is the recipient of a CIFRE PhD grant (CIFRE PhD thesis, Institut Roche and ANRT).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the institutional board of Nantes University Hospital. Tissue biocollection was registered with the French Ministry for Higher Education and Research (DC-2014-2206) with approval from the ethic committee (CPP Ouest IV-Nantes).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank the Cytometry Facility Cytocell, the morphology and cell imaging facility MicroPiCell from SFR Bonamy, Nantes, for expert technical assistance. We also thank the Genomics and Bioinformatics core facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest, IFB) for its technical support.

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Pagès, F.; Berger, A.; Camus, M.; Sanchez-Cabo, F.; Costes, A.; Molidor, R.; Mlecnik, B.; Kirilovsky, A.; Nilsson, M.; Damotte, D.; et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2654–2666, doi:10.1056/NEJMoa051424.
- Galon, J.; Costes, A.; Sanchez-Cabo, F.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Lagorce-Pagès, C.; Tosolini, M.; Camus, M.; Berger, A.; Wind, P.; et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **2006**, *313*, 1960–1964, doi:10.1126/science.1129139.
- Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Fredriksen, T.; Mauder, S.; Bindea, G.; Berger, A.; Bruneval, P.; Fridman, W.-H.; Pages, F.; et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1263–1271, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907.
- 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. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *Lancet* **2018**, *391*, 2128–2139, doi:10.1016/S0140-6736(18)30789-X.
- Mlecnik, B.; Bindea, G.; Angell, H.K.; Maby, P.; Angelova, M.; Tougeron, D.; Church, S.E.; Lafontaine, L.; Fischer, M.; Fredriksen, T.; et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* **2016**, *44*, 698–711, doi:10.1016/j.immuni.2016.02.025.
- Giannakis, M.; Mu, X.J.; Shukla, S.A.; Qian, Z.R.; Cohen, O.; Nishihara, R.; Bahl, S.; Cao, Y.; Amin-Mansour, A.; Yamauchi, M.; et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 857–865, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.075.
- Ott, E.; Bilonda, L.; Dansette, D.; Deleigne, C.; Duchalais, E.; Podevin, J.; Volteau, C.; Bennouna, J.; Toucheffeu, Y.; Fourquier, P.; et al. The density of Tbet+ tumor-infiltrating T lymphocytes reflects an effective and druggable preexisting adaptive antitumor immune response in colorectal cancer, irrespective of the microsatellite status. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1562834, doi:10.1080/2162402X.2018.1562834.
- Llosa, N.J.; Cruise, M.; Tam, A.; Wicks, E.C.; Hechenbleikner, E.M.; Taube, J.M.; Blosser, R.L.; Fan, H.; Wang, H.; Lubner, B.S.; et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 43–51, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0863.

9. 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. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2509–2520, doi:10.1056/NEJMoa1500596.
10. Overman, M.J.; McDermott, R.; Leach, J.; Lonardi, S.; Lenz, H.J.; Morse, M.A.; Desai, J.; Hill, A.; Axelson, M.; Moss, R.A.; et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): An open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1182–1191, doi:10.1016/S1470-2045(17)30422-9.
11. 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. Durable Clinical Benefit with Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 773–779, doi:10.1200/JCO.2017.76.9901.
12. Kantono, M.; Guo, B. Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1132, doi:10.3389/fimmu.2017.01132.
13. Karan, D. Inflammasomes: Emerging Central Players in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3028, doi:10.3389/fimmu.2018.03028.
14. Franchi, L.; Eigenbrod, T.; Munoz-Planillo, R.; Nunez, G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 241–247, doi:10.1038/ni.1703.
15. Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 229–265, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715.
16. Feng, S.; Fox, D.; Man, S.M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430 Pt B*, 3068–3080, doi:10.1016/j.jmb.2018.07.002.
17. Xia, S. Biological mechanisms and therapeutic relevance of the gasdermin family. *Mol. Asp. Med.* **2020**, *76*, 100890, doi:10.1016/j.mam.2020.100890.
18. Dinarello, C.A.; Fantuzzi, G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187* (Suppl. 2), S370–S384, doi:10.1086/374751.
19. Pagès, F.; Berger, A.; Henglein, B.; Piqueras, B.; Danel, C.; Zinzindohoue, F.; Thiounn, N.; Cugnenc, P.H.; Fridman, W.H. Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: Consequences for tumor immune surveillance. *Int. J. Cancer* **1999**, *84*, 326–330, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990621)84:3<326::aid-ijc22>3.0.co;2-k.
20. Terme, M.; Ullrich, E.; Aymeric, L.; Meinhardt, K.; Desbois, M.; Delahaye, N.; Viaud, S.; Ryffel, B.; Yagita, H.; Kaplanski, G.; et al. IL-18 Induces PD-1-Dependent Immune suppression in Cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5393–5399, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0993.
21. Timperi, E.; Focaccetti, C.; Gallerano, D.; Panetta, M.; Spada, S.; Gallo, E.; Visca, P.; Venuta, F.; Diso, D.; Prelaj, A.; et al. IL-18 receptor marks functional CD8<sup>+</sup> T cells in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1328337, doi:10.1080/2162402X.2017.1328337.
22. Gil, M.; Kim, K.E. Interleukin-18 Is a Prognostic Biomarker Correlated with CD8<sup>+</sup> T Cell and Natural Killer Cell Infiltration in Skin Cutaneous Melanoma. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1993, doi:10.3390/jcm8111993.
23. Karki, R.; Kanneganti, T.D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 197–214, doi:10.1038/s41568-019-0123-y.
24. Jarry, A.; Bossard, C.; Bou-Hanna, C.; Masson, D.; Espaze, E.; Denis, M.G.; Laboisse, C.L. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 1132–1142, doi:10.1172/JCI32140.
25. Jarry, A.; Bossard, C.; Sarraeyrouse, G.; Mosnier, J.F.; Laboisse, C.L. Loss of interleukin-10 or transforming growth factor  $\beta$  signaling in the human colon initiates a T-helper 1 response via distinct pathways. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1887–1896.e2, doi:10.1053/j.gastro.2011.08.002.
26. Lei-Leston, A.C.; Murphy, A.G.; Maloy, K.J. Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1168, doi:10.3389/fimmu.2017.01168.
27. Jarry, A.; Vallette, G.; Cassagnau, E.; Moreau, A.; Bou-Hanna, C.; Lemarre, P.; Letessier, E.; Le Neel, J.C.; Galniche, J.P.; Laboisse, C.L. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer. *Gut* **1999**, *45*, 246–251, doi:10.1136/gut.45.2.246.
28. Fabbri, M.; Carbotto, G.; Ferrini, S. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *97*, 665–675, doi:10.1189/jlb.5RU0714-360RR.
29. Zhou, T.; Damsky, W.; Weizman, O.E.; McGeary, M.K.; Hartmann, K.P.; Rosen, C.E.; Fischer, S.; Jackson, R.; Flavell, R.A.; Wang, J.; et al. IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy. *Nature* **2020**, *583*, 609–614, doi:10.1038/s41586-020-2422-6.
30. Nikiteas, N.; Yannopoulos, A.; Chatzitheofylaktou, A.; Tsigris, C. Heterozygosity for interleukin-18-607 A/C polymorphism is associated with risk for colorectal cancer. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 3849–2853.
31. Yao, J.; Li, Z.H.; Li, Y.X.; Zhang, R.; Zhang, D.G.; Xu, Z.L.; Wang, L.S.; Wang, J.Y. Association between the -607 C>A polymorphism in interleukin-18 gene promoter with gastrointestinal cancer risk: A meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 16880–16887, doi:10.4238/2015. December.14.15.

32. Davis, B.K.; Roberts, R.A.; Huang, M.T.; Willingham, S.B.; Conti, B.J.; Brickey, W.J.; Barker, B.R.; Kwan, M.; Taxman, D.J.; Accavitti-Loper, M.A.; et al. Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 1333–1337, doi:10.4049/jimmunol.1003111.
33. Yoshihama, S.; Roszik, J.; Downs, I.; Meissner, T.B.; Vijayan, S.; Chapuy, B.; Sidiq, T.; Shipp, M.A.; Lizee, G.A.; Kobayashi, K.S. NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5999–6004, doi:10.1073/pnas.1602069113.
34. Vijayan, S.; Sidiq, T.; Yousuf, S.; van den Elsen, P.J.; Kobayashi, K.S. Class I transactivator, NLRC5: A central player in the MHC class I pathway and cancer immune surveillance. *Immunogenetics* **2019**, *1*, 273–282, doi:10.1007/s00251-019-01106-z.
35. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; de Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356, doi:10.1038/nm.3967.
36. Janson, P.C.; Marits, P.; Thörn, M.; Ohlsson, R.; Winqvist, O. CpG methylation of the IFNG gene as a mechanism to induce immunosuppression in tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 2878–2886, doi:10.4049/jimmunol.181.4.2878.
37. Wang, F.; Xu, J.; Zhu, Q.; Qin, X.; Cao, Y.; Lou, J.; Xu, Y.; Ke, X.; Li, Q.; Xie, E.; et al. Downregulation of IFNG in CD4+ T cells in lung cancer through hypermethylation: A possible mechanism of tumor-induced immunosuppression. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79064, doi:10.1371/journal.pone.0079064.
38. Veldhoen, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 612–621, doi:10.1038/ni.3742.
39. Vilgelm, A.E.; Richmond, A. Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 333, doi:10.3389/fimmu.2019.00333.
40. Ponzetta, A.; Carriero, R.; Carnevale, S.; Barbagallo, M.; Molgora, M.; Perucchini, C.; Magrini, E.; Gianni, F.; Kunderfranco, P.; Polentarutti, N.; et al. Neutrophils Driving Unconventional T Cells Mediate Resistance against Murine Sarcomas and Selected Human Tumors. *Cell* **2019**, *178*, 346–360.e24, doi:10.1016/j.cell.2019.05.047.
41. Eugène, J.; Jouand, N.; Ducoin, K.; Dansette, D.; Oger, R.; Deleine, C.; Leveque, E.; Meurette, G.; Podevin, J.; Matysiak, T.; et al. The inhibitory receptor CD94/NKG2A on CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: A promising new druggable immune checkpoint in the context of HLA-E/β2m overexpression. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 468–482, doi:10.1038/s41379-019-0322-9.
42. Soumillon, M.; Cacchiarelli, D.; Semrau, S.; van Oudenaarden, A.; Mikkelsen, T.S. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *BioRxiv* **2014**, doi:10.1101/003236.
43. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA Seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
44. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Hackl, H.; Charoentong, P.; Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Fridman, W.H.; Pagès, F.; Trajanoski, Z.; Galon, J. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1091–1093, doi:10.1093/bioinformatics/btp101.

### *Annexe à l'article 2 : Validation des trois clusters par ré-échantillonnage ou «bootstrapping»*

Dans l'article 2, nous avons utilisé différentes méthodes pour valider les trois clusters identifiés (cluster 1 MSS aCasp1<sup>-</sup>, cluster 2 MSS aCasp1<sup>+</sup>, cluster 3 MSI) : 1) la confirmation visuelle de l'existence de ces sous-groupes [voir figure 4A et figure supplémentaire 1A de l'article 2] et 2) l'utilisation des deux méthodes de classification distinctes, supervisée et non supervisée, qui aboutissent au même résultat, c'est-à-dire l'identification de trois sous-groupes.

