# Etude des mécanismes d'action d'une immunothérapie par un triacyl lipide A chez l'homme

Nicolas Isambert

▶ **To cite this version:**

Nicolas Isambert. Etude des mécanismes d'action d'une immunothérapie par un triacyl lipide A chez l'homme. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOMU03 . tel-00967908

**HAL Id: tel-00967908**

**https://theses.hal.science/tel-00967908**

Submitted on 31 Mar 2014

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

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

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R. DE MEDECINE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

**THESE**

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE DE L'ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

ET DOCTEUR EN MEDECINE DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

par

**NICOLAS ISAMBERT**

Soutenance publique le 11 octobre 2013

# ETUDE DES MECANISMES D'ACTION D'UNE IMMUNOTHERAPIE PAR UN TRIACYL LIPIDE A CHEZ L'HOMME

**Membre du jury**

| | |
|---|---|
| Pr Carole ELBIM | Rapporteur |
| Pr Frédérique PENAULT LLORCA | Rapporteur |
| Pr Danièle LACASA | Examinateur |
| Dr Catherine PAUL | Examinateur |
| Pr Jean-François JEANNIN | Co directeur |
| Pr Pierre FUMOLEAU | Co directeur |

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord je souhaiterais remercier les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs ou examinateurs :

- Madame le Professeur **Carole Elbim** du Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire à Université Paris VI Pierre et Marie Curie - INSERM UMR-S 945 -Paris
- Madame le Professeur **Frédérique Penault-Llorca** du Centre Jean Perrin à Clermont-Ferrand
- Madame le Professeur **Danièle Lacasa** du Centre de Recherches des Cordeliers - U872 équipe 7 Nutriomique -Paris
- Madame le Docteur **Catherine Paul** du Laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers, Faculté de Médecine et Pharmacie à Dijon
- Monsieur le Professeur **Jean-François Jeannin** du Laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers, Faculté de Médecine et Pharmacie à Dijon
- Monsieur le Professeur **Pierre Fumoleau**, Directeur du Centre Georges-François Leclerc à Dijon

Je remercie également chaleureusement

Monsieur le Docteur **Laurent Lagrost**, Directeur de l'unité INSERM U866.

**Jean-François Jeannin** d'avoir accepté de m'accueillir au sein de l'EPHE et permis d'intégrer son équipe dont il était le directeur au début de ma thèse. Après quelques mois de solitude au début de ce travail, à essayer en vain d'écrire une histoire comme vous me l'avez si souvent répété, celle-ci a progressivement pris forme. Je vous remercie pour votre disponibilité et pour tout le temps que vous avez consacré à me donner des conseils, à faire partager vos connaissances lors de nos discussions et surtout de m'avoir apporté votre confiance bien au-delà de ce travail. J'espère que nous pourrons mener à bien nos autres projets et poursuivre notre collaboration privilégiée via une notion qui vous tient à cœur : la recherche de transfert. Encore merci.

**Ali Bettaïeb** pour son soutien, sa bonne humeur et ses critiques vis-à-vis de mon travail.

**Catherine Paul.** Un grand merci à toi. Tout d'abord d'avoir cru que je pouvais mener ce travail à son terme, même si je sais que tu aurais aimé aller plus loin. Mais ce n'est pas encore totalement terminé. Au cours de ces années passées à m'encadrer, tu as su me transmettre une partie de tes connaissances et apprendre à regarder sous un angle différent que celui du clinicien, ces fameux polynucléaires neutrophiles autrement qu'à travers un résultat de laboratoire d'analyses médicales autorisant ou pas l'administration des chimiothérapies. J'ai appris grâce à toi à les considérer comme des alliés potentiels pour le traitement de nos patients. Merci aussi d'avoir su me remotiver quand il le fallait. J'espère que notre collaboration continuera au-delà du 11 octobre.

**Pierre Fumoleau,** Directeur du Centre Georges-François Leclerc de m'avoir tout d'abord enseigné l'art des études de phases I et de m'avoir ensuite confié la responsabilité de l'Unité de Phases Précoces. Mes connaissances scientifiques n'ont cessé de s'enrichir à vos côtés. Je vous remercie aussi de m'avoir incité à débuter ce travail de thèse et de m'avoir soutenu et motivé tout au long de sa réalisation. Vous m'avez toujours conseillé de regarder vers l'avant, et d'y croire. J'ai donc suivi vos conseils qui m'ont permis d'avancer. Encore merci pour votre soutien et votre confiance.

**Laurent Arnould**, pour le temps passé ensemble à regarder des lames, ce que je n'avais précédemment fait que lors de travaux pratiques lors de mes études de Médecine. Tu m'as appris que l'on pouvait regarder des lames autrement qu'à travers un microscope. Tu as toujours répondu présent quand j'avais besoin de conseils et je t'en remercie vivement. Je te le promets, je ferai de la publicité pour ta spécialité auprès des étudiants en Médecine.

**Cédric et Amandine,** qui ont ouvert la voie à ce travail et m'ont formé à plusieurs techniques, tout en m'aidant à trouver les produits qui avaient sans cesse disparus des placards.

**Romain**, pour m'avoir formé à la q-PCR et me laisser « maniper ». Tu as remarqué que j'étais beaucoup plus lent que toi pour remplir une plaque. Merci pour ton expertise et ton aide dans l'interprétation de mes résultats.

**André et Amandine**, pour m'avoir laissé libre accès à leurs locaux lors de mes immunomarquages, ainsi que pour leurs précieux conseils.

**Jérôme**, pour son talent en informatique et plus particulièrement pour l'acquisition des images avec le microscope à fluorescence.

**Cindy.** Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur permanente.

**Alessandra** pour tous ces conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

**Tous les membres de l'équipe du Laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers.**

L'équipe de l'Unité de Phases Précoces du Centre Georges-François Leclerc, et plus particulièrement, **Peggy, Hélène, Véronique, Céline, Pascale et Nathalie** pour leur implication dans leur travail. Sans elles, la qualité des phases précoces menées dans l'unité ne serait pas ce qu'elle est. Merci pour votre soutien et d'avoir supporté mon stress et mes changements d'humeur au quotidien. Merci aussi à **Christelle** qui a préféré le soleil du sud au brouillard dijonnais. Promis, je vais bientôt enlever mes lames du réfrigérateur.

**Karine.** Merci pour ta bonne humeur, ainsi que d'avoir toujours répondu avec le sourire à mes multiples sollicitations.

Enfin,

**Mes parents.** Merci de m'avoir soutenu et encouragé jusqu'à aujourd'hui. Merci de m'avoir donné les moyens d'en être là aujourd'hui, de votre compréhension et de votre patience. Je vous témoigne toute mon affection.

Ma sœur **Stéphanie** et sa petite famille qui ont toujours été présentes près de moi.

**Carole,** ma moitié**,** pour qui toute mon affection est destinée**.** Je te remercie de m'avoir toujours soutenu même dans les moments les plus difficiles et d'avoir supporté ces nombreuses soirées et week-end à passer à travailler. Ta présence à mes côtés au quotidien est un vrai bonheur. Je sais que je peux toujours compter sur toi.

Mes enfants, **Marion, Baptiste et Thomas** qui n'ont toujours pas compris que l'on pouvait encore être étudiant à mon âge.

**Tous mes amis.**

# SOMMAIRE

**LISTE DES ABBREVIATIONS** 12

**LISTE DES FIGURES** 15

**LISTE DES TABLEAUX** 17

**INTRODUCTION** 19

I. **Généralité sur le cancer** 20

A. Epidémiologie 21

B. Principes généraux du traitement 21

C. Les différentes stratégies d'immunothérapie anticancéreuse 22

**II. Immunité innée, polynucléaires neutrophiles et prolifération tumorale** 24

A. Généralités sur le système immunitaire inné 25

B. Les cellules du système immunitaire inné 25

C. Les récepteurs des cellules effectrices du système immunitaire inné 26

D. Le polynucléaire neutrophile 29

a. Formation des polynucléaires neutrophiles 29

b. La migration des polynucléaires neutrophiles 30

c. Rôle physiologique des polynucléaires neutrophiles 31

d. Les médiateurs produits par le polynucléaire neutrophile 33

E. Recrutement des polynucléaires neutrophiles dans la tumeur 35

F. Cytotoxicité des polynucléaires neutrophiles vis-à-vis des cellules Tumorales 36

G. Polynucléaires neutrophiles et croissance tumorale 37

a. Implication dans la progression tumorale 37

b. Implication dans la régression tumorale 38

H. Polynucléaires neutrophiles et traitement anti cancéreux chez l'homme 38

**III. Immunothérapie par des agents bactériens** 40

A. Lipopolysaccharides et réponse biologique 40

a. Structure des lipopolysaccharides 40

b. Effets toxiques des lipopolysaccharides 42

B. Lipopolysaccharides et réponse immunologique anti tumorale: immunothérapie par les lipopolysaccharides 43
C. Lipide A 44
a. Propriétés biologiques des lipides A 44
b. Récepteur TLR4 44
c. Effets du lipide A et réponse immunologique anti tumorale: immunothérapie par les lipides A 44
D. Le Triacyl lipide A OM-174 46
a. Structure de l'OM-174 46
b. Immunothérapie par l'OM-174 47

IV. **Objectifs généraux du travail** 49

**MATERIELS ET METHODES** 51

**I. Etude de phase 1 avec l'OM-174 chez des patients adultes porteurs de tumeurs solides réfractaires** 52
A. Sélection des patients 52
B. Schéma d'escalade de dose 53
C. Définition des toxicités dose-limitantes 53
D. Modalité d'administration de l'OM-174 53
E. Evaluation préthérapeutique et suivi des patients 54
F. Détermination des paramètres pharmacocinétiques 55
G. Mesure des cytokines 55
H. Analyses de l'activité NK 56
I. Analyse du polymorphisme de TLR4 56
J. Analyse statistique 56

**II. Analyse histologique** 57
A. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran 57
B. Coloration au May-Grünwald Giemsa 58
C. Quantification de l'infiltration tumoral en polynucléaires neutrophiles 59
D. Marquage immunohistochimique par le granzyme B 60
E. Marquage en immunofluorescence 61

a. Marquage des polynucléaires neutrophiles par le CD66b 61
b. Marquage du granzyme B 62
c. Double marquage par le granzyme B et le CD66b 62
F. Patients et maladies 63
G. Analyse statistique 63

**III. Analyses de l'expression des gènes** 64
A. RT-PCR 64
a. Préparation et extraction des ARN totaux à partir des tissus 64
b. Quantification des ARN totaux 65
c. Réaction de RT-PCR 65
B. q-PCR (ou PCR quantitative) 66
a. Détermination des amorces 66
b. Conditions de q-PCR 67
c. Analyse des résultats 68

**IV. Analyse de l'impact fonctionnel de l'infiltration des neutrophiles sur la tumeur** 68

**RESULTATS** 69

**I. Etude de phase 1 avec l'OM-174 chez des patients adultes porteurs de tumeurs solides réfractaires** 70
A. Caractéristiques des patients inclus 70
B. Traitements administrés 71
C. Données de tolérance 73
D. Détermination de la Dose Maximale Tolérée 74
E. Pharmacocinétique 75
F. Evolution de la concentration plasmatique des cytokines 75
G. Activité cytotoxique des cellules Natural Killer 78
H. Résultats de l'analyse du polymorphisme de TLR4 79
I. Activité antitumorale 79

**II. Les conditions d'une cytotoxicité des polynucléaires neutrophiles intratumoraux par l'intermédiaire du granzyme B sont-elles réunies ?** 80

A. Retrouve-t-on des polynucléaires neutrophiles dans les tumeurs coliques humaines ? 81

B. Quantification de l'infiltration en polynucléaires neutrophiles au sein de la tumeur 84

C. Retrouve-t-on des cellules exprimant le granzyme B au sein de la tumeur ? 85

D. Les polynucléaires neutrophiles expriment-ils le granzyme B au sein de la tumeur? 86

a. Retrouve-t-on des polynucléaires neutrophiles en immunofluorescence dans les tumeurs du colon d'origine humaine ? 87

b. Existe-t-il des cellules exprimant le granzyme B dans les tumeurs du colon d'origine humaine ? 88

c. Les polynucléaires neutrophiles présents au sein des tumeurs expriment-ils le granzyme B ? 88

d. Les polynucléaires neutrophiles sont-elles les seules cellules de la tumeur qui expriment du granzyme B ? 90