Cependant, les analyses de clustering ont tendance à générer des sous-groupes même sur un ensemble de données très homogènes. Ainsi, un autre aspect important pour valider une analyse de clustering est l'évaluation de la stabilité des sous-groupes identifiés, c'est-à-dire qu'un «vrai» sous-groupe/cluster ne devrait pas disparaître lorsque les données sont légèrement modifiées (Hennig 2007). Nous avons donc voulu savoir si les 3 clusters que nous identifions dans l'article 2 restent stables après multiple ré-échantillonnage, en ajoutant des valeurs aberrantes ou du bruit de fond statistique. Pour ce faire, nous avons utilisé l'algorithme "Flexible Procedures for Clustering" (fpc) développé par Hennig (2015), qui permet de ré-échantillonner 100 fois les données et génère un indice de Jaccard connu pour étudier la similarité entre objets (Jaccard 1901, Hennig 2007). L'indice de Jaccard varie entre 0 et 1, 1 étant le degré maximal de similarité. Le seuil qui permet de confirmer la stabilité des clusters est fixé à 0,75 (Hennig 2008). Ainsi, à chaque ré-échantillonnage et clustering par partitionnement autour des médoïdes (répété 100 fois), l'algorithme génère un indice de Jaccard en fonction de la fréquence où les sous-groupes similaires sont retrouvés (Figure 27).

Nous montrons que les 3 clusters identifiés dans l'article 2 sont stables car la moyenne de l'indice de Jaccard après multiple ré-échantillonnage est supérieur à 0,75 (0,82 à 0,94) pour tous les clusters. La valeur pronostique de ces 3 clusters sera évaluée dès que possible en examinant les données de survie des patients à 5 ans.

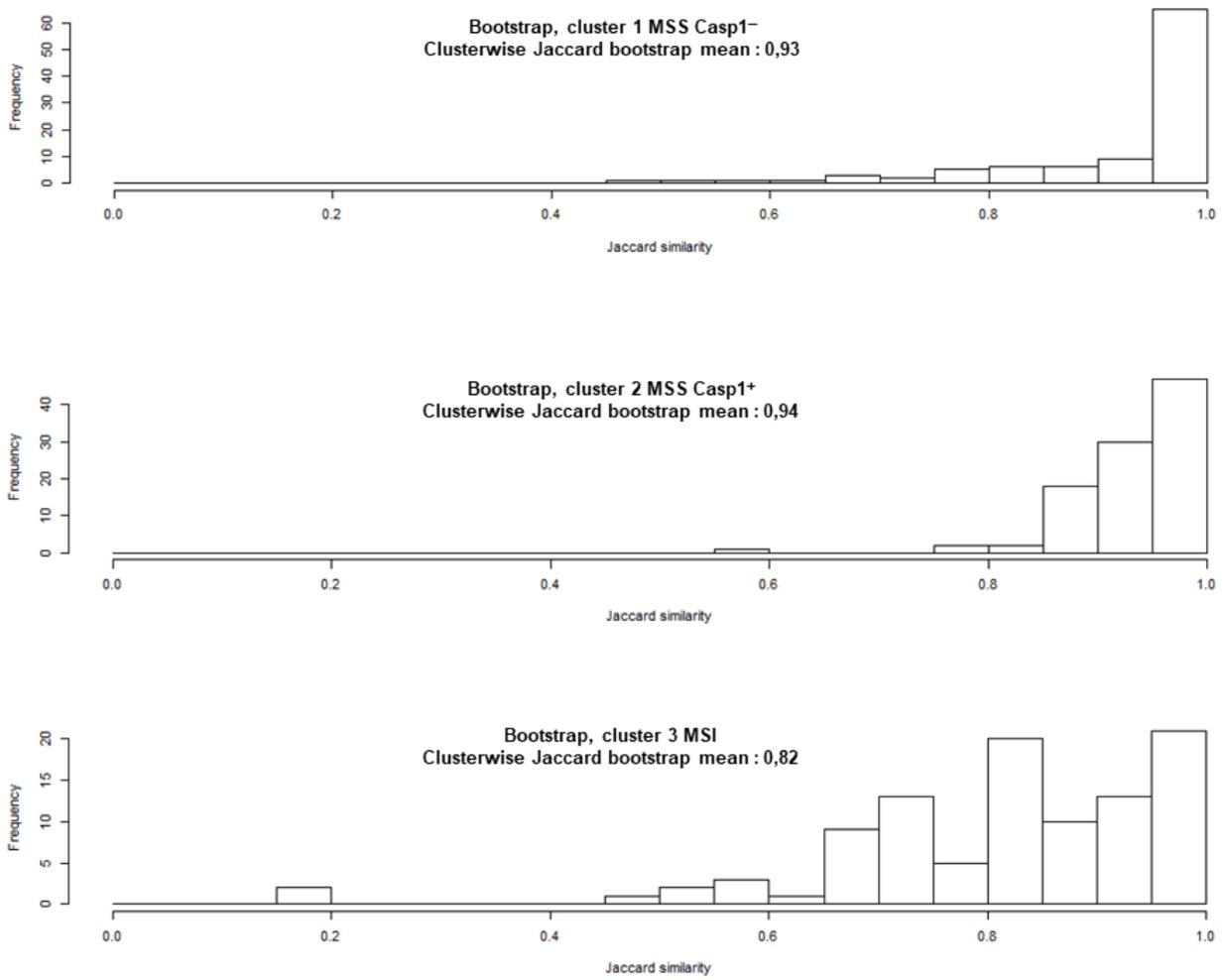


Figure 27. Fréquence de la similarité des 3 clusters par ré-échantillonnage (“Cluster bootstrap”)

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Une meilleure compréhension du microenvironnement tumoral ainsi que des interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire est nécessaire dans le cancer du côlon, maladie hétérogène sur le plan morphologique, phénotypique et immunitaire, afin de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à augmenter l'efficacité des immunothérapies dans les différents sous-types de CCR.

Dans cette thèse, nous montrons que l'évaluation du facteur de transcription T-bet au niveau protéique, facilement analysable en immunohistochimie, est un biomarqueur pronostique de la survie des patients et permet de prédire une réponse Th1/Tc1 préexistante dans les CCR. De plus, grâce à une approche multiparamétrique et fonctionnelle basée sur un modèle 3D de culture d'explants de CCR, nous montrons que la cellule tumorale elle-même pourrait participer, via un inflammasome fonctionnel (voie caspase-1/IL-18), à la modulation de cette réponse Th1/Tc1. Cependant, l'efficacité de cette réponse immunitaire anti-tumorale est contrebalancée par la présence de nombreux facteurs immunosuppresseurs du MET dont les récepteurs inhibiteurs (ICP) que nous avons contribué à mieux caractériser dans les CCR.

Ainsi l'évaluation de différents paramètres immunitaires, non seulement des TILs mais aussi des cellules tumorales, devrait permettre d'identifier des biomarqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse aux immunothérapies dans les CCR.

## 1. Les biomarqueurs de réponse aux immunothérapies dans les CCR

Dans la course à l'identification des biomarqueurs aux immunothérapies dans les cancers en général, 4 éléments ont pris le devant de la scène : 1) l'expression de l'axe PD1/PDL1 dans le MET de la tumeur (Taube *et al.*, 2014) ; 2) la présence d'un fort infiltrat en TILs et une signature Th1/Tc1 au niveau transcriptomique (Mlecnik *et al.*, 2016) ; 3) l'estimation de la charge mutationnelle de la tumeur (Snyder *et al.*, 2014) et 4) la composition du microbiote intestinal (Gopalakrishnan *et al.*, 2018).

Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les deux premiers points, détaillés ci-dessous.

### *1.1) Expression de marqueurs inhibiteurs de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale : importance de l'axe PD1/PDL1 et d'IDO-1 dans les CCR*

L'expression du PD1 sur les TILs et de son ligand PDL1, recherché surtout sur les cellules tumorales, est considérée comme un biomarqueur «naturel» pour prédire la réponse aux immunothérapies ciblant cet axe. Notre étude rapportée dans l'article 1 précise l'expression de l'axe PD1/PDL1 par immunohistochimie sur coupes entières dans les CCR en fonction du statut microsatellitaire et des sous-types morphologiques. Cette étude confirme non seulement l'existence d'une corrélation entre PD-1 et PDL-1, en accord avec la littérature, mais aussi précise la localisation du PDL1 au sein de la tumeur. Ceci nous a permis de démontrer que PDL1 est présent : 1) dans la grande majorité des CCR MSI, en particulier dans le sous-type médullaire très riche en TILs PD1+, où PDL1 est exprimé par les cellules tumorales et les cellules myéloïdes ; 2) dans un sous-groupe de CCR MSS (40%) où PDL1 n'est exprimé que par les cellules myéloïdes.

La prise en compte de l'expression de PDL-1, non seulement sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules immunitaires (myéloïdes), en association avec PD1, est importante pour mieux apprécier l'impact biologique de la réponse aux anti-PD1/PDL1. D'ailleurs, cette expression est actuellement prise en compte en évaluant le score CPS («Combined Positive Score») qui représente la fréquence des cellules tumorales et immunitaires exprimant le PDL1 rapportée au nombre de cellules tumorales totales ( $CPS \geq 1$ ), dans la prescription du pembrolizumab (anti-PD1) en première ligne de traitement dans le carcinome épidermoïde métastatique de la tête et du cou (Haute Autorité de Santé, Juin 2020). De plus, l'expression de PDL1 étant hétérogène, dynamique et inductible par l'IFN $\gamma$ , il pourrait être pertinent d'examiner le statut de PDL1 au cours du temps (avant traitement et à différents moments au cours du traitement).

En parallèle, il nous semblait important d'examiner l'expression d'autres récepteurs inhibiteurs (TIGIT, TIM3, LAG3) et de leurs ligands dans les CCR, car leur caractérisation n'est que partielle dans la littérature. Nos travaux présentés en annexe de l'article 1 montrent pour la première fois que les TILs fraîchement isolés de CCR, après dissociation mécanique, expriment fortement non seulement PD1, mais aussi TIGIT et à un moindre degré TIM3. De plus, nos analyses préliminaires suggèrent que les CCR MSI sont particulièrement riches en TILs «double positifs» PD1+TIGIT+ et PD1+TIM3+, en comparaison avec les CCR MSS, ce qui reste à confirmer en examinant un plus grand nombre de CCR MSI. On peut émettre l'hypothèse que les TILs double positifs PD1+TIGIT+ pourraient avoir une forte affinité pour

les antigènes tumoraux et servir de marqueur de substitution de la réponse aux anti-PD1, comme cela a été montré dans le mélanome (Simon *et al.*, 2017b). De plus, une étude est en cours pour déterminer l'effet des anti-TIGIT (clone 10A7, Genentech) en association ou non avec les anti-PD1, sur la réponse Th1/Tc1 des TILs dans le modèle d'explants, étant donné le fort niveau d'expression de ces deux ICP par les TILs de CCR.

Notre étude (article 1) montre aussi que les cellules tumorales surexpriment de manière aberrante IDO-1, une enzyme impliquée dans l'immunosubversion comme précisé dans le chapitre III.2.C. Le fait que l'expression d'IDO-1 soit associée à une absence de production d'IFN $\gamma$  par les TILs T-bet<sup>+</sup> dans nos cultures d'explants et que l'IDO-1 peut inhiber les fonctions effectrices des LT (Brochez *et al.*, 2017) suggère que les inhibiteurs d'IDO-1 pourraient être utilisés en association avec des anti-PD1/PDL1 pour restaurer une réponse Th1/Tc1, comme cela a été montré dans un modèle de souris xénogreffées (Schramme *et al.*, 2020).

### *1.2) Infiltrat en TILs : T-bet est un biomarqueur pronostique et prédictif d'une réponse Th1/Tc1 préexistante dans les CCR*

Plusieurs études montrent qu'un fort infiltrat en TILs CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et une signature transcriptomique IFN $\gamma$  sont des biomarqueurs prédictifs de la réponse aux immunothérapies, corrélés à un bénéfice clinique chez les patients atteints de mélanome métastatique (Hamid *et al.*, 2011 ; Ji *et al.*, 2012 ; Herbst *et al.*, 2014 ; Tumei *et al.*, 2014 ; Grasso *et al.*, 2020). Nous montrons, dans l'article 1, que T-bet est un facteur pronostique qui pourrait être facilement évaluable par les pathologistes en routine clinique. De plus, le développement d'un modèle 3D d'explants de CCR, permettant le maintien des interactions cellules tumorales / TIL a permis de montrer pour la première fois que T-bet est un marqueur prédictif d'une réponse Th1/Tc1 (IFN $\gamma$ ) préexistante induite par les TILs «résidents» (sans intervention possible de lymphocytes circulants). Ce modèle de culture d'explants peut être considéré comme un bon modèle *ex vivo* chez l'homme pour prédire la réponse aux anti-ICP, puisque nous montrons que la réponse IFN $\gamma$  peut être induite ou augmentée par des anti-PD1, en relation avec la densité de l'infiltrat en TILs T-bet<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> et l'expression de PDL1.

En perspective à ce travail, la densité de l'infiltrat TILs T-bet+ sera examinée dans une cohorte de CCR métastatique traités aux immunothérapies (Durvalumab, anti-PDL1) en combinaison avec une chimiothérapie de type FOLFOX comparant les patients répondeurs *versus* non-répondeurs, en collaboration avec l'équipe du Pr F. Ghiringhelli (INSERM UMR 1231, Dijon). Cette étude permettra de déterminer si T-bet peut être considéré comme un marqueur prédictif de la réponse aux anti-ICP dans les CCR.

Outre ces 2 biomarqueurs (expression des ICP et densité en TILs T-bet+), d'autres biomarqueurs de la réponse aux immunothérapies ont été identifiés dans d'autres tumeurs solides et pourraient être envisagés dans le CCR tels que : la charge mutationnelle de la tumeur et surtout la composition du microbiote intestinal. Cependant, ces biomarqueurs restent difficiles à mettre en place dans la routine clinique car dans le cas de la charge mutationnelle par exemple, le seuil pour déterminer une forte charge mutationnelle semble varier en fonction du tissu et de la plateforme chargée de l'analyse.

### *1.3) Estimation de la charge mutationnelle de la tumeur*

Une forte charge mutationnelle dans les tumeurs solides et en particulier dans les CCR MSI, génère des néoantigènes capables de stimuler les TILs, à l'origine d'un fort immunoscore (Giannakis *et al.*, 2016). La charge mutationnelle de la tumeur, étudiée après extraction d'ADN sur tissu broyé, a été initialement identifiée comme facteur prédictif de la réponse aux immunothérapies dans le mélanome (Snyder *et al.*, 2014) et dans d'autres tumeurs solides, notamment le carcinome urothélial et le cancer du poumon (Rosenberg *et al.*, 2016 ; Rizvi *et al.*, 2015 ; Hellman *et al.*, 2018 ; Galsky *et al.*, 2017 ; Le *et al.*, 2017).

Dans les CCR, outre le statut microsatellitaire, considéré comme marqueur d'éligibilité aux immunothérapies, une étude récente montre que la charge mutationnelle de la tumeur serait un biomarqueur de réponse aux anti-ICP. En effet, sur 22 CCR MSI-high métastatiques ayant une forte charge mutationnelle, traités aux anti-PD-1/PDL-1 en monothérapie ou en combinaison avec les anti-CTLA-4, 16 patients présentaient une réponse partielle ou totale (Schrock *et al.*, 2019). D'autre part, Lee *et al.* (2020) montrent, par des approches comparatives au niveau tissulaire et cellulaire (single cell RNA seq), que les cellules tumorales de certains CCR MSI-high (CMS1) n'ont pas de signature «immune-like», ce qui expliquerait leur absence de réponse aux immunothérapies. Cette signature «immune-like» intrinsèque aux cellules tumorales pourrait être régulée par des facteurs environnementaux tels que le microbiote.

#### 1.4) Composition du microbiote intestinal

William B. Coley est certainement le premier, en 1893, à avoir décrit et expérimenté l'implication du microbiote dans la régression tumorale (Coley 1893). Plusieurs années après, en 2007, l'équipe de Rosenberg montre l'implication du microbiote intestinal dans la réponse à l'immunothérapie, en utilisant des CAR-T spécifiques de la tumeur chez des souris lymphodéplétées (Paulos *et al.*, 2007). De plus, les composants du microbiote intestinal ont des effets profonds sur le système immunitaire périphérique, y compris dans le contexte du cancer (Chen & Mellman, 2017). Récemment, plusieurs études ont montré l'importance de la flore commensale dans l'efficacité de la réponse à une immunothérapie utilisant des inhibiteurs d'ICP dans les cancers chez l'homme, en particulier dans le mélanome (Chaput *et al.*, 2017 ; Frankel *et al.*, 2017 ; Matson *et al.*, 2018 ; Routy *et al.*, 2018). De manière assez paradoxale, l'implication de la flore intestinale dans la réponse aux immunothérapies dans le cancer du côlon, organe abritant cette flore, n'est à notre connaissance pas rapportée.

En perspective de notre étude, la détermination de la charge mutationnelle d'un certain nombre de patients de notre cohorte pour lesquels nous disposons de lignées de TILs autologues, est envisagée prochainement. Ainsi, nous pourrions prédire les néoantigènes spécifiques de la tumeur dans un contexte HLA déterminé, et isoler les TILs spécifiques de ces néoantigènes, ce qui pourrait aboutir à une stratégie de transfert adoptif dans les CCR.

D'autre part, la caractérisation de la diversité du répertoire des TILs pourrait permettre de déterminer s'il existe des antigènes spécifiques de la flore intestinale dans les CCR, en utilisant la technique de séquençage du TCR (TCRseq).

## 2. L'inflammasome des cellules tumorales (axe caspase-1/IL-18) : un modulateur de la réponse anti-tumorale Th1/Tc1 des TILs dans les CCR

Nos résultats rapportés dans l'article 2, basés sur une approche multiparamétrique, descriptive et fonctionnelle, utilisant deux cohortes de CCR distinctes et le modèle de culture d'explants de CCR montrent que : a) l'expression de l'IL-18, évaluée en immunohistochimie, est associée à la densité en TILs T-bet<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ; b) l'IL-18 recombinante humaine induit ou potentialise la réponse Th1/Tc1 (IFN $\gamma$ ) des TILs isolés de CCR en fonction de leur niveau d'expression de l'IL-18R $\alpha$  ; c) l'IL-18 mature sécrétée dans les cultures d'explants est associée au taux d'IFN $\gamma$  et d) l'examen de l'axe complet caspase-1/IL-18/densité en TILs/réponse IFN $\gamma$

en fonction du statut microsatellitaire des CCR permet d'identifier des sous-groupes de patients grâce à une analyse multivariée.

Nous discuterons certains points de ces résultats, principalement : 1) l'axe caspase-1/IL-18 des cellules tumorales : potentiel modulateur de la réponse IFN $\gamma$  ; 2) l'existence de différents sous-groupes de CCR selon l'axe caspase-1/IL-18/IFN $\gamma$ .

### *2.1) Axe caspase-1/IL-18 dans les cellules tumorales : un potentiel modulateur de la réponse IFN $\gamma$ anti-tumorale des TILs Th1/Tc1 chez l'homme*

Nos résultats présentés dans l'article 2 montrent que la pro-IL-18 est conservée dans les cellules tumorales, comme dans les cellules épithéliales intestinales normales. Cependant, elle est perdue ou sous-exprimée dans environ 30% des CCR. Cette perte d'expression d'IL-18 a d'ailleurs été également décrite par Pagès *et al.* (1999) au niveau transcriptomique et s'accompagne d'une perte de l'IFN $\gamma$ , ce qui rejoint nos observations qui montrent que le niveau d'expression d'IL-18 dans les cellules tumorales est significativement associé à la densité en TIL T-bet<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, capables de sécréter l'IFN $\gamma$ . Bien que cette densité en TILs T-bet<sup>+</sup> soit un marqueur de bon pronostic, résultat en accord avec ceux de l'article 1, nous n'avons pas trouvé d'impact pronostique de la pro-IL-18 dans notre cohorte. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gil & Kim (2019) qui montrent, en utilisant des bases de données publiques (TCGA et GTEx), que le niveau d'ARNm IL-18 n'est pas un marqueur pronostique dans les CCR, contrairement à d'autres types de tumeurs solides comme le mélanome. On peut donc émettre l'hypothèse que l'action de l'IL-18 soit liée à une spécificité d'organe et de son environnement. En effet, plusieurs études sur différents types de cancer tels que le cancer gastrique, le cancer de la tête et du cou, le cancer du sein et le cancer ovarien ont montré qu'un fort taux sérique d'IL-18 peut être considéré comme un marqueur diagnostique, mais son action pro- ou anti-tumorale reste controversée (Thong-Ngam *et al.*, 2006 ; Martone *et al.*, 2004 ; Merendino *et al.*, 2001 ; Günel *et al.*, 2003 ; Sözen *et al.*, 2004 ; Okamoto *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans le cas du cancer ovarien, l'équipe de Ferrini montre que ce fort taux sérique d'IL-18 est essentiellement la pro-forme biologiquement inactive, en lien avec la perte de la caspase-1, machinerie nécessaire à la maturation de l'IL-18 (Wang *et al.*, 2002; Orengo *et al.*, 2011). Ces différentes observations nous ont conduit à examiner le statut de la caspase-1 dans les CCR, en particulier dans les cellules tumorales.

Nous montrons pour la première fois chez l'homme, que les cellules tumorales possèdent un axe caspase-1/IL-18 fonctionnel dans 70% des CCR. La caspase-1 active, détectée *in situ* et après dissociation mécanique de la tumeur par cytométrie de flux à l'aide de la sonde YVAD fluorescente, qui se fixe spécifiquement sur le site catalytique de la caspase-1 active, est présente majoritairement dans les cellules tumorales. De plus, le niveau d'expression de la caspase-1 active, variable au sein de la tumeur (10 à 70% des cellules tumorales positives), est corrélé au taux d'IL-18 mature sécrétée dans les cultures d'explants.