E. Existe-t-il une corrélation entre l'expression du granzyme B et l'infiltration des tumeurs par les polynucléaires neutrophiles? 92

F. Etude de contenu en cytokines du microenvironnement tumoral 92

G. Impact fonctionnel de l'infiltration des neutrophiles sur la tumeur ? 95

a. L'infiltration tumorale en neutrophiles influence-t-elle les caractéristiques tumorales? 97

b. L'infiltration tumorale en neutrophiles influence-t-elle l'évolution de la maladie? 99

**DISCUSSION ET PERSPECTIVES** 100

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 107

**ARTICLE** 118

**ANNEXE**

# LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| Ac: | Anticorps |
| Ag: | Antigène |
| ADN: | Acide DésoxyNucléique |
| ADNc: | Acide DésoxyNucléique Complémentaire |
| AEC : | 3-amino-9-ethylcarbazole |
| AMPc: | Adénosine Monophosphate Cyclique |
| ARN: | Acide Ribonucléique |
| AUC: | Area Under the Curve |
| BAV: | Bloc Auriculo Ventriculaire |
| BCG: | Bacille de Calmette et Guérin |
| BCR: | B Cell Receptor |
| bp: | paire de bases |
| CIVD: | Coagulation Intra Vasculaire Disséminée |
| CMH: | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CTCAE: | Common Toxicity Criteria for Adverse Events |
| DAB: | 3,3 diaminobenzidine tétrahydrochloride |
| DO: | Densité Optique |
| DTT: | dithiotréitol |
| EGF-R: | Epidermal Growth Factor–Receptor |
| FLt-3 L: | Fms-Like Tyrosine 3 kinase Ligand |
| FRO: | Formes Réactives de l'Oxygène |
| G-CSF: | Granulocyte Colony Stimulating Factor |
| GM-CSF: | Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor |
| GPI: | glycosylphosphatidylinositol |
| HES: | Hématoxyline-Eosine-Safran |
| HGF: | Hepatocyte Growth Factor |
| HMGB1: | High-Mobility Group protein B1 |
| IFN: | Interféron |
| Ig: | Immunoglobuline |
| IL: | Interleukine |
| ICAM-1: | InterCellular Adhesion Molecule |
| IP: | Intra Péritonéal |
| kD | kiloDalton |
| LAK: | Lymphokine Activated Killer |

| | |
|---|---|
| LFA-1: | Leucokyte Function-Associated Antigen-1 |
| LPS: | Lipopolysaccharides |
| MAD-5: | Melanoma Differentiation Associated Protein-5 |
| MAP: | Mitogen-Activated Protein |
| MGG: | May-Grünwald-Giemsa |
| MIP: | Macrophage Inflammatory Protein |
| MMP: | Matrix Metalloprotease |
| MTD: | Maximal Tolerated Dose |
| NADPH: | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate |
| NALP: | NACHT Leucine-rich-repeat Protein |
| NET : | Neutrophils extracellular Trap |
| NF Kappa B: | Nuclear Factor-kappa B |
| NK: | Natural Killer |
| NLR: | NOD Like Receptor |
| NOD: | Nucleotide Oligomerization Domain |
| OMS: | Organisation Mondiale de la Santé |
| PAF-1: | Platelet Activating Factor |
| PAMPs: | Pathogen-Associated Molecular Patterns |
| PBP: | LPS–Binding Protein |
| PBS: | Phosphate Buffered Saline |
| PCR: | Polymerisation Chain Reaction |
| PNN: | polynucléaires neutrophiles |
| q-PCR: | Quantitative Polymerisation Chain Reaction |
| RECIST: | Response Evaluation Criteria In Solid Tumors |
| RIG-1: | Retinoic acid Inducible Gene 1 |
| RLR: | RIG-Like Receptor |
| TAN: | Tumor Associated Neutrophils |
| TCR: | T Cell Receptor |
| TGF-ß: | Tumor Growth Factor ß |
| TLR: | Toll Like Receptor |
| Tm: | Température d'hybridation |
| TNF-α: | Tumor Necrosis Factor-alpha |
| VEGF: | Vascular Endothelial Growth Factor |

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1** : Acquisition de nouvelles fonctions par la cellule tumorale selon Hanahan D. et Weinberg R.

**Figure 2** : structure des TLR

**Figure 3 :** Formation des neutrophiles dans la moelle osseuse

**Figure 4** : Etapes de la migration du neutrophile du vaisseau vers les tissus

**Figure 5** : Interactions des médiateurs produits par le neutrophile avec les différents types cellulaires l'environnant lors d'une réaction inflammatoire

**Figure 6** : structure des lipopolysaccharides

**Figure 7** : structure de l'OM-174

**Figure 8** : Variation de la concentration plasmatique d'IL-8 après chaque injection d'OM-174

**Figure 9** : Variation de la concentration plasmatique d'IL-6 après chaque injection d'OM-174

**Figure 10** : Variation de la concentration plasmatique de TNF-α après chaque injection d'OM-174

**Figure 11** : Activité cytotoxique des cellules NK après chaque injection de 1000 µg/m² d'OM-174 en présence ou non d'IL-2

**Figure 12** : Coupes histologiques de tumeur du colon en coloration HES

**Figure 13** : Coupes histologiques de tumeur du colon en coloration MGG

**Figure 14** : Répartition des neutrophiles au sein de tumeur du colon

**Figure 15** : Marquage immunohistochimique par le granzyme B au sein d'une tumeur du colon (score 3+)

**Figure 16** : Marquage immunofluorescent des neutrophiles par le CD66b au sein des tumeurs du colon

**Figure 17** : Marquage immunofluorescent de cellules exprimant le granzyme B au sein d'une tumeur du colon

**Figure 18** : Double marquage immunofluorescent par le CD66b et le granzyme B au sein d'une tumeur colique humaine

**Figure 19** : Hétérogénéité de l'infiltrat cellulaire des tumeurs du colon

**Figure 20** : Analyse comparative de l'expression de gènes de chimioattractants des neutrophiles entre tissu colorectal tumoral et tissu colorectal sain avoisinant

**Figure 21** : Courbes de survie selon le degré d'infiltration tumorale en neutrophiles

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** schéma d'escalade de dose

**Tableau 2 :** score d'infiltration tumorale en polynucléaires neutrophiles

**Tableau 3 :** amorces utilisées pour la q-PCR

**Tableau 4** : caractéristiques des patients inclus dans l'étude de phase 1

**Tableau 5** : traitements antérieurs par chimiothérapie des patients inclus dans l'étude de phase 1

**Tableau 6** : Description du nombre de patients traités à chaque palier de dose

**Tableau 7 :** Evènements indésirables survenus au décours du traitement par OM-174

**Tableau 8 :** Pic de la concentration plasmatique de cytokines après la première injection d'OM-174

**Tableau 9** : Quantification de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles au sein de la tumeur

**Tableau 10**: Quantification du marquage au granzyme B au sein de la tumeur

**Tableau 11**: Analyse par sous-groupes selon le score d'infiltration en neutrophiles

**Tableau 12**: Caractéristiques des patients porteurs de tumeurs colorectales de l'étude

**Tableau 13 :** Influence du degré d'infiltration en neutrophiles (+ versus ++ versus +++) sur les caractéristiques tumorales

**Tableau 14**: Influence du degré d'infiltration en neutrophiles (+ versus ++ / +++) sur les caractéristiques tumorales

# INTRODUCTION

# I. Généralités sur le cancer

Le cancer est une pathologie propre aux organismes complexes tels que les mammifères. Il correspond à un processus évolutif mettant en jeu des générations successives de cellules ayant acquis des anomalies génétiques de différenciation, du contrôle de la croissance ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Ces anomalies résultent d'altérations survenant au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs, gènes stabilisant le génome mais également de l'activation de proto-oncogènes en oncogènes, tous capables de conférer un phénotype malin à la cellule qui acquiert alors de nouvelles fonctions. A côté de leurs capacités à envahir d'autres tissus, à former des métastases et à induire la formation de néovaisseaux, ces nouvelles caractéristiques ont tout d'abord été décrites par Hanahan et Weinberg comme une autonomie de croissance, une insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire, une dérégulation du processus d'apoptose et une capacité à se diviser indéfiniment (Figure 1) [1]. Un échappement au processus d'immunosurveillance, une dérégulation du métabolisme, une instabilité du génome et une prolifération médiée par l'inflammation ont ensuite complété les propriétés caractérisant les cellules tumorales [2].

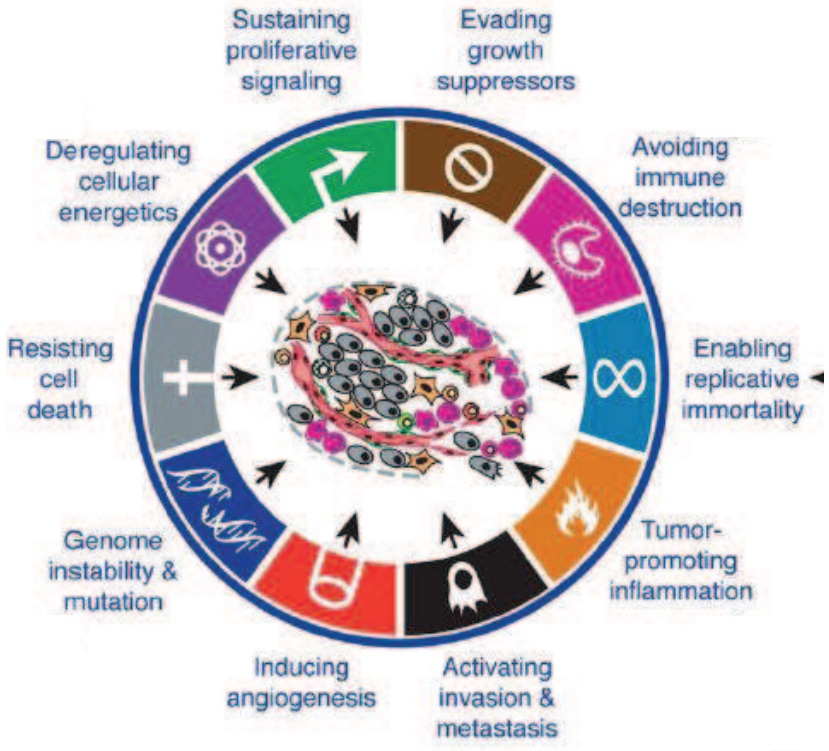



**Figure 1 : Acquisitions de nouvelles fonctions par la cellule tumorale selon Hanahan D. et Weinberg R. (2001).**

## A. Epidémiologie

Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays industrialisés occidentaux, après les maladies cardiovasculaires. On estime à 7,4 millions le nombre de décès par le cancer dans la population mondiale, ce qui représente 13% de la mortalité annuelle selon les données de l'OMS. D'ici 2030, le nombre de décès causés par le cancer devrait poursuivre sa progression et toucher environ 12 millions de personnes. En France métropolitaine, le nombre de nouveaux cancers diagnostiqués en 2011 a été estimé à 365 500 avec respectivement 207 000 cas observés chez les hommes et 158 500 chez les femmes [3]. Avec 71 000 nouveaux cas estimés, le cancer de la prostate reste de loin le cancer le plus fréquent chez l'homme, devant le cancer du poumon et le cancer colorectal, alors que chez la femme le cancer le plus fréquent est le cancer du sein. Sur cette même période de 2011, le cancer a représenté la première cause de décès chez l'homme et la deuxième cause chez la femme avec respectivement 33% et 24 % des décès dans ces populations. Le traitement du cancer représente donc un enjeu de santé publique important, mais aussi un enjeu humain, social, sociétal et économique. Dans ce contexte, il semble donc indispensable de poursuivre l'acquisition des connaissances sur cette pathologie afin d'en améliorer le pronostic notamment par la mise au point de nouvelles thérapies.

## B. Principes généraux du traitement

L'objectif de la thérapie anti-cancéreuse est d'éradiquer toutes les cellules tumorales de l'organisme du patient, y compris la plus petite métastase, ou les cellules tumorales isolées. Ainsi, pour la majorité des patients ayant une tumeur à un stade localisé, le traitement repose avant tout sur l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive, associée selon les cas à un traitement adjuvant reposant soit sur la chimiothérapie, soit sur la radiothérapie ou l'association des deux, avec pour objectif l'éradication des cellules résiduelles. Cependant pour les tumeurs à un stade localement avancé ou métastatique, ce traitement n'est souvent que palliatif, n'ayant un impact, dans la majorité des cas, que sur la survie sans progression et la qualité de vie. Ceci est principalement lié au fait que les cellules tumorales sont capables de développer des mécanismes de résistances leur permettant d'échapper aux traitements cytotoxiques.

Devant ce constat du manque d'efficacité des traitements conventionnels antitumoraux contre les cancers de stade avancé, de nouvelles approches thérapeutiques ont été développées. Parmi celles-ci, il y a tout d'abord une approche visant à agir sur une cible moléculaire impliquée

soit dans le processus de carcinogénèse, soit dans le processus de prolifération tumorale. Dans cette approche par des thérapies dites ciblées, sont utilisées des molécules ayant la capacité d'inhiber des récepteurs ou des protéines à activité kinase impliquées dans les voies de signalisation intra cellulaires régulant plus particulièrement la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, ainsi que des anticorps monoclonaux agissant au niveau de récepteurs transmembranaires ou de leurs ligands, bloquant ainsi leur activation.

Une autre approche thérapeutique consiste à induire une réponse immunitaire capable de provoquer la destruction des cellules tumorales. Il s'agit de l'immunothérapie anticancéreuse. Ce concept d'induction d'une réponse immunitaire par les cellules tumorales a été introduit au début du XX$^{ème}$ par Paul Ehrlich qui a suggéré que la prolifération anormale des cellules tumorales pouvait être contrôlée par le système immunitaire, ce dernier étant capable de reconnaitre les cellules tumorales comme du non soi et de les détruire. Utilisée en thérapeutique anticancéreuse, l'immunothérapie a pour objectif non seulement de traiter la tumeur primitive mais aussi d'éliminer les cellules tumorales ayant déjà migré et devenues potentiellement résistantes aux cytotoxiques. Il est maintenant clairement établi que l'immunothérapie par instillation intravésicale du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) est le traitement de référence pour contrôler l'évolution des tumeurs superficielles de vessie de haut grade [4].

## C. Les différentes stratégies d'immunothérapie anticancéreuse

Afin de permettre la mise en place ou la facilitation d'une réponse immunitaire antitumorale, plusieurs stratégies d'immunothérapie anti cancéreuse ont été développées, correspondant soit à une immunothérapie passive soit à une immunothérapie active.

L'immunothérapie passive consiste à utiliser des molécules connues comme par exemple l'injection d'Ac spécifiques dirigés contre des Ag exprimés par la tumeur ou l'injection de lymphocytes T cytotoxiques. Ce concept qui a pu se développer suite aux travaux de Boon qui a identifié d'abord chez la souris puis chez l'homme l'existence d'Ag dans les tumeurs et plus particulièrement sur les cellules mélanocytaires, constituant une cible susceptible d'être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques [5]. Ainsi, l'administration d'Ac ciblant des Ag spécifiques de tumeurs est devenue l'une des stratégies les plus efficaces en immunothérapie du cancer puisque l'on observe une réponse immune immédiate, spécifique de la cible mais n'induisant pas de mémoire immunologique. L'immunothérapie utilisant des Ac monoclonaux dirigés contre les

tumeurs vise les protéines de surface des cellules tumorales, les Ag associés à la vascularisation de la tumeur, les ligands favorisant la croissance tumorale ou encore les cellules immunitaires. En se liant à leurs cibles, ces Ac exercent leurs fonctions à travers plusieurs mécanismes effecteurs, incluant la neutralisation, l'activation du complément, la lyse par les macrophages et les cellules NK ou encore induisant des signaux transmembranaires menant à l'apoptose [6]. Le premier Ac utilisé en clinique, ayant démontré son efficacité dans les lymphomes malins non hodgkinien, a été le rituximab dirigé contre le CD20 présent à la surface des lymphocytes B [7].

Un autre concept d'immunothérapie passive mais non spécifique est basé sur la réinjection de cellules immunitaires activées *ex vivo* comme par exemple des lymphocytes activés par de fortes doses de cytokines, appelés LAK, mimant l'action des cellules NK, cellules effectrices de l'immunité innée capable de lyser les cellules tumorales en induisant leur apoptose [8].

Un autre type d'immunothérapie, l'immunothérapie active consiste à stimuler *in vivo* le système immunitaire des patients par un vaccin menant à l'induction d'effecteurs spécifiques contre les tumeurs ainsi que des lymphocytes T mémoires. Ainsi, un grand nombre de protocoles de vaccination utilisent des peptides naturels ou synthétiques comprenant une large gamme d'épitopes reconnus comme cibles par les lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, les essais de vaccination thérapeutique, notamment menés dans le cadre du mélanome afin de tester le peptide MAGE-3.A1, bien qu'ayant une efficacité potentielle se traduisant par une régression tumorale, n'ont pas permis de détecter une implication des lymphocytes T cytotoxiques [9]. Toujours dans le mélanome, il existe d'autres Ag comme Melan-A/MART-1 ou gp100 qui ont été utilisés en immunothérapie comme dans l'étude de transfert adoptif de clones de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ces Ag chez les patients atteints de mélanome [10].

L'utilisation des propriétés immunostimulantes de certaines cytokines constitue aussi une approche d'immunothérapie active. Cette stimulation peut être réalisée par l'injection de cellules dendritiques dont la présentation antigénique tumorale est stimulée. Les lymphocytes peuvent être aussi stimulés *in vivo* par l'administration systémique d'IL-2 et/ou d'INF-$\alpha$. Ainsi, il a été rapporté des réponses objectives lors de traitements par IL-2 par voie intraveineuse à forte dose, dans différents modèles tumoraux sensibles à la lyse par les cellules NK [11,12]. Bien que relativement toxique avec un faible impact en termes de survie, cette stratégie est capable d'induire des taux de réponse supérieurs à 20 %, incluant des réponses complètes, dans des cancers du rein, du côlon, des mélanomes et des lymphomes malins non hodgkiniens, faisant la preuve de l'implication des cellules effectrices du système immunitaire inné chez l'homme dans le contrôle tumoral [13].

Enfin l'accumulation de preuves montre que les chimiothérapies conventionnelles, en plus de leur effet cytotoxique direct, pourraient déclencher une réponse immunitaire antitumorale en libérant des protéines de stress reconnues comme signaux « danger » par les cellules dendritiques. Par ailleurs, la déplétion en lymphocytes Treg, ayant la capacité d'inhiber la réponse anti tumorale, au sein de la tumeur par des agents cytotoxiques comme le cyclophosphamide est une autre approche pouvant stimuler la réponse immunitaire [14].

Cependant, bien que les efforts en immunothérapie cellulaire s'orientent vers le renforcement de la réponse cytotoxique effectrice ou la correction de ses défaillances, cette réponse reste malheureusement le plus souvent inefficace pour un grand nombre de tumeurs. En effet, l'instabilité génétique des cellules tumorales, combinée à la pression de sélection exercée par le système immunitaire, conduisent à l'émergence au sein des tumeurs de variants résistants à la réponse immune. De nouvelles approches sont donc nécessaires afin d'améliorer la réponse immunitaire anti tumorale.

# II. Immunité innée, polynucléaires neutrophiles et prolifération tumorale

Les mécanismes de défense développés par le système immunitaire pour lutter contre les agents pathogènes sont multiples et variés. Ils peuvent être séparés en deux types: l'immunité innée, basée sur une réponse immédiate non spécifique mais sélective, responsable de la protection initiale, et l'immunité adaptative qui nécessite la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène. Cette dernière réaction se développe plus lentement et met en œuvre une défense décalée dans le temps, plus efficace.

## A. Généralités sur le système immunitaire inné

L'immunité innée ou naturelle constitue la première ligne de défense de l'organisme. Elle est constituée d'un ensemble de barrières physiques et chimiques ainsi que d'acteurs cellulaires qui évitent l'entrée et la diffusion de pathogènes dans l'organisme. Elle correspond donc à une réponse immunologique qui survient immédiatement en l'absence d'immunisation préalable. Il s'agit par conséquent d'une réaction non spécifique, prête à répondre à l'entrée du pathogène dans l'organisme et non modifiée par un contact répété avec un même pathogène. Ce rôle protecteur de l'immunité innée a été aussi décrit comme jouant un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les tumeurs, notamment à la phase initiale d'émergence des tumeurs, en induisant la mort des cellules tumorales et en permettant la sécrétion de cytokines inhibant la croissance tumorale et l'angiogenèse [15].

## B. Les cellules du système immunitaire inné

Lorsque des éléments étrangers réussissent à passer les épithélia et à pénétrer dans les tissus ou dans la circulation, ces derniers sont reconnus par les différentes cellules effectrices de la réponse immunitaire innée. Ces cellules sont les macrophages, les cellules NK, les neutrophiles, les cellules myélosuppressives, les mastocytes et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques, exprimant notamment des récepteurs aux Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), sont mobilisées non seulement lors de la réponse immune innée mais aussi lors de la réponse immunitaire adaptative, faisant le lien entre les deux types de réponses par leur fonction de présentation de l'Ag.

L'implication et l'activation des différentes cellules effectrices du système immunitaire inné vont avoir pour conséquence la sécrétion de divers facteurs solubles comme les défensines, les interférons (IFN) ou des protéines du complément qui vont permettre le recrutement d'autres cellules effectrices et la lyse de l'agent pathogène. Ainsi les cellules NK, cellules effectrices cytotoxiques, mais aussi potentiellement les lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes gamma delta ont la particularité de pouvoir reconnaitre, par l'intermédiaire de récepteurs NKG2D exprimés à leur surface, des ligands tumoraux comme MIC A, MIC B ou ULBP [16,17]. Cette interaction avec un ligand tumoral induit, de la part du macrophage activé, la production de cytokines cytotoxiques comme TNF-α, IL1-ß, FasL, et la production de radicaux libres comme

le NO. Les macrophages sont aussi capables d'inhiber l'angiogénèse tumorale par la production de MMP-12.

## C. Les récepteurs des cellules effectrices du système immunitaire inné

A l'inverse des cellules effectrices du système immunitaire adaptatif, les cellules du système immunitaire inné ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'Ag. Ils utilisent des récepteurs avec des systèmes de reconnaissance primitifs et non spécifiques. Ces récepteurs sont en nombre limité, il en est individualisé 3 grands types: les récepteurs de la famille Toll Like Receptor (TLR), les récepteurs de la famille NOD Like Receptor (NLR) et les récepteurs de la famille RIG-Like Receptor (RLR).

- **les récepteurs de la famille TLR**

La famille des récepteurs TLR humains comprend 10 membres dont 6 sont exprimés à la surface des membranes des cellules du système immunitaire (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10) et 4 au niveau intra cellulaire (TLR-3, -7, -8, -9), ces derniers étant enchâssés dans les endosomes [18]. Ces récepteurs, dont les fonctions diffèrent selon leur structure, sont des protéines transmembranaires ayant une structure commune constituée de 3 domaines distincts (Figure 2):

- un domaine extracellulaire riche en Leucine impliqué dans la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes.
- une courte portion transmembranaire riche en Cystéines.
- un domaine intracellulaire ou cytoplasmique.

  Ce domaine est impliqué dans le déclenchement des signaux intracellulaires aboutissant à la réponse dirigée contre les pathogènes.