L'IL-18 est connue depuis longtemps comme un inducteur de la réponse IFN $\gamma$  (Nakamura *et al.*, 1989) dans les lymphocytes T du sang et les cellules NK. Nous montrons dans l'article 2 que l'IL-18 mature recombinante humaine induit ou potentialise la réponse IFN $\gamma$  des TILs isolés de CCR, en fonction du niveau d'expression de l'IL-18R $\alpha$ . Des expériences sont en cours pour déterminer la subordination de la réponse IFN $\gamma$  des TILs dans le modèle d'explants en utilisant un inhibiteur de la caspase-1 ou un anticorps anti-IL-18 neutralisant.

Ces résultats suggèrent que la cellule tumorale peut être considérée comme une cellule immunomodulatrice, capable de moduler son microenvironnement immunitaire via l'axe caspase-1/IL-18 et que les liens entre immunité innée et adaptative sont importants à prendre en compte dans l'immunobiologie de la tumeur colique.

A ce stade, la question se pose de savoir quels sont les activateurs potentiels de la caspase-1 dans la cellule tumorale. Nous avons commencé à aborder cette question en recherchant, au niveau transcriptomique par qPCR array, l'expression différentielle d'un panel de gènes spécifiques de la voie de l'inflammasome dans les CCR ayant une caspase-1 active dans les cellules tumorales (aCasp1<sup>+</sup>) ou non (aCasp1<sup>-</sup>). Nos résultats préliminaires, qui nécessitent d'être confirmés et étendus, suggèrent que certains récepteurs TLR et NLR, en particulier le NLRC5, mais pas le NLRP3 qui est communément étudié, sont sous-exprimés dans les CCR aCasp1<sup>-</sup> comparé aux CCR aCasp1<sup>+</sup>. Cette observation est particulièrement intéressante car le NLRC5, outre son activité dans la formation d'un inflammasome fonctionnel, est également décrit comme un transactivateur de l'expression des molécules du CMH de classe I et pourrait ainsi jouer un rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale dans les CCR (Meissner *et al.*, 2010 ; Yoshihama *et al.*, 2016), notamment en facilitant la présentation des antigènes tumoraux aux TIL CD8<sup>+</sup> comme cela a été décrit dans un modèle murin de mélanome (Rodriguez *et al.*, 2016). Des études sont actuellement en cours pour déterminer le statut du NLRC5 dans les CCR ainsi que son implication dans la biologie des cellules tumorales et dans leurs interactions avec les TILs.

## 2.2) Existence de différents sous-groupes de CCR

Le statut de la caspase-1 étant hétérogène dans les CCR ainsi que la réponse IFN $\gamma$ , nous avons recherché si ces 2 paramètres, associés à la densité en TILs et au statut microsatellitaire, pouvaient permettre d'identifier plusieurs sous-groupes de CCR. Pour ce faire, nous avons utilisé deux algorithmes bien distincts, dont un premier permet une classification hiérarchique après analyse en composante principale et un second une classification non hiérarchique. Effectivement, nous avons identifié 3 sous-groupes de CCR en fonction de l'axe caspase-1/IL-18/densité en TILs/réponse IFN $\gamma$  et du statut microsatellitaire. Cette classification en 3 sous-groupes, dont la stabilité a été confirmée par une méthode de «bootstrapping» (annexe de l'article 2), montre qu'il existe non seulement un cluster de CCR MSI bien distinct, ce qui était attendu, mais également deux clusters parmi les CCR MSS (Figure 28).

La majorité des CCR MSS (64%) possède un axe caspase-1/IL-18 fonctionnel, capable de générer une réponse IFN $\gamma$  potentiellement anti-tumorale, un stroma riche en TILs et donc ces tumeurs pourraient correspondre à des tumeurs «inflammatoires». Ces tumeurs inflammatoires ouvrent des perspectives quant à l'utilisation d'autres immunothérapies dans les CCR MSS «inflammatoires».

Une minorité de CCR MSS (36%) n'a pas d'axe caspase-1/IL-18 fonctionnel dans les cellules tumorales et sécrète peu d'IFN $\gamma$  ; ces tumeurs pourraient correspondre à des tumeurs «froides» ; l'absence d'un inflammasome fonctionnel dans les cellules tumorales pourrait constituer un mécanisme d'échappement tumoral à l'immunosurveillance. Nous montrons également, grâce à différentes approches, que l'absence de la réponse IFN $\gamma$ , prévalente dans le cluster de CCR MSI et dans le cluster de CCR MSS sans caspase-1 active, est associée à une modification des facteurs extrinsèques à la tumeur dont les molécules associées à l'immunité innée et au microbiote, ce qui suggère que l'environnement exerce une pression sur les interactions entre TILs et cellules tumorales (Figure 28).

En perspective à ce travail, nous souhaitons rechercher une signature transcriptomique intrinsèque à chaque cluster, en comparant le profil d'expression de la tumeur par rapport au côlon normal apparié pour plusieurs cas au sein d'un même cluster. Des résultats préliminaires s'approchant de cette perspective n'ont pas permis d'identifier une signature transcriptomique, en comparant les tissus tumoraux uniquement entre clusters sur un petit nombre de cas de chaque cluster. De plus, l'examen des données de survie des patients à 5 ans

permettra de déterminer l'influence pronostique du statut de l'axe caspase-1/IL-18 des cellules tumorales globalement et dans les 3 clusters de CCR identifiés dans cette étude.

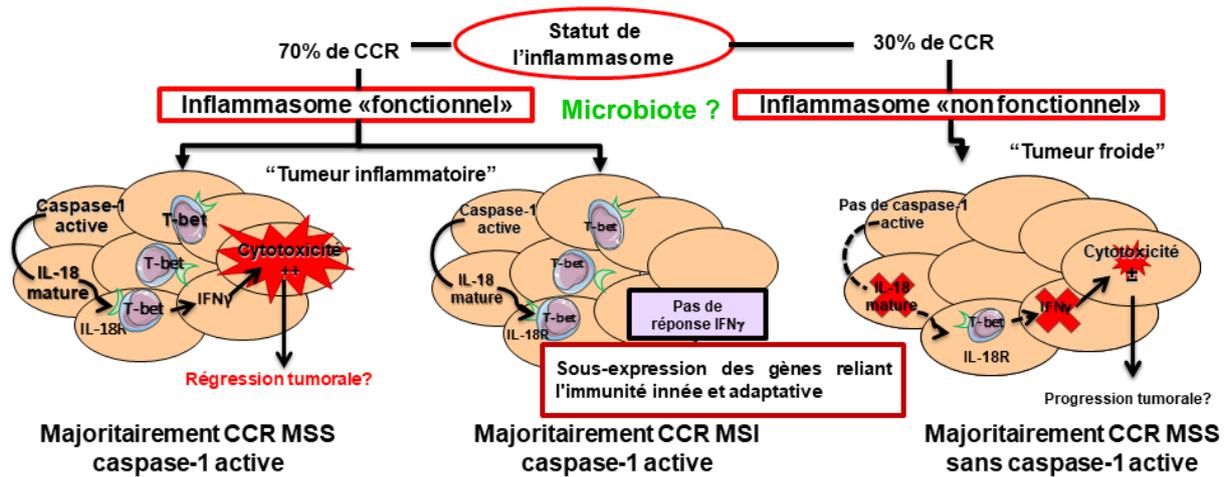


Figure 28. Sous-groupes de CCR identifiés, en fonction de l'axe caspase-1/IL-18/densité en TILs/réponse IFNγ et du statut microsatellitaire.

## Conclusion générale

Cette thèse, qui visait à mieux comprendre les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement immunitaire dans les CCR, montre que les cellules tumorales peuvent moduler la réponse Th1/Tc1 des TILs, qui est quantifiable *in situ* par l'expression du T-bet, via la conservation dans ces cellules, d'un axe caspase-1/IL-18 fonctionnel dans 70% des CCR. Les travaux futurs devront s'attacher à identifier les facteurs extrinsèques capables d'activer la caspase-1 des cellules tumorales. La connaissance de ces facteurs extrinsèques pourrait permettre la modulation de l'inflammasome dans le but de restaurer ou d'améliorer la réponse immunitaire adaptative des TILs et ainsi constituer une approche complémentaire aux immunothérapies dans les CCR.

## Références

### A

- Abdelaziz DH, Gavrilin MA, Akhter A, *et al.* (2011). Asc-dependent and independent mechanisms contribute to restriction of legionella pneumophila infection in murine macrophages. *Front Microbiol.*2:18
- Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 8: 765-72
- Aglietti RA & Dueber EC. (2017). Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol.*38: 261-71
- Ahlenstiel G., Hourigan L.F., Brown G., *et al.* (2014). Actual endoscopic versus predicted surgical mortality for treatment of advanced mucosal neoplasia of the colon. *Gastrointest Endosc.*80: 668-76.
- Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity [published correction appears in Trends Immunol. 2019 Feb;40(2):174]. *Trends Immunol.*39: 677-96
- Allard B., Longhi M.S., Robson S.C., Stagg J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev.* 276:121-144
- Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, *et al.* (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med.* 207: 1045-56
- Anderson KV. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 12: 13-19
- Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity.* 44:989-1004
- Angell HK, Bruni D, Barrett JC, Herbst R, Galon J. (2020). The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. *Clin Cancer Res.*26: 332-39
- Amit I., Garber M., Chevrier N., *et al.* (2009). Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science.*326: 257-263
- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2017) Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66: 683–91
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*280:G922-29
- Avanzi M.P., Yeku O., Li X., *et al.* (2018). Engineered Tumor-Targeted T Cells Mediate Enhanced Anti-Tumor Efficacy Both Directly and through Activation of the Endogenous Immune System. *Cell Rep.*23: 2130-41.

## B

Bachmann M, Dragoi C, Poleganov MA, Pfeilschifter J, Mühl H. (2007). Interleukin-18 directly activates T-bet expression and function via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in acute myeloid leukemia-derived predendritic KG-1 cells. *Mol Cancer Ther.*6: 723-31

Bain C.C., Bravo-Blas A., Scott C.L., *et al.* (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* 15: 929-37

Battistini A. (2009). Interferon regulatory factors in hematopoietic cell differentiation and immune regulation. *J Interferon Cytokine Res.*29: 765–80.

Bastid J., Regairaz A., Bonnefoy N., *et al.* (2015). Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res.*3: 254-65

Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. (2012). NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol.* 189: 4175-81

Beach R., Chan A.O., Wu T.T., *et al.* (2005). BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *Am J Pathol.*166: 1069-75

Bennouna J, Phelip JM, André T, Asselain B, Sébastien Koné, Ducreux M. (2017). Observational Cohort Study of Patients With Metastatic Colorectal Cancer Initiating Chemotherapy in Combination With Bevacizumab (CONCERT). *Clin Colorectal Cancer.*16: 129-140.e4

Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson BT. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.*7: 99-109

Berntsson J., Nodin B., Eberhard J., Micke P., Jirstrom K. (2016). Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer, *Int. J. Cancer* 139: 1129–39.