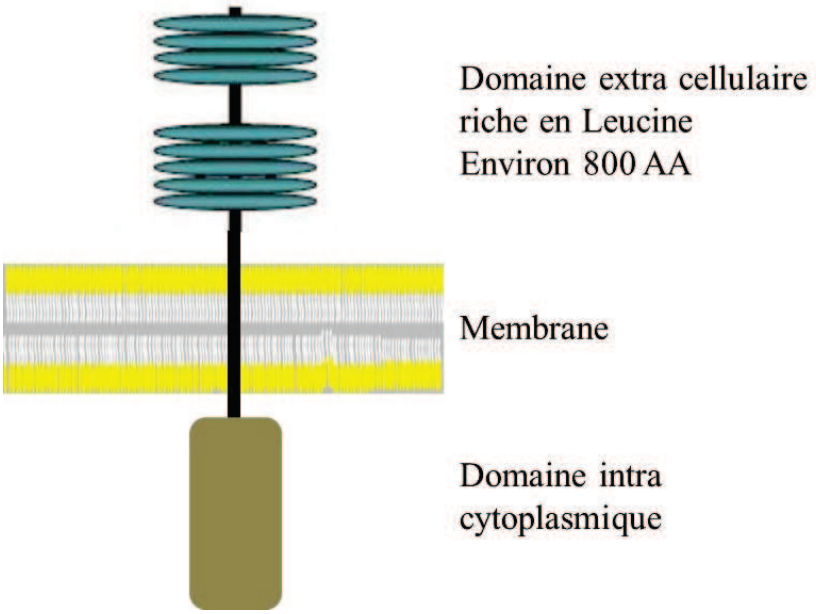



**Figure 2 : structure des TLR (d'après Zauzein 2013).** Les TLR sont constitués d'un domaine extra cellulaire, d'un court domaine membranaire et d'un domaine intra cellulaire impliqué dans la signalisation en réponse à un agent pathogène.

Chaque type de TLR va donc pouvoir se lier sélectivement à des structures moléculaires présentes à la surface du pathogène appelées PAMPs, la localisation cellulaire des TLR étant par conséquent associée à la nature des ligands qu'ils reconnaissent [19]. Ainsi le TLR4 associé à MD2 reconnait les lipides du lipopolysaccharide présent à la surface des bactéries à Gram négatif. Les TLR-3, -7, -8 et -9 localisés dans les endosomes reconnaissent des acides nucléiques.

Il existe une répartition différente de ces récepteurs au sein des diverses cellules impliquées dans l'immunité innée. Ainsi, de grandes densités de TLR2, 4 et 5 sont retrouvées au niveau des monocytes, des macrophages, et de certaines sous populations de cellules dendritiques.

Chaque récepteur a aussi un rôle bien déterminé. L'activation des TLR par un agent pathogène va déclencher des voies de signalisation intra cellulaires spécifiques aboutissant à l'activation de facteurs de transcription comme NF-Kappa B impliqué dans l'expression de gènes codant pour des cytokines, tels que l'IL-1ß, l'IL-6 et le TNF-α qui stimulent, entre autre, l'inflammation (cytokines pro inflammatoires). Indirectement, l'activation de certains TLR

comme TLR4 déclenche notamment la production d'INF de type 1 comme l'INF-α qui active lui-même la production d'INF de type 2. La libération de ces cytokines permet de recruter des macrophages et des cellules dendritiques supplémentaires qui amplifient alors la réponse immunitaire naturelle. L'activation des TLR peut aussi induire la production de chimiokines comme CCL-20, IL-8 et RANTES ainsi que des molécules cytotoxiques et l'expression de molécules de co-stimulation [18,19].

Les TLR seraient également impliqués dans la détection de ligands endogènes libérés dans des conditions de danger qui ne correspondent pas à une infection mais à la mort cellulaire par apoptose [20]. Ainsi, des protéines libérées au niveau des tissus endommagés par le processus inflammatoire peuvent notamment activer TLR4 ou TLR2. Enfin, la reconnaissance de ligands endogènes comme HMGB1 par TLR4 jouerait un rôle essentiel dans le déclenchement d'une immunité antitumorale.

- **les récepteurs de la famille NLR**

La famille des NLR est constituée de 2 grandes sous familles, celle des Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) et celles des NACHT Leucine-rich-repeat Protein (NALP). Ces récepteurs sont caractérisés par 2 domaines à savoir le domaine de liaison au ligand (identique à celui des TLR) et le domaine impliqué dans la signalisation. Les NLR détectent principalement la présence de dérivés bactériens. Comme les autres familles de récepteurs dont l'activation conduit à une production de cytokines, les protéines NALP-1, NALP-3 et IPAF activent les cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 [21].

- **les récepteurs de la famille RLR**

La famille des récepteurs RLR est composée de 2 membres RIG-I et MDA-5 qui sont des enzymes cytoplasmiques reconnaissant l'ARN viral simple et double brin produit lors de la réplication du virus dans la cellule hôte.

## D. Le polynucléaire neutrophile

Le neutrophile, aussi nommé leucocyte polymorphonucléaire, constitue une des cellules effectrices du système immunitaire inné. Il a été décrit pour la première fois par Paul Ehrlich au début du XX$^{ème}$ siècle. Il se caractérise sur le plan morphologique par un noyau polylobé et de nombreux granules cytoplasmiques mesurant seulement une dizaine de µm. La dénomination neutrophile provient du fait qu'il se colore par un mélange de colorants acides et basiques. Il est le leucocyte le plus abondant de la circulation sanguine, représentant entre 50% et 70% de l'ensemble des globules blancs. Dans la lignée des polynucléaires, les neutrophiles constituent à eux seuls plus de 95% de cette population cellulaire, alors que les éosinophiles et les basophiles ne représentent respectivement qu'environ 4% et 1%. Il joue un rôle très important dans la réaction immunitaire innée et surtout dans la réaction inflammatoire. Il est le premier leucocyte à migrer, en très grand nombre, vers le site où se produit la réaction inflammatoire. De plus, il secrète des facteurs chimiotactiques qui permettent le recrutement d'autres cellules effectrices immunitaires telles que les lymphocytes T, les cellules NK, les monocytes ou les cellules dendritiques immatures [22].

### a. Formation des polynucléaires neutrophiles

Comme les autres cellules du système immunitaire, les neutrophiles se forment dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente, lors d'un cycle de maturation qui dure 3 jours. Sous l'influence de facteurs de croissance présents dans le microenvironnement et de leur concentration notamment, la cellule souche hématopoïétique peut se différencier et devenir soit une cellule progénitrice lymphoïde menant à la formation des lymphocytes ou se transformer en cellule progénitrice myéloïde, menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles. La présence combinée de GM-CSF et d'IL-3 favorise cette différenciation dans la lignée myéloïde et l'addition d'IL-6 permet la différenciation jusqu'aux progéniteurs des granulocytes/macrophages. Sous l'influence des variations de l'expression des facteurs de transcription de PU.1 et C / EBPα et Gfi-1 notamment, ces progéniteurs vont ensuite orienter leur différenciation soit vers la formation de monocytes ou de neutrophiles [23]. Quelques étapes supplémentaires de maturation de ces précurseurs en présence de GM-CSF et de G-CSF sont nécessaires pour finalement donner un neutrophile prêt à migrer dans la circulation sanguine. Cette migration vers la circulation sanguine est déterminée par un équilibre entre la concentration de CXCR4 (favorisant la rétention du neutrophile dans la

moelle) et CXCR2 (favorisant sa libération) et leurs ligands respectifs SDF-1, IL-8 et Groβ. Le G-CSF stimule ensuite la libération des neutrophiles en agissant directement sur celui-ci et indirectement en réduisant l'expression du SDF-1 et en favorisant l'expression de Groβ sur les cellules endothéliales.

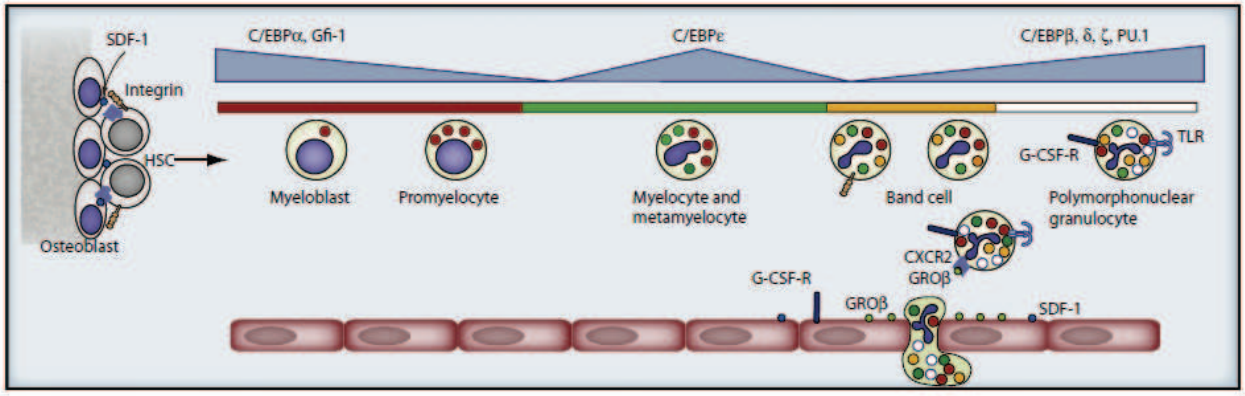



**Figure 3 : Formation des neutrophiles dans la moelle osseuse (d'après Borregaard 2010).** Les cellules souches hématopoïétiques se localisent dans des niches formées par les ostéoblastes et les cellules endothéliales. Les différents groupes de granules azurophile (rouge), granulés spécifiques (en vert) et les granules de gélatinase (jaune) et des vésicules de sécrétion (blanc) sont formés de manière séquentielle au cours de la maturation des promyelocytes, déterminée par l'expression des facteurs de transcription indiqués sur le haut de la figure.

### b. La migration des polynucléaires neutrophiles

Sous l'influence de diverses cytokines et de facteurs chimiotactiques, les neutrophiles sont recrutés soit au niveau des sites inflammatoires soit au niveau des sites tumoraux. Cette migration de la moelle ou des vaisseaux sanguins vers les tissus se fait en quatre étapes (Figure 4). En condition normale, le neutrophile et les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion de faible affinité, les sélectines P, E et L aussi appelées respectivement GMP 140, ELAM-1 et MAL-1 ainsi que des « mucine-like ». Emportés par le flux sanguin, les neutrophiles roulent littéralement sur la paroi du vaisseau, étape appelée le roulement ou «rolling» [23,24]. Lorsque le neutrophile entre en contact avec un facteur proinflammatoire, il entre dans une deuxième étape: l'activation [24]. A cette étape, de nouvelles molécules d'adhésion de

forte affinité comme l'intégrine β2 aussi appelée MAC-1 ou CD11b/CD18 et des molécules de la superfamille des immunoglobulines sont exprimées au niveau du neutrophile et de la cellule endothéliale. Cette étape est appelée adhésion ferme. Le neutrophile réorganise alors son cytosquelette pour s'insinuer à travers la couche de cellules endothéliales, sous l'influence d'un gradient de concentration de chimioattractant. C'est la migration transendothéliale ou la diapédèse à l'origine de l'extravasation des neutrophiles au sein de la tumeur [24].

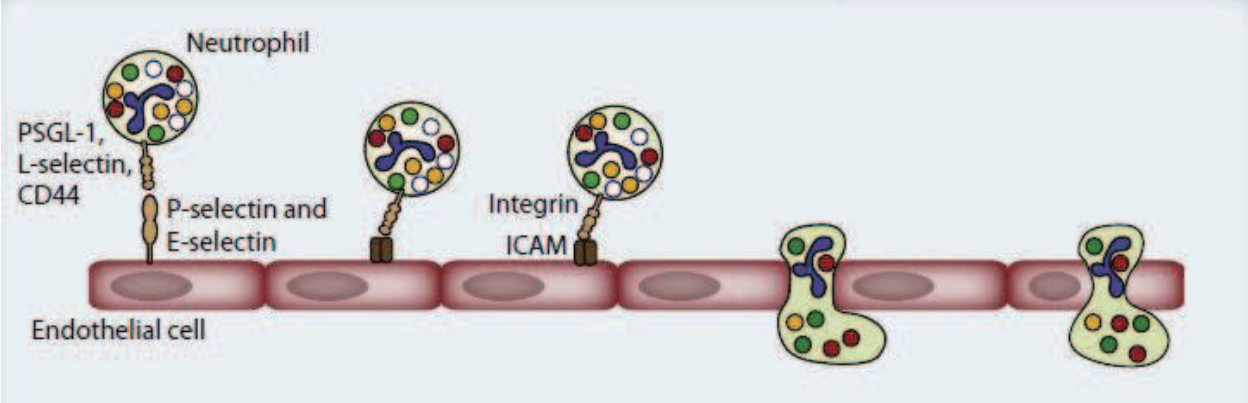



**Figure 4: Etapes de la migration du polynucléaire neutrophile du vaisseau vers les tissus (d'après Borregaard 2010).** Les neutrophiles vont se fixer sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules d'adhésion exprimées à leur surface (sélectines P, E et L). Le neutrophile va ensuite exprimer une intégrine qui va interagir avec des récepteurs ICAMs de forte affinité exprimés au niveau des cellules endothéliales. Les neutrophiles vont ensuite pouvoir migrer à travers les cellules endothéliales pour migrer vers les tissus.

### c. Rôle physiologique des polynucléaires neutrophiles

Une fois dans la circulation sanguine, les neutrophiles ont une durée de vie relativement courte, estimée entre 7 à 12 heures. Cependant, dans un contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à plusieurs jours [25].

Les principales fonctions de défense du neutrophile sont la phagocytose, la dégranulation, la réaction oxydative et la formation des Neutrophils extracellular Trap (NET) qui constituent un réseau filamentaire capable d'emprisonner des micro-organismes et faciliter leur interaction avec les molécules effectrices du système immunitaire [26].

- **La phagocytose**

Au niveau du site inflammatoire, le neutrophile a pour rôle d'éliminer les agents pathogènes et les débris de cellules tumorales. Pour ce faire, il a recours comme le macrophage au processus de phagocytose. Pour cela, le neutrophile possède donc à sa membrane cytoplasmique des récepteurs qui reconnaissent directement les débris cellulaires, ce qui permet de les enrober et de les emprisonner à l'intérieur d'une vacuole : le phagosome. Le même phénomène se produit pour les particules opsonisées par les fragments du complément car le neutrophile possède également les récepteurs reconnaissant ces fragments. Le neutrophile a d'ailleurs la capacité de moduler l'expression de ces récepteurs de surface, ce qui permet de distinguer les neutrophiles ayant un phénotype activé des neutrophiles non activés par la surexpression de CD11b, CD66b ou la diminution d'expression de CD181, CD182 et CD62bL [27]. Ce phénomène, appelé "switch phénotypique", contrôlé par le TGF-β, est facilement évaluable par la détermination du taux d'arginase et de NOSII dans le neutrophile. Le neutrophile ayant un phénotype activé a une capacité de chimiotactisme et de pénétration transendothéliale augmentées.

Une fois que les débris à détruire se trouvent à l'intérieur des phagosomes, des granules contenant des enzymes de dégradation viennent alors se fusionner à ceux-ci afin de dégrader complètement son contenu.

- **La dégranulation**

En tant que granulocyte, le neutrophile possède des granules pouvant être classés en quatre types, selon leur contenu [28,29]. Ces différents granules sont formés de manière séquentielle au cours de la maturation des promyélocytes, sous l'influence de l'expression des facteurs de transcription C/EBPα, C/EBPε, C/EBPβ, δ, ζ, Gfi-1, et PU.1 (Figure 3).

Les premiers granules formés sont les granules azurophiles ou granules primaires. Ils sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule, fusionnant plutôt avec le phagosome pour en détruire le contenu à l'aide de la myéloperoxydase, des élastases, des défensines, des lysosymes et de l'azurocidine qu'ils contiennent. Les autres granules formés peu après ces granules primaires sont dits spécifiques ou secondaires. Ces granules ne contiennent pas de myéloperoxydase, mais sont riches en substances, libérées dans le milieu extracellulaire plus facilement que les substances des azurophiles.

Les granules gélatinases ou tertiaires et les vésicules sécrétoires apparaissent plus tard, à la fin du processus de maturation du neutrophile. Les principaux rôles des gélatinases sont de stocker les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire tout en étant une réserve de récepteurs membranaires utiles à la surface pour la diapédèse du neutrophile. Ces granules sont donc très importants pour une migration efficace vers le site inflammatoire ou le site tumoral. Finalement, les vésicules sécrétoires, les premières à être libérées en réponse à des stimuli inflammatoires, possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation du neutrophile et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé, comme la β2-intégrine, le récepteur du fMLP, du lipopolysaccharide (CD14) et le récepteur FcγIII.

La production de ces différents granules est contrôlée durant toutes les étapes de maturation du neutrophile dans la moelle osseuse. Les mécanismes contrôlant leur libération impliquent une signalisation par les sélectines et des cytokines qui contrôlent aussi le processus d'adhésion neutrophile-cellules endothéliales comme l'IL-8 et fMLP [23].

### d. Les médiateurs produits par le polynucléaire neutrophile

En plus de ses fonctions primaires dans la réponse immunitaire innée, le polynucléaire neutrophile a aussi la capacité de sécréter une grande variété de médiateurs appelés cytokines et chimiokines servant à communiquer avec les cellules environnantes (Figure 5) [30]. Étant souvent le premier impliqué dans la réaction, il peut ainsi organiser la suite de la réponse immunitaire en recrutant d'autres effecteurs de la réponse immunitaire. Ces médiateurs peuvent être distingués en 2 grandes familles : les médiateurs peptidiques et les médiateurs lipidiques.

Les médiateurs peptidiques sont constitués de la famille de l'IL-1 comprenant l'IL-1β, l'IL-1α et l'IL-1RA qui agissent sur presque toutes les cellules immunitaires effectrices, en induisant une cascade de cytokines de la famille du TNF, de l'IL-8 et de la famille des MIP. L'induction de la sécrétion du TNF-α permet d'initier une cascade d'événements comme l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, l'induction d'une réaction oxydative au niveau des leucocytes, la production de médiateurs inflammatoires comme le PGI2, le PGE2, l'IL-1, contribuant au recrutement et à l'activation de cellules inflammatoires [31]. Bien que sécrétée par d'autres types cellulaires, l'IL-8 ou CXCL8 est la chimiokine que le neutrophile sécrète en plus grande quantité, celui-ci étant presque exclusivement la seule cible de l'IL-8. Elle induit chez lui plusieurs événements importants dont un changement de forme, une migration dirigée, une dégranulation et une libération des diverses protéines ainsi qu'une réaction oxydative. Lorsque de

l'IL-8 est présente à un endroit, les neutrophiles y migrent rapidement en grand nombre. Cet effet chimioattractant peut durer jusqu'à 10 heures [32].

Les médiateurs lipidiques comme le leucotriène B4, la prostaglandine E2 et le thromboxane A2 sont des composés formés à partir des phospholipides membranaires issus principalement du métabolisme de l'acide arachidonique [33]. Le leucotriène B4, en plus d'augmenter la perméabilité vasculaire et l'adhésion aux cellules endothéliales, est un puissant activateur et chimioattractant des polynucléaires neutrophiles, participant ainsi à un processus d'autoentretien de la réaction inflammatoire [34].

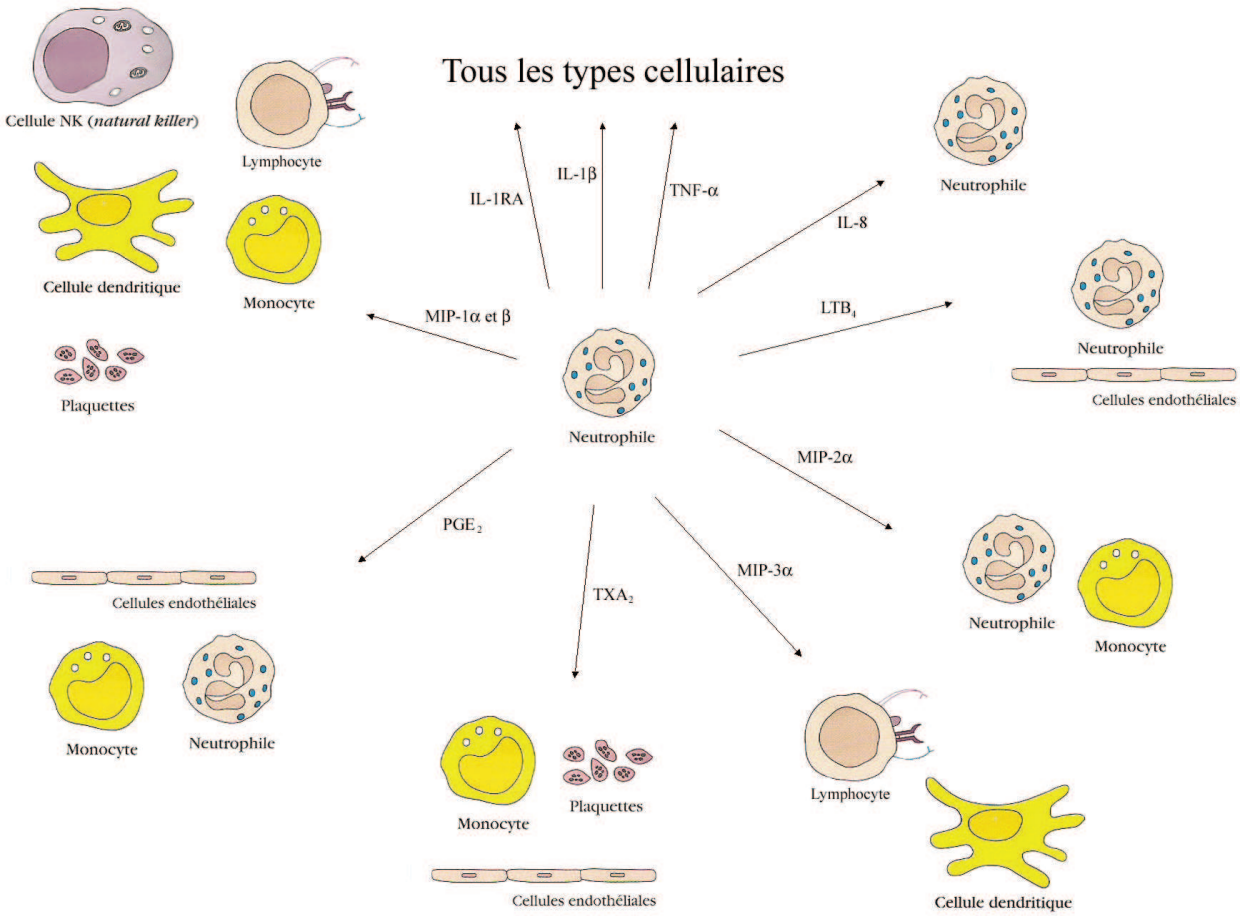



**Figure 5 : Interactions des médiateurs produits par le neutrophile avec les différents types cellulaires l'environnant lors d'une réaction inflammatoire (d'après M. St-Onge 2005).** Les différentes cytokines secrétées par le neutrophile sont capables d'interagir, selon leur nature, avec différentes cellules de l'environnement, conférant au neutrophile un rôle central dans la réaction inflammatoire. Parmi celles-ci, seule l'IL-8 est spécifique du neutrophile.

## E. Recrutement des polynucléaires neutrophiles dans la tumeur

Le recrutement des neutrophiles au sein de la tumeur est un processus complexe dans lequel différents mécanismes sont impliqués. Il est maintenant bien établi que les cellules tumorales peuvent avoir un impact direct sur l'infiltration tumorale en neutrophiles ainsi que sur leur phénotype. Ceci a été démontré dans des modèles tumoraux capables d'induire la sécrétion d'IL ou de chemokines dans leur microenvironnement.