Biegging, K. T., Mello, S. S. and Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14: 359–70.

Birchenough GM, Nyström EE, Johansson ME, Hansson GC. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science.*352: 1535-42

Bissell M.J., Radisky D. (2011). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.*1: 46-54.

Biswas SK. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity.*43 : 435-49

Bjerknes M. & Cheng H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116: 7–14.

- Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.*342: 1350-58
- Blottière HM, de Vos WM, Ehrlich SD, Doré J. (2013). Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Curr Opin Microbiol.*16: 232-9
- Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.*110: 1225-32
- Bossard C., Bézieau S., Matysiak-Budnik T, et al. (2012). HLA-E/β2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer.*131: 855-63
- Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.*198 : 557-67
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel RL., Torre LA., Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394–24.
- Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. (2013). The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*19: 1556-65
- Brochez L, Chevolet I, Kruse V. (2017). The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer.*76: 167-182
- Bruniquel D, Borie N, Hannier S, Triebel F. (1998). Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics.* 48 : 116-24
- Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 328: 267-70

## C

- Calon A., Lonardo E., Berenguer-Llrgo A., Espinet E., Hernando-Momblona X., Iglesias M., Sevillano M., Palomo-Ponce S., Tauriello D.V., Byrom D., Cortina C., Morral C., Barceló C., Tosi S., Riera A., Attolini C.S., Rossell D., Sancho E., Batlle E. (2015). Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat. Genet.*47: 320–29.
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-37.
- Caneparo V., Landolfo S., Gariglio M., De Andrea M. (2018). The Absent in Melanoma 2-Like Receptor IFN-Inducible Protein 16 as an Inflammasome Regulator in Systemic Lupus Erythematosus: The Dark Side of Sensing Microbes. *Front Immunol.*9: 1180
- Carmeliet P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.*69 Suppl 3:4-10
- Carreno BM. & Collins M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 20:29-53
- Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, Duran E, Solana R, Tarazona R. (2009). Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1517-26.
- Cellier C, Cerf-Bensussan N, Brousse N, *et al.* (2000). Le système immunitaire intestinal. In : RampalP, Beaugerie L, Marteau P, Corthier G, eds. Colites infectieuses de l'adulte. Paris :John Libbey Eurotext, 2000 :27-38
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, *et al.* (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.*256: 97-100
- Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 6: 1670–90
- Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, Boselli L, Routier E, Cassard L, *et al.* (2017). Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol.*28: 1368-79
- Chen L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.*4: 336-47
- Chen DS. & Mellman I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* 541: 321-330
- Cheng H. & Leblond C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian gheory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.*141: 537–561.
- Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Fujioka Y, Ohba Y, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. (2012).

Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol.*13 : 832-42

Coers J, Vance RE, Fontana MF, Dietrich WF. (2007). Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol.*9: 2344-57

Coley WB. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Jan; (262):3-11.

Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.*261: 472-5

Couillin I., Pétrilli V., Martinon F. (2011). *The inflammasomes (1)*. Springer Basel. ISBN 978-3-0348-0147-8

Coupez D, Hulo P, Toucheffeu Y, Bossard C, Bennouna J. (2020). Pembrolizumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 20: 219-226

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, *et al.* (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.*122: 867-74

## D

Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, *et al.* (2004). Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother.*53: 978-86

Daig R, Rogler G, Aschenbrenner E, *et al.* (2000). Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut.*46: 350-358

Darwich A. S., Aslam U., Ashcroft D. M. & Rostami- Hodjegan A. (2014). Meta- analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. *Drug Metab. Dispos.*42: 2016–22.

Dekker E., Tanis PJ., Vleugels JLA., Kasi PM., Wallace MB. (2019). Colorectal cancer. *Lancet* 394: 1467-80.

Delneste Y., Beauvillain C., Jeannin P. (2007). Immunité naturelle. *Med Sci (Paris).*23: 67-74

Dinarello CA. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 27: 519-50

Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol.*4: 289.

Ding J, Wang K, Liu W, *et al.* (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature.*535: 111-116

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*.5 : 1365-9

Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, *et al.* (2007). Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci*.104: 8041–6.

Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. (2002). Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*.3: 991-98

Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, *et al.* (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*.32: 367-378

## E

Eng C., Kim TW., Bendell J., *et al.* (2019). Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 20: 849–61.

Eugène J., Jouand N., Ducoin K., *et al.* (2020). The inhibitory receptor CD94/NKG2A on CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a promising new druggable immune checkpoint in the context of HLA-E/ $\beta$ 2m overexpression. *Mod Pathol*.33: 468-82

## F

Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y, Yu T, Wu X, Shi Y, Ma P, Shu Y. (2020). Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomed Pharmacother*.12:109595

Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, *et al.* (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell*.25: 713–24.

Fearon ER & Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-767

Feng S., Fox D., Man S.M. (2018). Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. *J Mol Biol*.430: 3068-80

Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, *et al.* (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*.14: 1590-04

Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Datta P., Wu J., Alnemri E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*.458: 509-513

- Fernandes C., Soares D., Yegeri MC. (2018). Tumor Microenvironment Targeted Nanotherapy. *Front Pharmacol*.9: 1230.
- Ferrone C., Dranoff G. (2010). Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol*. 28(26):4045-51
- Fife BT, Bluestone JA. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 224 : 166-82
- Fiocchi C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*.115: 182-205
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*.109 : 3812-9
- Finn OJ. (2017). Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow. *Cancer Immunol Res*.5: 347-54
- Fletcher R., Wang Y.J., Schoen R.E., Finn O.J., Yu J., Zhang L. (2018). Colorectal cancer prevention: Immune modulation taking the stage. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*.1869: 138-48.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*.1: 55-67
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*.227: 106-28
- Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, Froehlich TW, Xie Y, Frenkel EP, Koh AY. (2017). Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia*.19: 848-855
- Frantz S, Ducharme A, Sawyer D, *et al.* (2003). Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*.35: 685-694
- Frey D.M., Drosler R.A., Viehl C.T., Zlobec I., Lugli A., Zingg U., Oertli D., Kettelhack C., Terracciano L., Tornillo L. (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 126: 2635–43.
- Fridman W.H., Pagès F., Sautès-Fridman C., 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., Kroemer G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol*.14: 717–34.
- Fuertes M.B., Woo S.R., Burnett B., Fu Y.X., Gajewski T.F. (2013). Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol*.34: 67-73

## G

- Gallimore A., Glithero A., Godkin A., *et al.* (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.*187: 1383-93
- Galluzzi L., Vacchelli E., Pedro J. Bravo-San, Buqué A., Senovilla L., Baracco E. Elena, Bloy N., Castoldi F., Abastado J., Agostinis P., Apte R. N., Aranda F., Ayyoub M., *et al.* (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 5: 12472-508.
- Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960-64
- Galsky M. D., Saci A., Szabo P. M., Azrilevich A., Horak C., Lambert A., *et al.* (2017). 848PD Impact of tumor mutation burden on nivolumab efficacy in second-line urothelial carcinoma patients: Exploratory analysis of the phase ii checkmate 275 study. *Annals of Oncology*, 28(suppl\_5).
- Ganesh K., Stadler Z.K., Cercek A., *et al.* (2019). Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*16: 361-75
- Gehart H & Clevers H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*16(1):19-34
- Gerbe, F., *et al.* (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529: 226–30
- Gersemann M, Wehkamp J, Stange EF. (2012). Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.*271: 421-428
- Gessi S., Varani K., Merighi S., *et al.* (2007). Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal.*3: 109-116
- Gettinger S., Horn L., Jackman D., *et al.* (2018). Five-year follow-up of nivolumab in previously treated advanced non-small-cell lung cancer: results from the CA209-003 study. *J Clin Oncol* 36: 1875–84
- Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, Bahl S, Cao Y, Amin-Mansour A, Yamauchi M, Sukawa Y, Stewart C, Rosenberg M, *et al.* (2016). Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.*15: 857-65.
- Gnjatic S, Bronte V, Brunet LR, Butler MO, Disis ML, Galon J, Hakansson LG, Hanks BA, Karanikas V, Khleif SN, Kirkwood JM, Miller LD, Schendel DJ, Tanneau I, Wigginton JM, Butterfield LH. (2017). Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J Immunother Cancer.*5:44
- Gogoi H., Mansouri S., Jin L. (2020). The Age of Cyclic Dinucleotide Vaccine Adjuvants. *Vaccines (Basel).*8 : E453.

Goldberg MV, Maris CH, Hipkiss EL, Flies AS, Zhen L, Tudor RM, Grosso JF, Harris TJ, Getnet D, Whartenby KA, Brockstedt DG, Dubensky TW Jr, Chen L, Pardoll DM, Drake CG. (2007). Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*.110 :186-92.

Goldstein N.S. (2006). Small colonic microsatellite unstable adenocarcinomas and high-grade epithelial dysplasias in sessile serrated adenoma polypectomy specimens: a study of eight cases. *Am J Clin Pathol*.125: 132-45

Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, *et al.* (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 359: 97-103

Gordon S.R., Maute R.L., Dulken B.W., *et al.* (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*. 545: 495-499

Goubau D., Deddouche S., Reis e Sousa C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*.38: 855-869

Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. (2003). Interleukin-18. *J Leukoc Biol*. 73: 213-224

Grasso CS, Tsoi J, Onyshchenko M, Abril-Rodriguez G, Ross-Macdonald P, Wind-Rotolo M, *et al.* (2020). Conserved Interferon- $\gamma$  Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell*. S1535-6108: 30416-5.

Gribble FM & Reimann F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*.78: 277-299

Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*. 24 : 242-8

Guinney J., Dienstmann R., Wang X., *et al.* (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21: 1350–56

Günel N, Coskun U, Sancak B, Hasdemir O, Sare M, Bayram O, Celenkoclu G, Ozkan S. (2003). Prognostic value of serum IL-18 and nitric oxide activity in breast cancer patients at operable stage. *Am J Clin Oncol*. 416-21

Guo C, Chen S, Liu W, Ma Y, Li J, Fisher PB, Fang X, Wang XY. (2019). Immunometabolism: A new target for improving cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res*.143 : 195-253.

## H

Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, Guida M, Hyams DM, Gómez H, Bastholt L, Chasalow SD, Berman D. (2011). A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med*.9:204

Hanahan D., Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74

- Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. (1998). CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol.* 161: 4058-65
- Hardison S.E. & Brown G.D. (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol.*13: 817-822
- Harvey N.T., Ruszkiewicz A. (2007). Serrated neoplasia of the colorectum. *World J Gastroenterol.*13: 3792-98
- Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, Zheng XX, Strom TB, Hafler DA, Kuchroo VK. (2009). TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.* 39 : 2492-501
- Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierto PA, Atmaca A, Rizvi NA, Hirsch FR, Selvaggi G, Szustakowski JD, Sasson A, Golhar R, Vitazka P, Chang H, Geese WJ, Antonia SJ. (2018). Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell.*33: 853-861
- Hennig C. (2007). Cluster-wise assessment of cluster stability. *Computational Statistics & Data Analysis* 52: 258-271
- Hennig C. (2008). Dissolution point and isolation robustness: Robustness criteria for general cluster analysis methods. *Journal of Multivariate Analysis* 99:1154-76
- Hennig C. (2015). fpc: Flexible Procedures for Clustering. <https://CRAN.R-project.org/package=fpc>. R package version 2.1-10.
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.*515: 563-7
- Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711–23
- Housseau F., Wu S., Wick E.C., Fan H., Wu X., Llosa N.J., Smith K.N., Tam A., Ganguly S., Wanyiri J.W., Iyadorai T., Malik A.A., Roslani A.C., Vadivelu J.S., Van Meerbeke S., Huso D.L., Pardoll D.M., Sears C.L. (2016). Redundant innate and adaptive sources of IL17 production drive colon tumorigenesis, *Cancer Res.* 76: 2115–24.
- Howitt, M.R. et al. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351: 1329–33
- Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, Eisenbarth SC, Flavell RA. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*107: 21635-40
- Hu B., Ren J., Luo Y., et al. (2017). Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18. *Cell Rep.*20: 3025-33
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66:1123-31

Huang YH, Zhu C, Kondo Y, Anderson AC, Gandhi A, *et al.* (2016). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*. 517: 386-90

Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F. (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol*.25 : 2718-21

Huard B, Prigent P, Pagès F, Bruniquel D, Triebel F. (1996). T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur J Immunol*.26 : 1180-6

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411 :599-603

Hunter CA, Timans J, Pisacane P, *et al.* (1997). Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur J Immunol*.27: 2787-92

## I

IJsselsteijn ME, Sanz-Pamplona R, Hermitte F, de Miranda NFCC. (2019). Colorectal cancer: A paradigmatic model for cancer immunology and immunotherapy. *Mol Aspects Med*.69 :123-129.

Imler J.L., Ferrandon D. (2011). Le printemps de l'immunité innée couronné à Stockholm - Prix Nobel de Médecine 2011 [Innate immunity crowned 2011 Nobel Prize winner]. *Med Sci (Paris)*. 27:1019-24

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 11 : 3887-95

Itoh N. & Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*.268: 10932-937

## J

Jaccard P. (1901). Distribution de la Flore Alpine dans le Bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles*. 37: 241-72

Jamilloux Y & Henry T. (2013). Les inflammasomes - Plates-formes de l'immunité innée [The inflammasomes: platforms of innate immunity]. *Med Sci (Paris)*.29: 975-984.

Jamilloux Y. (2017). Les inflammasomes : de la régulation aux maladies auto inflammatoires. Immunologie. Université de Lyon, France. NNT : 2017LYSE1089. tel-01723498

- Jarry A, Bossard C, Sarrabayrouse G, Mosnier JF, Laboisse CL. (2011). Loss of interleukin-10 or transforming growth factor  $\beta$  signaling in the human colon initiates a T-helper 1 response via distinct pathways. *Gastroenterology*. 141: 1887-96.e1-2.
- Jarry A, Bossard C, Droy-Dupré L, Volteau C, Bourreille A, Meurette G, Mosnier JF, Laboisse CL. (2015). Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN- $\gamma$  axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease. *Lab Invest*. 95 : 1207-17
- Jass J.R., Iino H., Ruzkiewicz A., *et al.* (2000). Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* 47: 43-49.
- Jass J.R. (2001). Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *J Pathol*.193: 283-85
- Jayanna M., Burgess N.G., Singh R., *et al.* (2016). Cost analysis of endoscopic mucosal resection vs surgery for large laterally spreading colorectal lesions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 14: 271-78
- Jensen AB, Larsen M, Gislum M, *et al.* (2006). Survival after colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a nationwide population-based Danish study. *Am J Gastroenterol*.101: 1283-87
- Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthi S, Berman D, Jure-Kunkel M, Siemers NO, Jackson JR, Shahabi V. (2012). An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*.61: 1019-31
- Jiao S, Peters U, Berndt S, *et al.* (2014). Estimating the heritability of colorectal cancer. *Hum Mol Genet*.23:3898-05
- Jin T., Perry A., Jiang J., *et al.* (2012). Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*.36: 561-571
- Josse ME, Nederlof I, Walker LSK, Samsom JN. (2019). Tipping the balance : inhibitory checkpoints in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*.12 : 21-35
- Jorgensen I & Miao EA. (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev*.265:130-142
- Junger W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 11:201-12

## K

- Kaiser BK, Pizarro JC, Kerns J, Strong RK. (2008). Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(18):6696-701
- Kakar S & Smyrk TC. (2005). Signet ring cell carcinoma of the colorectum: correlations between microsatellite instability, clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol.* 18: 244-9
- Kaplanski G. (2018). Interleukin-18 : Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 281 : 138-153
- Karagiannis G.S., Poutahidis T., Erdman S.E., Kirsch R., Riddell R.H., Diamandis E.P. (2012). Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol. Cancer Res.*10: 1403–18
- Karan D. (2018). Inflammasomes : Emerging Central Players in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Front Immunol.*9:3028
- Karki R, Man SM, Kanneganti TD. (2017). Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol Res.*5:94-99
- Kather JN, Halama N, Jaeger D. (2018). Genomics and emerging biomarkers for immunotherapy of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol.* 52:189-197
- Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 26 :677-704
- Kerur N., Veetil M.V., Sharma-Walia N., et al. (2011). IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe.*9: 363-375
- Khan S.T., Montroy J., Forbes N., et al. (2020). Safety and efficacy of autologous tumour cell vaccines as a cancer therapeutic to treat solid tumours and haematological malignancies: a meta-analysis protocol for two systematic reviews. *BMJ Open.*10:e034714
- Kitsou M, Ayiomamitis GD, Zaravinos A. (2020). High expression of immune checkpoints is associated with the TIL load, mutation rate and patient survival in colorectal cancer. *Int J Oncol.*57: 237-248
- Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al. (1997). IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol.*158: 1541-50
- Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, et al. (2000). Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A.*97: 1190-95
- Kim E.K. & Choi E-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis.*1802: 396–405

Knodler LA, Crowley SM, Sham HP, *et al.* (2014). Noncanonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*.16: 249-256

Kostic A.D., Chun E., Robertson L., *et al.* (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14: 207–15

Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, *et al.* (1989). Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.86: 5227-31

Kuhnert F., Davis C.R., Wang H.T., *et al.* (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *PNAS* 101: 266-71

Kuida K, Lippke JA, Ku G, *et al.* (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*.267: 2000-03

Kurashima Y & Kiyono H. (2017). Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annu Rev Immunol*.35:119-147

Kwong T.N.Y., Wang X., Nakatsu G., *et al.* (2018). Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 155: 383–90

## L

Lange C., Hemmrich G., Klostermeier U.C., *et al.* (2011). Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution. *Mol Biol Evol*.28: 1687-1702

Landman C., Quéverain E. (2016). Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiologique. *La revue de médecine interne* 37 : 418-23

Lanza G, Gafà R, Matteuzzi M, Santini A. (1999). Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel : a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol*.17 : 2429-38

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2 :261-8

Lazaridis LD, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis EJ, *et al.* (2017). Activation of NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Differences Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*.62: 2348-56

Lazarus R., Junttila O.E., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. (2005). The risk of metachronous neoplasia in patients with serrated adenoma. *Am J Clin Pathol*.123: 349-59

- Le DT, Durham JN, Smith KN, *et al.* (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357: 409–13.
- Le DT, Uram JN, Wang H, *et al.* (2015). PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372: 2509–20
- Lecomte T, Andre T, Bibeau F, Blanc B, Cohen R, Lagasse JP, Laurent-Puig P, Martin-Babau J, Panis Y, Portales F, Taieb J, Vaillant E. (Janvier 2019). « Cancer du colon non metastatique » *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*. [En ligne] [<https://www.snfge.org/tncd> et <http://www.tncd.org>]
- Lee HO, Hong Y, Etliloglu HE, Cho YB, Pomella V, Van den Bosch B, Vanhecke J, *et al.* (2020). Lineage-dependent gene expression programs influence the immune landscape of colorectal cancer. *Nat Genet.*52:594-603
- Leslie N. R. and Downes C. P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J.* 382: 1–11.
- Lesterhuis W.J., Haanen J.B., Punt C.J. (2011). Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov.*10 : 591-600
- Levy E.M., Bianchini M., Von Euw E.M., *et al.* (2008). Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol.*32: 633-41.
- Li J., Hu L., Liu Y., *et al.* (2015). DDX19A Senses Viral RNA and Mediates NLRP3-Dependent Inflammasome Activation. *J Immunol.*195: 5732-49
- Li P, Allen H, Banerjee S, *et al.* (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.*80: 401-411
- Li X, Wang R, Fan P, Yao X, Qin L, Peng Y, Ma M, Asley N, Chang X, Feng Y, Hu Y, Zhang Y, Li C, Fanning G, Jones S, Verrill C, *et al.* (2019). A Comprehensive Analysis of Key Immune Checkpoint Receptors on Tumor-Infiltrating T Cells From Multiple Types of Cancer. *Front Oncol.*9:1066.
- Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature.*535:153-158
- Liu R, Truax AD, Chen L, Hu P, Li Z, Chen J, Song C, Chen L, Ting JP. (2015). Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. *Oncotarget.* 6:33456-69
- Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser RL, *et al.* (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 5: 43-51
- Lopez-Castejon G. & Brough D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22: 189-95
- Loree JM, Pereira AAL, Lam M., *et al.* (2018). Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 24: 1062–72

Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol.* 188 : 3869-75

Ludwiczek O, Kaser A, Novick D, Dinarello CA, Rubinstein M, Tilg H. (2005). Elevated systemic levels of free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw.*16: 27-33.

Lupfer C.R., Rippee-Brooks M.D0, Anand P.K. (2019). Common Differences: The Ability of Inflammasomes to Distinguish Between Self and Pathogen Nucleic Acids During Infection. *Int Rev Cell Mol Biol.*344: 139-172

## M

Ma B., Gao P., Wang H., *et al.* (2017). What has preoperative radio(chemo)therapy brought to localized rectal cancer patients in terms of perioperative and long-term outcomes over the past decades? A systematic review and meta-analysis based on 41,121 patients. *Int J Cancer.* 141: 1052-65

Macpherson AJ., Harris NL. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 478–85.

Maekawa T., Kracher B., Vernaldi S., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. (2012). Conservation of NLR-triggered immunity across plant lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*109: 20119-123

Man SM, Zhu Q, Zhu L, Liu Z, Karki R, Malik A, Sharma D, Li L, Malireddi RK, Gurung P, Neale G, *et al.* (2015). Critical Role for the DNA Sensor AIM2 in Stem Cell Proliferation and Cancer. *Cell.*162: 45-58.

Man SM & Kanneganti TD. (2016). Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol.*16: 7-21

Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. (2009). Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods.*346: 55-63

Manfredi S., Bouvier A.M., Lepage C., Hatem C., Dancourt V., Faivre J. (2006). Incidence and patterns of recurrence after resection for cure of colonic cancer in a well-defined population. *Br J Surg.* 93: 1115-22

Marisa L, de Reyniès A, Duval A, *et al.* (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.*10: e1001453

Markman, B., Javier Ramos, F., Capdevila, J. and Tabernero, J. (2010). EGFR and KRAS in colorectal cancer. *Adv. Clin. Chem.* 51: 71–119.

Martinez F.O., Gordon S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Report* 6: 6–13.