Tout d'abord, le mécanisme d'extravasation des neutrophiles de la circulation sanguine vers une tumeur est un processus multi-étapes dans lequel on retrouve toutes les étapes de la migration du neutrophile décrites précédemment, impliquant les interactions coordonnées entre le neutrophile et les cellules endothéliales [35]. De plus, les cellules tumorales en sécrétant de l'IL-1β peuvent induire l'expression des différentes molécules d'adhésion comme les sélectines, à la fois au niveau du neutrophile et des cellules endothéliales ou l'ICAM-1 spécifiquement sur les cellules endothéliales via la sécrétion d'INF-γ [36,37,38,39]. Ceci constitue la première étape du recrutement des neutrophiles dans la tumeur. Il s'en suit d'autres mécanismes comme la sécrétion par les cellules du microenvironnement tumoral et également par les cellules tumorales de CXCL8 ou IL-8, qui par l'intermédiaire d'un gradient de concentration attire les neutrophiles au sein de la tumeur [40].

Dans un modèle de carcinome mammaire 4T1 murin, DuPre et Hunter ont montré que l'accumulation de neutrophiles dans la tumeur était dépendante du G-CSF sécrété par la tumeur primaire [41]. Cette accumulation intratumorale est également obtenue lorsque l'IL-10, une cytokine généralement considérée comme anti-inflammatoire est présente dans le micro-environnement. Di Carlo et collaborateurs ont démontré que la libération locale de niveaux élevés d'IL-10 par des cellules de carcinome mammaire transfectées par le gène IL-10 (TSA-IL-10) avait à la fois une activité pro- et anti-inflammatoire, grâce à une forte expression d'ELAM-1 dans les cellules endothéliales péritumorales, ceci étant responsable de l'accumulation intra tumorale de neutrophiles [42].

Une fois recrutés dans la tumeur, les Tumor Associated Neutrophils (TAN), sous l'influence du TGF-β produit dans le microenvironnement tumoral, vont exprimer un phénotype protumoral, c'est-à-dire exprimant un fort taux d'arginase et de faible niveau de NOS II, le blocage de la sécrétion du TGF-β induisant une accumulation de TAN ayant un phénotype anti tumoral [43].

## F. Cytotoxicité des polynucléaires neutrophiles vis-à-vis des cellules tumorales

Il est maintenant connu que les neutrophiles incubés en présence d'acétate de phorbol myristate sont capables de lyser des cellules tumorales [44,45,46]. Cette lyse cellulaire implique différents mécanismes qui agissent en synergie.

Le premier est une réaction non oxydative dans laquelle les neutrophiles recrutés produisent des médiateurs cytotoxiques, l'IL-1β et l'IFN et des effecteurs de mort tels que le TNF-α [47] .

Le second consiste en la production de Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) correspondant à des agents oxydants comme les anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) formés par l'intermédiaire d'une NADPH oxydase située à la membrane cytoplasmique, et libérés à la face externe de la membrane [48]. La NADPH oxydase est un complexe enzymatique membranaire constitué des glycoprotéines gp91$^{phox}$ (ou NOX2) et p22 $^{phox}$, des protéines cytoplasmiques p47 $^{phox}$, p67 $^{phox}$, p40 $^{phox}$ et Rac2 qui peuvent être phosphorylées. Cette phosphorylation joue un rôle essentiel dans la translocation des composants cytosoliques à la membrane et à l'activation de la NADPH oxydase. Dans la cellule, l'anion superoxyde produit lors de cette réaction appelée explosion oxydative est lui-même un précurseur de plusieurs autres formes d'oxygène fortement réactives et plus toxiques pour les cellules tumorales : le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), le radical hydroxyle (OH) et l'oxygène singulet ($_1O_2$). Le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en acide hypochloreux (HOCl) et chloramines par la myéloperoxydase qui sera ensuite libérée dans la cellule tumorale via le phagosome [49,50,51,52]. Durant ce processus, le neutrophile se protège lui-même des facteurs toxiques qu'il produit en les confinant dans des granules [28,29]. Il doit ensuite s'agréger à la cellule tumorale via le Leukocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) [45] pour induire la lyse cellulaire tumorale par un phénomène de dégranulation et de libération des facteurs cytotoxiques contenus dans ses granules.

Enfin, un dernier mécanisme impliquant les neutrophiles dans la destruction des cellules tumorales est décrit. Il s'agit d'une cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), cytotoxicité à médiation cellulaire [53]. Ce concept a notamment été démontré dans des modèles de mélanome malin, de neuroblastome et de cancer colorectal dans lesquels l'administration de GM-CSF augmente l'ADCC en relation avec les neutrophiles [54,55,56].

Par contre il existe une controverse concernant le granzyme B, un des principaux médiateurs de la cytotoxicité induite par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK, qui

n'est pas connu comme étant produit par les neutrophiles infiltrants les tumeurs. Des données de la littérature indiquent que le granzyme B est exprimé constitutivement dans les neutrophiles sanguins humains [28] ou des neutrophiles en culture transformés [57], tandis que d'autres indiquent que le granzyme B n'est pas du tout exprimé dans les neutrophiles [58,59]. Cependant rien n'est à ce jour connu sur l'expression de Granzyme B dans les TAN.

## G. Polynucléaires neutrophiles et croissance tumorale

L'implication des neutrophiles dans la croissance tumorale n'a finalement été que très peu étudiée et reste à ce jour controversée. En effet des données contradictoires existent dans la littérature. Les neutrophiles peuvent avoir un impact sur le microenvironnement tumoral via la sécrétion de cytokines recrutant et activant des cellules effectrices immunitaires. Ils peuvent, via l'angiogénèse, favoriser la prolifération tumorale ou à l'inverse inhiber la croissance tumorale en infiltrant la tumeur et produisant des dérivés oxygénés. Cette ambiguïté est le résultat d'un équilibre instable entre le type et la quantité de cytokines sécrétées par les cellules tumorales et le degré de recrutement et d'activation des neutrophiles infiltrant la tumeur [60].

### a. Implication dans la progression tumorale

Il a été démontré que la déplétion tumorale en TAN par l'utilisation d'un Ac anti Gr-1, non spécifique des neutrophiles, induit un retard de croissance tumorale, une évolution métastatique moins importante et limite le recrutement des cellules endothéliales [40,61]. Des résultats similaires ont été observés en induisant une diminution de l'accumulation des neutrophiles au site tumoral par blocage des récepteurs à l'IL-8, CXCR 1 et 2 [62]. En clinique, dans plusieurs études menées chez des patients, il a été rapporté la présence de neutrophiles en quantité importante au sein de la tumeur comme étant un facteur de mauvais pronostic. Ainsi, dans le cancer du rein, la présence de neutrophiles au sein de la tumeur est corrélée à un taux de mortalité plus élevé [63].

Les mécanismes expliquant ces constatations sont multiples. Il a été démontré dans un modèle de cancer du sein que les cellules tumorales pouvaient secréter du GM-GSF qui induisait la production par les neutrophiles de l'oncostatine M, cette protéine elle-même induisant la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales [64]. Des résultats similaires sont rapportés dans un modèle d'hépatocarcinome via la production de HGF [65]. Un autre mécanisme d'action est lié à la production de dérivés oxygénés dans le phagosome qui, à côté de l'effet cytotoxique comme

décrit précédemment peut aussi avoir un effet mutagène et prolifératif sur les cellules tumorales par action génotoxique [66]. Enfin, les neutrophiles peuvent secréter diverses protéases capables de dégrader la matrice extra cellulaire et lyser les membranes basales, facilitant l'invasion tumorale et la formation de métastases.

### b. Implication dans la régression tumorale

Les données de la littérature démontrant un rôle anti tumoral des neutrophiles sont beaucoup plus limitées. Toutefois, certains travaux ont montré que la déplétion en neutrophiles et l'inhibition de leur recrutement a pour conséquence d'augmenter la vitesse de croissance tumorale, d'augmenter la quantité de cytokines de type Th2 pro-tumorale comme l'IL-4 et l'IL-10 et de diminuer la quantité de cytokines anti tumorales de type Th1 comme IFN-γ et IL-12 [67,68]. Dans un modèle murin de cancer du sein, Granot et collaborateurs ont démontré que la sécrétion de CCL2 par les cellules tumorales pouvait agir sur les neutrophiles par le G-GSF et empêcher le développement de métastases pulmonaires [69]. Dans d'autres modèles tumoraux produisant des niveaux supra-physiologiques de GM-CSF, le recrutement des TAN est augmenté avec pour conséquence un rejet de la tumeur. Chez la souris Balb/c, la production d'IL-2 et TNF-α par des cellules tumorales d'origine mammaire modifiées pour produire ces cytokines induit le rejet de la tumeur [70,71].

Ces données contradictoires démontrent qu'il n'y a pas de consensus concernant le rôle exact des neutrophiles infiltrant les tumeurs, ces derniers étant capables d'exprimer à la fois un phénotype pro ou anti tumoral, mais des situations particulières impliquant d'autres cellules du microenvironnement tumoral.

## H. Polynucléaires neutrophiles et traitement anti cancéreux chez l'homme

Afin d'exploiter le potentiel cytotoxique des neutrophiles vis-à-vis des cellules tumorales, de nouvelles approches ont été envisagées pour le traitement de la maladie cancéreuse. A ce jour, ces approches ont surtout été menées sur des modèles précliniques et rarement chez l'homme.

Dans des modèles animaux d'hémopathies malignes de phénotype B, il apparait que les neutrophiles, préalablement stimulés par du G-CSF et exprimant des récepteurs Fc de type I des

IgG, peuvent lyser les cellules tumorales en présence d'un Ac dirigé contre un Ag HLA de classe 2 [72]. Cette capacité ayant été observée sur d'autres modèles tumoraux comme le glioblastome, le carcinome épidermoïde, le cancer de l'ovaire ou le cancer du sein, cette approche a été évaluée chez l'homme dans un essai clinique. Ainsi, dans une étude de phase Ia/Ib menée chez des patients porteurs de cancer du sein et de l'ovaire, Valone et collaborateurs ont observé qu'un Ac bispécifique des récepteurs Fc de type I des IgG et de la protéine HER2/neu était capable non seulement de se fixer sur les cellules tumorales exprimant l'oncoprotéine HER2/neu mais aussi d'activer les neutrophiles se situant au niveau de la tumeur via la sécrétion de G-CSF par les macrophages et les monocytes [73,74,75].

Dans les protocoles thérapeutiques utilisant l'IL2 chez les patients atteints de mélanome malin avancé ou de carcinome rénal à cellules claires, des preuves phénotypiques et fonctionnelles de l'activation des neutrophiles ont également été apportées par la mise en évidence de la production de grande quantité de HOCl par les neutrophiles, sans qu'un effet direct de l'IL-2 sur les neutrophiles n'ait pu être démontré [12,76].

A l'opposé, certaines équipes ont déjà travaillé sur des approches thérapeutiques basées sur le rôle délétère des TAN. Il s'en dégage principalement 2 stratégies. La première, qui a pour objectif d'éliminer de la tumeur les polynucléaires neutrophiles, cible l'axe CXCL8/CXCR-1/CXCR-2. Ainsi l'utilisation d'ABX-IL8, un Ac qui en empêchant la fixation de l'IL-8 à son récepteur, bloque l'activation, la migration et la dégranulation des neutrophiles, réduisant la croissance tumorale et le développement de métastases dans un modèle de mélanome malin A375SM d'origine humaine [77]. La seconde stratégie cible les différentes substances sécrétées par les neutrophiles pouvant faciliter la croissance tumorale. Dans un modèle de cancer du poumon SL-K-ras chez la souris, l'administration de ONO-5046, un inhibiteur d'élastase, une serine protéinase présente dans les granules des neutrophiles facilitant l'invasion tumorale, a démontré un effet bénéfique en réduisant la croissance tumorale [78].

Enfin, l'élaboration de systèmes capables de guider le recrutement des neutrophiles et leur activation dans le microenvironnement tumoral peuvent être présentés comme une approche thérapeutique nouvelle.