- Martinon F., Burns K., Tschopp J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*.10: 417-426
- Martinon F. & Tschopp J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*.117:561-574
- Martinon F & Tschopp J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*.26:447-454
- Martinon F., Mayor A., Tschopp J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 27: 229-265
- Martone T, Bellone G, Pagano M, Beatrice F, Palonta F, Emanuelli G, Cortesina G. (2004). Constitutive expression of interleukin-18 in head and neck squamous carcinoma cells. *Head Neck*.26: 494-503
- Marzouk O & Schofield J. (2011). Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers*.3: 2767-810.
- Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, *et al.* (1999). ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*.274: 33835-838
- Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, Luke JJ, Gajewski TF. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*.359: 104-108
- Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. (2011). Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*.4: 53-61
- Mayor A., Martinon F., De Smedt T, Petrilli V., Tschopp J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol*.8: 497–503.
- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 1: 135-145
- Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee KH, Liu YJ, Bayir E, Iliopoulos D, van den Elsen PJ, Kobayashi KS. (2010). NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.107: 13794-9
- Merendino RA, Gangemi S, Ruello A, Bene A, Losi E, Lonbardo G, Purello-Dambrosio F. (2001). Serum levels of interleukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Markers*.16: 126-9
- Mezheyeuski A., Bradic Lindh M., Guren T.K., *et al.* (2016). Survival-associated heterogeneity of marker-defined perivascular cells in colorectal cancer. *Oncotarget* 7: 41948-58.
- Mitoma H., Hanabuchi S., Kim T., *et al.* (2013). The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome. *Immunity*.39: 123-135
- Mlecnik B., Tosolini M., Kirilovsky A., *et al.* (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*.29: 610-18

Mlecnik B., Bindea G., Angell H.K., *et al.* (2016). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*.44: 698-711

Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ, Kuchroo VK. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*.415 : 536-41

Moreau M.C. (2004). « Influence de la microflore intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques », in Rambaud JC *et al.*, *Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives*, France : John Libbey Eurotext, 2004 ; 131-35. ISBN 2-7420-0512-9

Morrone SR, Wang T, Constantoulakis LM, Hooy RM, Delannoy MJ, Sohn J. (2014). Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*.111: E62-E71

Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*.469: 125-134

## N

Nagler-Anderson C. (2001). Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol*.1:59-67

Nagorsen D., Voigt S., Berg E., Stein H., Thiel E., Loddenkemper C. (2007). Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med*. 5: 62

Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. (1989). Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun*.57: 590-595

Nakatsu G., Li X., Zhou H., *et al.* (2015). Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun* 6: 8727.

Nap M., Mollgard K., Burtin P., Fleuren G.J. (1988). Immunohistochemistry of Carcino-Embryonic Antigen in the Embryo, Fetus and Adult. *Tumor Biol*.9: 145-153

Nesh AS. (2002). The gut microbiota and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microb Infect* 4: 309 – 17

Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, *et al.* (2017). Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *J Exp Med*.214: 1737-52

Nikiteas N, Yannopoulos A, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. (2007). Heterozygosity for interleukin-18 -607 A/C polymorphism is associated with risk for colorectal cancer. *Anticancer Res*. 27:3849-53

Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, Lemoine Y, Hot D, Chamaillard M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*.108: 9601-6

Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*.10: 127-136

## O

Ogino S., Nosho K., Irahara N., Meyerhardt J.A., Baba Y., Shima K., Glickman J.N., Ferrone C.R., Mino-Kenudson M. *et al.* (2009). Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*.15: 6412-20

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*.411: 603-606

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, *et al.* (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*.378: 88-91

Okamoto M, Azuma K, Hoshino T, Imaoka H, Ikeda J, Kinoshita T, Takamori S, Ohshima K, Edakuni N, Kato S, Iwanaga T, Aizawa H. (2009). Correlation of decreased survival and IL-18 in bone metastasis. *Intern Med*.48: 763-73

Olive D. (2006). Corécepteurs lymphocytaires [Lymphocyte coreceptors]. *Med Sci (Paris)*. 22: 1069-74.

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*.446: 685-9

Oono Y., Fu K., Nakamura H., *et al.* (2009). Progression of a sessile serrated adenoma to an early invasive cancer within 8 months. *Dig Dis Sci*. 54: 906-09

Orengo AM, Fabbi M, Miglietta L, Andreani C, Bruzzone M, Puppo A, Cristoforoni P, Centurioni MG, Gualco M, Salvi S, Boccardo S, Truini M, Piazza T, Canevari S, Mezzanzanica D, Ferrini S. (2011). Interleukin (IL)-18, a biomarker of human ovarian carcinoma, is predominantly released as biologically inactive precursor. *Int J Cancer*.129: 1116-25

Ott E, Bilonda L, Dansette D, Deleine C, Duchalais E, Podevin J, Volteau C, Bennouna J, Touchefeu Y, Fourquier P, *et al.* (2019). The density of Tbet+ tumor-infiltrating T lymphocytes reflects an effective and druggable preexisting adaptive antitumor immune response in colorectal cancer, irrespective of the microsatellite status. *Oncoimmunology*.8: e1562834

Overman M.J., McDermott R., Leach J.L., *et al.* (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18: 1182–91.

## P

- Pagès F, Berger A, Henglein B, Piqueras B, Danel C, Zinzindohoue F, Thiounn N, Cugnenc PH, Fridman WH. (1999). Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. *Int J Cancer*.84:326-30
- Pagès F, Berger A, Camus M, et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*.353:2654-66
- Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*.391: 2128-39
- Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S, Mazza EM, et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*.12 : 870-8
- Pandey, A., Shen, C., & Man, S. M. (2019). Inflammasomes in Colitis and Colorectal Cancer: Mechanism of Action and Therapies. *The Yale journal of biology and medicine*.92: 481–98.
- Parang, B., Barrett, C. W., & Williams, C. S. (2016). AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1422, 297–307
- Parkhurst M.R., Yang J.C., Langan R.C., et al. (2011). T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*.19: 620-26
- Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, Palmer DC, Boni A, Muranski P, Yu Z, Gattinoni L, Antony PA, Rosenberg SA, Restifo NP. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest*. 117 : 2197-204
- Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas T, Bluestone J, Listman J, Finn PW. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol*. 156 : 4154-9
- Platnich JM. & Muruve DA. (2019). NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys*. 670:4-14
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. & Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev*. 17: 1709–13
- Poock H., Bscheider M., Gross O., et al. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*.11: 63-69
- Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. (1999). Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.96: 2256-61

## R

Ranson N, Veldhuis M, Mitchell B, *et al.* (2018). NLRP3-Dependent and -Independent Processing of Interleukin (IL)-1 $\beta$  in Active Ulcerative Colitis. *Int J Mol Sci.*20: 57

Ratsimandresy R.A., Dorfleutner A., Stehlik C. (2013). An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Front Immunol.*4: 440

Raza A., Franklin M., Dudek A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.*85: 593–98

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, *et al.* (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.*348: 124-8

Robert C., Long G.V., Brady B. *et al.* (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.*372: 320–30.

Rodriguez GM, Bobbala D, Serrano D, Mayhue M, Champagne A, Saucier C, Steimle V, Kufer TA, Menendez A, Ramanathan S, Ilangumaran S. (2016). NLRC5 elicits antitumor immunity by enhancing processing and presentation of tumor antigens to CD8(+) T lymphocytes. *Oncoimmunology.*5: e1151593

Rosenberg SA, Restifo NP. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science.*348 : 62-68.

Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, *et al.*, 2016. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.*387: 1909-20

Rosenthal R., Cadieux E.L., Salgado R., *et al.* (2019). Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature.*567: 479-85.

Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, *et al.* (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science.*359: 91-97

## S

Saeki N, Kuwahara Y, Sasaki H, Satoh H, Shiroishi T. (2000). Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mamm Genome.*11: 718-24

Salama P., Phillips M., Grieu F., Morris M., Zeps N., Joseph D., Platell C., Iacopetta B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27: 186–92

Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, Wang E, Ma W, Haines D, O'Uigin C, Marincola FM, Trinchieri G. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med.*207: 1625-36

Saleh M, Green DR. (2007). Caspase-1 inflammasomes: choosing between death and taxis. *Cell Death Differ.*14: 1559-60

Sandel M.H., Speetjens F.M., Menon A.G., Albertsson P.A., Basse P.H., Hokland M., Nagelkerke J.F., Tollenaar R.A., van de Velde C.J., Kuppen P.J. (2005) (a). Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol. Immunol.* 42: 541–46.

Sandel M.H., Dadabayev A.R., Menon A.G., *et al.* (2005) (b). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res.* 11: 2576-82

Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S. (2016). Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med.* 22: 679-84.

Scheer JM. (2013). « Chapter 505 - Caspase-1», in Rawlings ND and Salvesen G., *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*. Academic Press, 2013 ; 2237-43. ISBN 9780123822192

Schetinger M.R., Morsch V.M., Bonan C.D., Wyse A.T. (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors.*31: 77-98

Schramme F, Crosignani S, Frederix K, Hoffmann D, Pilotte L, Stroobant V, Preillon J, Driessens G, Van den Eynde BJ. (2020). Inhibition of Tryptophan-Dioxygenase Activity Increases the Antitumor Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Immunol Res.*8: 32-45

Schreiber RD., Old LJ., Smyth MJ. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-70

Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, Miller VA, Lim D, Amanam I, Chao J, Catenacci D, Cho M, Braitheh F, Klempner SJ, Ali SM, Fakih M. (2019). Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 30: 1096-1103

Schumacher T.N., Schreiber R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348: 69-74.

Sconocchia G., Eppenderberg S., Spagnoli G.C., Tornillo L., Drosler R., Caratelli S., Ferrelli F., Coppola A., Arriga R., Lauro D., Iezzi G., Terracciano L., Ferrone S. (2014). NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer, *Oncoimmunology* 3: 1–6

Sellin ME, Müller AA, Felmy B, *et al.* (2014). Epithelium-intrinsic NAIP/NLRC4 inflammasome drives infected enterocyte expulsion to restrict Salmonella replication in the intestinal mucosa. *Cell Host Microbe.*16: 237-248

- Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. (2007). The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem.* 282: 36321-29
- Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.*8: 239-245
- Shi J, Gao W, Shao F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.*42: 245-254
- Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. (2001). IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*98: 13249-54
- Siegmund B. (2010). Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity.* 32 : 300-2
- Simon S. & Labarriere N. (2017a). PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology.* 7: e1364828
- Simon S, Vignard V, Varey E, Parrot T, Knol AC, Khammari A, Gervois N, Lang F, Dreno B, Labarriere N. (2017b). Emergence of High-Avidity Melan-A-Specific Clonotypes as a Reflection of Anti-PD-1 Clinical Efficacy. *Cancer Res.*77: 7083-93
- Singh B. & Coffey RJ. (2014). Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annu Rev Physiol.* 76: 275-300
- Sivick KE, Desbrien AL, Glickman LH, Reiner GL, Corrales L, Surh NH, Hudson TE, Vu UT, Francica BJ, Banda T, Katibah GE, Kanne DB, Leong JJ, Metchette K, Bruml JR, Ndubaku CO, McKenna JM, Feng Y, Zheng L, Bender SL, Cho CY, Leong ML, van Elsas A, Dubensky TW Jr, McWhirter SM. (2018). Magnitude of Therapeutic STING Activation Determines CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* 25: 3074-85
- Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, *et al.* (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med.*371:2189-2199
- Song L, Pei L, Yao S, Wu Y, Shang Y. (2017). NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Front Cell Neurosci.*11:63
- Sözen S, Coskun U, Sancak B, Bukan N, Günel N, Tunc L, Bozkirli I. (2004). Serum levels of interleukin-18 and nitrite+nitrate in renal cell carcinoma patients with different tumor stage and grade. *Neoplasma.*51: 25-9
- Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem.*277: 21119-122.
- Stratmann SA, Morrone SR, van Oijen AM, Sohn J. (2015). The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *Elife.*4: e11721
- Symonds DA & Vickery AL. (1976). Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer.*37: 1891-1900.