A côté de ces approches, une autre façon de stimuler les neutrophiles pour qu'ils reconnaissent et détruisent les cellules tumorales consiste à induire leur stimulation en présence d'agents ou de dérivés bactériens via leur récepteur TLR4.

# III. Immunothérapie par des agents bactériens

Cette stratégie, permettant d'activer et d'améliorer le fonctionnement du système immunitaire afin d'éliminer une tumeur sans affecter les cellules normales, consiste à mobiliser les ressources du système immunitaire du patient. Ce concept d'immunothérapie anti tumorale, activé par l'administration d'immuno-activateurs comme des agents bactériens ou des substances dérivées de ces mêmes agents, est un concept ancien [79] et à ce jour toujours utilisé notamment pour le traitement standard du cancer superficiel de la vessie [4,80].

## A. Lipopolysaccharides et réponse biologique

Au début du XVIII$^{ème}$ siècle, il est déjà rapporté des régressions tumorales survenant au décours d'infections [81]. Presqu'un siècle plus tard, les travaux de Pfeiffer ont montré que des lysats de la bactérie Vibrio Cholerae inactivés mais aussi d'autres bactéries à Gram négatif, contenaient des substances appelées endotoxines pouvant induire chez l'animal des réactions physiopathologiques comme de la fièvre, une hypotension et une Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD). Parallèlement, Coley démontra que l'on pouvait traiter des sarcomes à partir d'un mélange d'extraits bactériens dont l'activité anti tumorale sera un peu plus tard attribuée à ces mêmes endotoxines [81]. Il a ensuite été montré que les endotoxines ou lipopolysaccharides étaient localisées à la surface des bactéries, constituant la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

### a. Structure des lipopolysaccharides

La structure des lipopolysaccharides est maintenant bien connue. Malgré des similarités entre les différents lipopolysaccharides, une grande diversité dans leur composition biochimique existe, principalement en fonction de leur origine [82]. Toutefois, quelles que soit leurs origines, il existe une structure commune à tous les lipopolysaccharides. Cette structure est constituée (Figure 6):

- **d'une chaine O spécifique**

Cette chaine est constituée de la répétition d'unités d'oligosaccharides contenant au maximum 5 résidus sucrés. Elle est caractéristique et unique pour chaque famille de bactéries, ce qui permet leur sérotypage.

- **d'un noyau oligosaccharide**

Celui-ci est constitué de saccharides. A l'inverse de la chaine O spécifique, il y a en fait très peu de variabilité structurale du noyau selon les espèces de bactéries.

- **d'un lipide A**

La structure des lipides A est connue depuis 1984 [83]. Ils sont constitués d'un diglucosamine ou β(1-6) disaccharide diphosphorylée comportant plusieurs acides gras le plus souvent hydroxylés en leur position 3- ou β-. Cette structure est, quelle que soit l'origine du lipide A, spécifique d'une espèce bactérienne, spécificité reposant en fait sur 1a répartition des acides gras. Cependant le lipide A présente une variabilité moindre que celle de la chaine O.

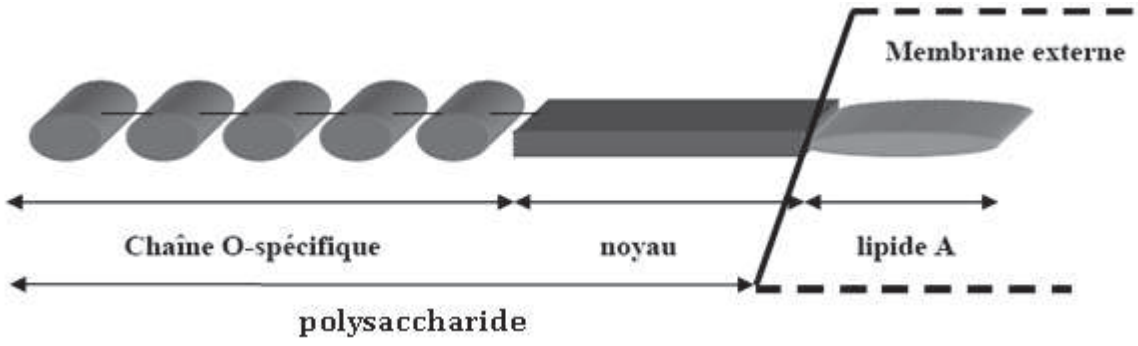



**Figure 6 : structure des lipopolysaccharides (d'après Sperandeo 2009).** Tous les lipopolysaccharides ont en commun une structure constituée d'une chaine O-spécifique, un noyau oligosaccharide et un lipide A dont les caractéristiques diffèrent selon la bactérie.

### b. Effets toxiques des lipopolysaccharides

Biologiquement, les lipopolysaccharides vont induire la sécrétion de nombreux médiateurs biochimiques impliqués dans la réponse immunologique dont l'intensité est dépendante de l'origine des lipopolysaccharides [84]. Ainsi les lipopolysaccharides sont capables d'induire la production de :

- **IL-1**

En plus des propriétés déjà indiquées, elle permet en autre, l'expression de facteurs d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, afin de faciliter la transmigration des leucocytes sur le site inflammatoire. A titre d'exemple, le lipopolysaccharide de *Bordetella Pertussis* est 1000 fois plus actif pour induire la production d'IL-1 dans des monocytes humains que le lipopolysaccharide de *Neisseria Meningitidis* [85].

- **IL-6**

Agissant comme co activateur du processus inflammatoire avec l'IL-1, l'IL-6 peut être aussi produite en concentrations différentes selon la nature du lipopolysaccharide. Ainsi la concentration de l'IL-6 produite par les macrophages de rat activés par le lipopolysaccharide de *Neisseria Meningitidis* est 6 fois plus importante que celle induite par le lipopolysaccharide de *Bordetella Pertussis* [86].

- **TNF-α**

Activateur en autre de la voie NF-κB, la concentration de TNF-α produite par les macrophages de rats activés par du lipopolysaccharide de *Neisseria Meningitidis* est 20 fois plus importante que celle induite par le lipopolysaccharide de *Salmonella Minnesota* [86].

Les lipopolysaccharides peuvent aussi être à l'origine de l'expression de la NO synthase inductible et de la production de NO par les macrophages avec là encore une variabilité en terme d'activité selon la nature de la souche bactérienne dont le lipopolysaccharide est dérivé. Ainsi le lipopolysaccharide de *Salmonella Minnesota* est 1000 fois plus actif que le lipopolysaccharide d'*Echerichia Coli* pour induire la production de NO dans des macrophages de rats [87]. Enfin, la production de métabolites de l'acide arachidonique (leucotriène, prostaglandines) et l'activation

macrophagique sont aussi dépendantes de l'origine des lipopolysaccharides. Cette dernière propriété est toutefois décrite seulement *in vitro* mais pas *in vivo* [88].

## B. Lipopolysaccharides et réponse immunologique anti tumorale : immunothérapie par les lipopolysaccharides

Il a été établi qu'un traitement par des lipopolysaccharides d'*Escherichia Coli* induit la régression d'une carcinose péritonéale avec ascite constituée de nodules mesurant de 1 à 5 mm, guérissant ainsi 20 à 30 % des rats [89,90]. Cette activité antitumorale est observée après 5 injections intra péritonéales de lipopolysaccharides, administrées 2 fois par semaine à la posologie de 100 µg/kg, permettant la régression du volume de la carcinose péritonéale macroscopique induite par injection de cellules de cancer colique (DHD/K12-PROb) chez des rats BDIX [86,91]. Cette activité antitumorale a été corrélée à leur capacité d'induire *in vivo* la sécrétion d'IL-1 par les macrophages, mais pas à la production de NO, de TNF-α ni d'IL-6 mesurée in vitro [86].

D'autres études rapportent l'activité anti tumorale des lipopolysaccharides. Ainsi, Miayamoto et al. rapportent que des souris C3H/He porteuses de carcinose péritonéale d'origine mammaire (MM2) traitées avec 10 injections IP de 30 µg d'endotoxines de *Klebsiella* administrées quotidiennement, avaient une survie significativement prolongée comparativement aux groupes témoins [92]. Dans un modèle de sarcome dans un modèle de souris A/J, Dye and North rapportent des résultats similaires après une injection unique de 25 µg d'endotoxine de *Salmonella enteriti* [93]. Ces résultats ont été aussi observés dans des modèles d'hépatocarcinome et de lymphomes [94].

Les différences d'efficacité observées entre les différents modèles sont d'origine multiple, mais peuvent être résumées par une immunogénicité différente des tumeurs utilisées, l'origine des endotoxines administrées, leur procédure d'extraction et enfin des schémas d'administration différents [85,86].

Cependant, l'administration de lipopolysaccharides à des patients porteurs de tumeurs n'est pas envisageable car la toxicité de ces dernières n'est pas acceptable.

Il est maintenant établi que l'activité anti tumorale des lipopolysaccharides est due à un de leurs composants, à savoir le lipide A [89]

## C. Lipides A

Les travaux de Westpahl et Lüderitz ont permis d'isoler le lipide A du lipopolysaccharide par un processus d'hydrolyse, ils ont ainsi obtenu les lipides A sauvages, toxiques [95].

### a. Propriétés biologiques des lipides A

Dans les années 1950, Westphal et Lüderitz ont posé le postulat que l'apparition de fièvre et d'un choc après administration d'endotoxine était en relation avec la fraction lipide A du lipopolysaccharide [95]. Cette hypothèse a été confirmée ensuite, d'une part par les travaux de Galanos et al. qui ont montré que l'activité pyrogène des lipopolysaccharides ne dépendait ni de la chaine O spécifique ni du noyau mais du lipide A, et d'autre part par les travaux de plusieurs équipes montrant que ces effets étaient reproduits par l'injection de lipide A seul [83]. Le rôle du lipide A fut ensuite définitivement établi lorsque que les équipes de Lüderitz et de Shiba réussirent la première synthèse du lipide A [96]. Ces travaux permirent de démontrer que le lipide A induisait les mêmes actions biologiques que les lipopolysaccharides. Par la suite des analogues de lipide A furent synthétisés dans le but de séparer la toxicité de l'activité immunologique.

### b. Récepteurs TLR4

Comme il a déjà été précisé précédemment, les TLR sont capables de reconnaitre les PAMPs de diverses origines microbiennes dont les lipides A. Ces derniers sont reconnus par le récepteur TLR4, formant un complexe avec les protéines MD2. Ainsi, les souris porteuses du gène « Lps » muté codant pour une forme non fonctionnelle du TLR4 sont insensibles à la stimulation par le lipopolysaccharide et par le lipide A [97].

### c. Effets du lipide A et réponse immunologique anti tumorale : immunothérapie par les lipides A

Dans la littérature, l'activité biologique rapportée le plus souvent, induite pour les lipides A est la production de TNF-$\alpha$. Il a été aussi démontré que l'injection de lipide A de *Porphyromonas gingivalis* chez la souris Balb/C modifiait l'activité des cellules NK qui s'en trouvait augmentée [98]. De plus, un analogue du lipide A, le monophosphoryl lipide A est

capable d'induire la maturation des cellules dendritiques dérivant de monocytes ainsi que la production d'IL-12 et l'expression de molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86, CD83). L'IL-1ß secrétée après traitement par le lipide A a aussi une action directe cytotoxique sur les cellules tumorales, avec une action renforcée in vivo par l'INF-γ dans un modèle de mélanome B16 chez la souris C57BL/6 [99].

L'injection de dérivés synthétiques du lipide A, généralement moins toxiques que les lipopolysaccharides, est capable d'induire la régression complète de carcinoses péritonéales macroscopiques (1-5 mm) chez 20 à 30% des rats BDIX. Cette activité anti-tumorale est dépendante de la structure du lipide A. Ainsi, l'activité tumorale est observée seulement avec les mono- ou di- glucosamines substitués avec au moins 3 acides gras d'au moins 6 carbones [89]. Sur le plan biologique, le lipide A induit la production d'IL-1β de TNF-α et d'IL-6 via l'activation des macrophages, la répétition des injections provoquant une tolérance des macrophages.