Syngal S, Brand RE, Church JM, *et al.* (2015). ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 110: 223–62

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*.100: 655-69

## T

Tada K, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Katayama N, Boku N, Heike Y, Hamaguchi T. (2016). Pretreatment Immune Status Correlates with Progression-Free Survival in Chemotherapy-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancer Immunol Res.* 4: 592-9

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*.339: 1277-84

Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 4 : 127ra37

Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 20:5064-74

Théate I, van Baren N, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renauld JC, Hervé C, Gutierrez-Roelens I, Marbaix E, Sempoux C, Van den Eynde BJ. (2015). Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res.* 3 : 161-72

Thong-Ngam D, Tangkijvanich P, Lerknimitr R, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. (2006). Diagnostic role of serum interleukin-18 in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol*.12: 4473-7

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*.356:768-774

Tian H. *et al.* (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep.* 11: 33–42

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*.3 : 541-7

Tosolini M., Kirilovsky A., Mlecnik B., Fredriksen T., Mauger S., Bindea G., Berger A., Bruneval P., Fridman W.H., Pagès F., Galon J. (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: 1263–71

Tourkochristou E, Aggeletopoulou I, Konstantakis C, Triantos C. (2019). Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*.25: 4796-04

Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. (1990). LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*.171: 1393-405

Trinchieri G. & Sher A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*.7: 179-190

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, *et al.* (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*.515: 568-71

## V

Vallabhapurapu S & Karin M. (2009). Function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*.27: 693–733.

Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324: 1029-33.

Vasquez-Dunddel D., Pan F., Zeng Q., Gorbounov M., Albesiano E., Fu J., Blosser R.L., Tam A.J., Bruno T., Zhang H., Pardoll D., Kim Y. (2013). STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J. Clin. Invest*.123: 1580–89

Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol*. 19: 108-119

Venook AP., Niedzwiecki D., Innocenti F., *et al.* (2016). Impact of primary tumor location on overall survival and progression-free survival in patients with metastatic colorectal cancer: analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 34: 3504.

Vermorken J.B., Claessen A.M., van Tinteren H., *et al.* (1999). Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*.353: 345-350

Von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E. & Locksley, R.M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225 (2015).

## W

Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*.183 : 2541-50

Wang ZY, Gaggero A, Rubartelli A, Rosso O, Miotti S, Mezzanzanica D, Canevari S, Ferrini S. (2002). Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells. *Int J Cancer*.98: 873-8

Wherry E.J., Kurachi M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.*15: 486-99

Williams TM, Leeth RA, Rothschild DE, Coutermarsh-Ott SL, McDaniel DK, Simmons AE, Heid B, Cecere TE, Allen IC. (2015). The NLRP1 inflammasome attenuates colitis and colitis-associated tumorigenesis. *J Immunol.*194: 3369-80

Wilson DR, Sen R, Sunshine JC, Pardoll DM, Green JJ, Kim YJ. (2018). Biodegradable STING agonist nanoparticles for enhanced cancer immunotherapy. *Nanomedicine.*14 : 237-246.

Wilson JE, Petrucelli AS, Chen L, Koblansky AA, Truax AD, Oyama Y, Rogers AB, Brickey WJ, Wang Y, *et al.* (2015). Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nat Med.*21: 906-13

Winton D. J., Blount M. A. & Ponder B. A. (1988). A clonal marker induced by mutation in mouse intestinal epithelium. *Nature* **333**, 463–66

Wong SH & Yu J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*16: 690-704

Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. (2018). Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 11: 3-20

## X

Xia X, Wang X, Cheng Z, Qin W, Lei L, Jiang J, Hu J. (2019). The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-"host"? *Cell Death Dis.*10 : 650

## Y

Yao S, Wang S, Zhu Y, Luo L, Zhu G, Flies S, Xu H, Ruff W, Broadwater M, Choi IH, Tamada K, Chen L. (2009). PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood.* 113 :5811-8

Yeku O.O., Brentjens RJ. (2016). Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans.*44:412-18

Yoshihama S, Roszik J, Downs I, Meissner TB, Vijayan S, Chapuy B, Sidiq T, Shipp MA, Lizee GA, Kobayashi KS. (2016). NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.*113: 5999-6004

Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, *et al.* (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol.*10:48-57

## Z

Zajac A.J., Blattman J.N., Murali-Krishna K., et al. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.*18: 2205-13

Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. (2010a). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol.*185: 4912-20

Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. (2010b). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol.*185: 4912-20

Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, Zhu J, Wei H, Zhao K. (2013). Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One.*8: e57114

Zhang C., Wang Z., Yang Z., et al. (2017). Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA<sup>+</sup> Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther.*25: 1248-58.

Zhu J., Yamane H., Paul W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.*28: 445–89

Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Sun Z, Zaghouani S, Gu G, Wang C, Tan DJ, Wu C, Rangachari M, Pertel T, Jin HT, Ahmed R, Anderson AC, Kuchroo VK. (2015). An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nat Commun.* 6 : 6072

Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, et al. (2015). Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci Transl Med.* 7:271ps1

**Titre :** Rôle de l'inflammasome des cellules tumorales dans l'immunosurveillance des cancers colorectaux par les lymphocytes T infiltrant la tumeur

**Mots clés :** Cancer colorectal, lymphocytes T infiltrant la tumeur, réponse Th1/Tc1, inflammasome, immunothérapie, modèle *ex vivo* de culture d'explants

**Résumé :** Dans les cancers colorectaux (CCR), les interactions entre cellules tumorales et lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) jouent un rôle majeur, étant donné l'impact pronostique des TILs et d'une signature transcriptomique Th1/Tc1. La présence de points de contrôle immunitaire capables de contrecarrer cette réponse Th1/Tc1 anti-tumorale dans les tumeurs solides a été à l'origine du développement de l'immunothérapie, qui, bien que prometteuse dans les CCR, n'est efficace que dans un sous-groupe minoritaire de patients ayant une instabilité microsatellitaire (MSI). D'où la nécessité de développer des biomarqueurs, facilement utilisables en routine clinique, prédictifs d'une réponse Th1/Tc1 et de la réponse aux immunothérapies, et de déterminer des voies de signalisation susceptibles de réactiver une réponse immunitaire déficiente. Un candidat potentiel est l'inflammasome, plateforme de l'immunité innée dont la protéine effectrice est la caspase-1, qui peut maturer l'IL-18 et générer une réponse Th1/Tc1/IFN $\gamma$ . Bien que l'inflammasome ait un rôle émergent en immuno-oncologie, son statut et son rôle modulateur de la réponse Th1/Tc1 n'est pas connue dans les CCR.

Notre étude est basée sur l'exploitation de cohortes de CCR rétrospective et prospective, en collaboration avec les Cliniciens du CHU de Nantes, ainsi que sur un modèle *ex vivo* de cultures d'explants de CCR que nous avons développé, couplé à des analyses multiparamétriques.

Nous montrons que le facteur de transcription Tbet est un biomarqueur 1) pronostique et prédictif d'une réponse Th1/Tc1/IFN $\gamma$  préexistante dans les CCR, facilement analysable en routine clinique et 2) prédictif de la réponse aux immunothérapies, tout au moins dans le modèle de culture d'explants. Cette réponse Th1/Tc1 est modulée par l'axe caspase-1/IL-18 de l'inflammasome, qui est présent dans les cellules tumorales de la majorité des CCR. De plus, nous identifions trois sous-groupes de CCR en fonction de l'axe caspase-1/IL-18/TILs Tbet+/IFN $\gamma$  et du statut microsatellitaire, dont l'impact pronostique sera évalué.

Nos résultats suggèrent que les cellules tumorales des CCR sont des cellules de l'immunité innée, capables de moduler la réponse Th1/Tc1 des TILs via l'axe caspase-1/IL-18 de leur inflammasome. Cet axe pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour améliorer la réponse Th1/Tc1 dans les CCR.

**Title :** The inflammasome of tumor cells in colorectal cancer : status and role in modulating tumor infiltrating T lymphocytes (TILs)

**Keywords :** Colorectal cancer, tumor infiltrating T lymphocytes, Th1/Tc1 response, inflammasome, immunotherapy, *ex vivo* explant culture model

**Abstract :** In colorectal cancer (CRC), interactions between tumor cells and tumor infiltrating T lymphocytes (TILs) play a major role, given the favorable prognostic impact of a high TILs density and an upregulated Th1/Tc1 gene signature in subtypes of CRC. This Th1/Tc1 response can be counterbalanced by the presence of immune checkpoints whose characterization led to the development of novel immunotherapeutic strategies that revolutionized cancer treatment in some solid tumors. In CRC however, immune checkpoint inhibitors led to objective and durable response only in a minority of CRC with microsatellite instability (MSI). There is a need for biomarkers that can be easily assessed *in situ* and predictive of a Th1/Tc1 response and of the response to immunotherapies, as well as for signaling pathways able to reactivate a deficient anti-tumor immune response. A candidate can be the inflammasome, an innate immunity platform whose effector protein, caspase-1, can mature IL-18 and lead to the generation of a Th1/Tc1/IFN $\gamma$  response. The inflammasome is an emerging central player in cancer immunology and immunotherapy; however, its status and role in modulating a Th1/Tc1 response in CRC is so far unknown.

Our study was based on retrospective and prospective cohorts of CRC patients, in close collaboration with the Clinicians of Nantes University Hospital, and on an *ex vivo* explant culture model of CRC we developed, coupled to multiparametric analyses.

We demonstrated that the transcription factor Tbet that can be easily assessed *in situ*, is a prognostic biomarker in CRC, predictive of a pre-existing Th1/Tc1 response and also predictive of the response to immunotherapies, at least in the explant culture model. The Th1/Tc1/IFN $\gamma$  response of TILs can be facilitated by the caspase-1/IL-18 axis present in the tumor cells of the majority of CRC. In addition, we identified clusters of patients according to the caspase-1/IL-18/ Tbet+ TILs /IFN $\gamma$  axis and microsatellite status of CRC, whose prognostic impact will be assessed.

Thus, CRC tumor cells can be considered as innate immune cells that display a functional caspase-1/IL-18 axis, part of the inflammasome pathway, able to modulate an adaptive Th1/Tc1 anti-tumor response in subgroups of CRC patients. Targeting this axis would be a promising strategy to boost the Th1/Tc1 response in CRC.