L'activité anti tumorale du lipide A a été aussi rapportée par d'autres équipes. Ukei et al. ont ainsi montré que le traitement par des dissacharides 504 et 505, dans des tumeurs sous cutanées induites par l'injection intradermique de cellules d'hépatocarcinome à des cobayes, provoque leur régression chez la moitié des animaux [100]. Des résultats similaires ont été rapportés sur un modèle proche par Takayama [101]. Nakatsuka et al. ont montré que l'injection IV de monosaccharide GLA-127 ralentissait la progression de tumeurs d'origine lymphomateuse ou sarcomateuse chez la souris Balb-c [102]. Dans ces articles, il a été démontré que ces dérivés étaient capables d'induire la production par les macrophages dans le plasma de TNF-α mais pas d'IL-1β, sans toutefois induire d'activité cytotoxique de ces mêmes macrophages.

Chez l'homme, des essais cliniques de phase 1 ont été réalisés avec différents lipides A préparés à partir de *S. typhirium* ou de *S. minesota* ou à partir de lipides A synthétiques comme le SDZ MRL 953 ou l'ONO-4007 [103,104,105]. Dans ces études, il a été démontré que quels que soient les lipides A administrés aux patients, ceux-ci étaient administrables sans toxicité rédhibitoire, les principaux effets observés étant un syndrome pseudogrippal associant fièvre et frissons survenant après les injections. Sur le plan biologique, le SDZ MRL 953 administré en injection unique à doses croissantes induisait une augmentation de la sécrétion de G-CSF et d'IL-6 sérique avec une augmentation du taux de neutrophiles circulants mais pas du TNF-α ou de l'IL-1ß [104]. Dans l'étude rapportée avec l'ONO-4007, il était observé une augmentation des taux sériques de TNF-α et d'IL-6 après chaque injection [103].

Afin d'améliorer la tolérance et l'efficacité des lipides A, de nouveaux composés ont été étudiés comme les triacyl lipides A.

# D. Le Triacyl lipide A OM 174

## a. Structure de l'OM-174

L'OM-174 est un 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2[(R)-3-dodecanoyloxytetradecanoylamino]-4-O-phospho-$\beta$-D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]-$\alpha$-D-glucopyranosyl dihydrogenphosphate. Il s'agit donc d'une di-glucosamine comportant 3 chaines d'acides gras (2 acides hydromyristiques fixés chacun sur un groupement amine et un acide laurique) et 2 groupements phosphates (Figure 7) [106]. Le fait qu'il s'agisse d'une molécule diphosphatée augmente sa solubilité. Il s'agit d'une extraction pure à 98-99% issue d'une souche mutée *d'Escherichia Coli*, le lipide A sauvage comportant 6 acides gras.

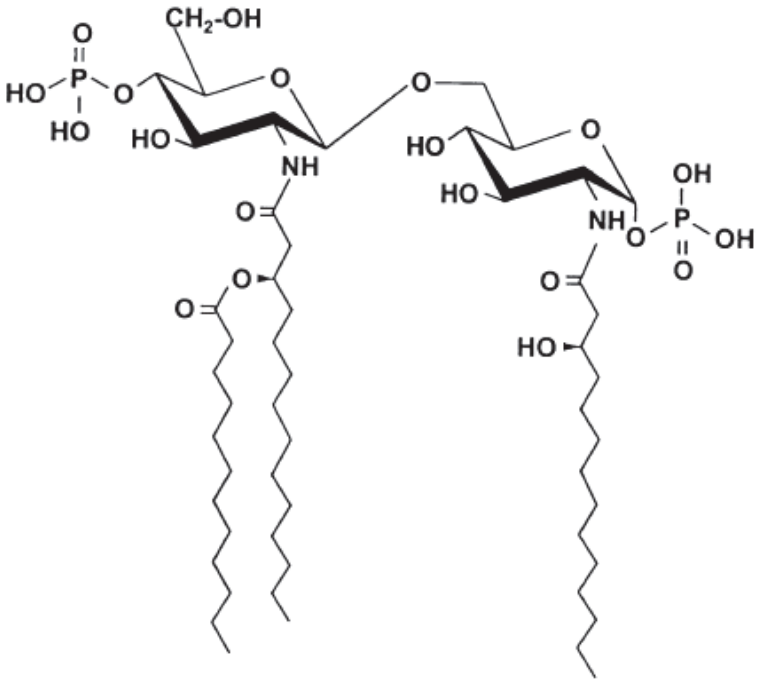



**Figure 7 : structure de l'OM-174**

### b. Immunothérapie par l'OM-174

L'OM-174 est capable d'induire la production d'IL-1β, de TNF-α, d'IL-6 et de Nitric Oxide (NO), par les monocytes/les macrophages murins *in vivo* et *in vitro*, l'accumulation d'IFN-γ et la diminution du TGF-β *in vivo* dans les tumeurs de modèles de cancers du côlon et du sein [106].

L'activité anti tumorale de l'OM-174 a pu être observée dans un modèle de carcinose péritonéale obtenue par injection intra péritonéale de cellules syngéniques de cancer colique (DHD/K12-PROb) chez des rats BDIX [91]. Ainsi l'injection intra péritonéale de 1 mg/kg d'OM-174, 2 fois par semaine pour un total de 5 injections permet d'obtenir, dans 80% des cas, la régression de la taille des nodules de carcinose avec disparition, dans tous les cas, de l'ascite hémorragique alors que tous les rats non traités meurent dans un délai de 8 à 12 semaines [107]. Des résultats similaires ont été obtenus avec 15 injections de la même dose d'OM-174 administrée par voie intra veineuse avec guérison de 95% des rats. Cet effet anti tumoral a été corrélé à l'expression de la NOS II avec production de NO dans la tumeur, et à la production de cytokines inflammatoire : IL-1ß, TNF-α, IL-6 et INF-γ ainsi qu'à la diminution de l'expression de TGF-ß dans la tumeur.

Parmi les rats guéris de leur carcinomatose péritonéale, l'injection sous-cutanée de cellules tumorales PROb, ne provoque pas de tumeur alors qu'elle en induit chez les rats contrôles. L'injection de cellules cancéreuses syngéniques autres que les PROb génère l'apparition de tumeurs chez les rats guéris comme chez les rats contrôles. La protection vis-à-vis des cellules PROb est transférée à des rats naïfs par les splénocytes de rats guéris. Ces derniers sont immunisés, une réaction immunitaire adaptative et une mémoire se sont donc développées. De plus, chez les rats Nude, déficients en lymphocytes T, le traitement par l'OM-174 n'a pas d'effet significatif sur la croissance tumorale PROb [108]. Le rejet des tumeurs PROb traitées par le lipide A est donc lié à une réponse immunitaire spécifique, impliquant des lymphocytes T, et par déduction la présence d'Ag tumoraux. La régression des tumeurs implique la mort de cellules tumorales donc des effecteurs cytotoxiques.

D'autre part, dans ce même modèle PROb, l'association oxaliplatine et OM-174 permet d'obtenir la guérison de tous les animaux en commençant le traitement 28 jours après l'injection des cellules tumorales, date à laquelle les carcinoses sont très développées et où l'utilisation de l'OM-174 seul ou d'oxaliplatine seul est peu efficace.

Cette activité anti tumorale a été également décrite dans d'autres modèles tumoraux comme le mélanome B16 chez la souris C57B16, le cancer mammaire EMT-6 chez la souris BALB/c, le

cancer colique CT26 chez la souris BALB/c. Alors que les souris non traitées meurent en quelques semaines, les souris traitées par des injections IV d'OM-174 tous les 5 jours présentent un ralentissement ou une inhibition de la croissance de leur tumeur ou une régression tumorale et une guérison.

# IV. Objectifs généraux du travail

L'effet anti-tumoral de l'OM-174 est dû à la mort d'une partie des cellules tumorales, mort très rapide, moins de 24h, attestée par leur apoptose (activation de la caspase 3 et clivage de la laminine 5). Cette rapidité n'est pas compatible avec une réaction immunitaire cellulaire, ni adaptative, ni innée, et précède l'infiltration des tumeurs par les neutrophiles, les DC, les macrophages et l'arrivée des lymphocytes T. L'OM-174 n'étant pas cytotoxique, la cytotoxicité devrait être due à un ou des médiateurs cytotoxiques. Dans le modèle de cancer mammaire chez la souris notre laboratoire a montré que le lipide A induisait la production d'IFN-γ in vivo, que le lipide A plus l'IFN-γ activaient la NOSII des cellules tumorales puis son découplage (production d'ions superoxides), et provoquaient la formation de péroxynitrites cytoxiques délétères pour les cellules tumorales. Cette première étape, qui a lieu également dans le modèle de cancer colique chez le rat, devrait fournir des antigènes aux cellules dendritiques dont nous avons montré qu'elles infiltraient les tumeurs et étaient activées (expression de B7) une semaine après le début du traitement. Le lipide A joue donc bien le rôle de PAMP, il n'est pas l'antigène (il n'est pas immunogène) mais fournit l'antigène et active les cellules dendritiques. Il est probable que la réaction immunitaire soit donc ainsi déclenchée. Est-ce que cette étape est suffisante ? Il est nécessaire de répéter les injections de lipide A pour que le traitement soit efficace, ce qui peut signifier que la réaction immunitaire ait besoin d'être réinitialisée pour éliminer la totalité des cellules tumorales, ou que d'autres mécanismes de mort cellulaire doivent être engagés. Au cours du traitement une infiltration des tumeurs par des neutrophiles puis des macrophages et des lymphocytes T est observée. Le lipide A poursuit son rôle de PAMP en provoquant une infiltration des tumeurs par des cellules inflammatoires. Nous avons montré, dans les modèles de cancer du côlon chez le rat et chez la souris, que les neutrophiles étaient nécessaires à l'effet anti-tumoral du lipide A par leur sécrétion de granzyme B.

Cette thèse a été entreprise afin de déterminer si l'homme pouvait être traité par l'OM-174 et si le même mécanisme impliquant les neutrophiles était possible.

Pour cela, nous avons tout d'abord conduit une étude de phase 1 avec l'OM-174 chez des patients porteurs de tumeurs solides réfractaires afin de démontrer que ce traitement était bien toléré chez ces patients et qu'il pouvait induire chez ces mêmes patients la sécrétion de cytokines

impliquées dans la réponse immunitaire et notamment dans le recrutement des neutrophiles. Nous avons ensuite, dans un second temps démontré la possibilité d'une implication des neutrophiles dans cette réponse immunitaire en vérifiant la présence de neutrophiles dans les tumeurs coliques humaines et analysant leur localisation au voisinage ou non des cellules tumorales. Puis nous avons fait une analyse comparative par rapport au tissu sain, recherché si ces neutrophiles exprimaient le ganzyme B et recherché l'expression de chimio attractants dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Enfin une corrélation entre quantité de neutrophiles présents dans la tumeur colique et devenir des patients a été recherchée.

# MATERIEL ET METHODES

# I. Etude de phase 1 avec l'OM-174 chez des patients adultes porteurs de tumeurs solides réfractaires

Cette étude de phase 1 (N° d'identification ClinicalTrials.gov NCT01800812) a été menée au sein de l'unité de phase précoce du Centre Georges-François Leclerc-INSERM CIC-P 803 à Dijon. Selon la réglementation en vigueur, le protocole d'étude ainsi que tous ses amendements, conçu selon la Déclaration d'Helsinki et menés conformément aux recommandations des bonnes pratiques cliniques, ont été approuvés par le Comité d'éthique et les autorités sanitaires [109]. Le consentement éclairé écrit a été obtenu pour chaque patient participant avant son inclusion dans l'étude. L'OM-174 était donné par le laboratoire OM-Pharma (Genève, Suisse).

## A. Sélection des patients

Les patients étaient éligibles s'ils étaient âgés de plus de 18 ans. Ils devaient être porteurs d'une tumeur solide à un stade localement avancé ou métastatique, prouvée histologiquement, pour laquelle il n'existait pas de traitement standard curatif. Cette tumeur devait être mesurable selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) version 1 et être progressive en dehors du système nerveux central [110]. De plus, les patients devaient avoir une espérance de vie estimée supérieure à 3 mois, un performans status de l'OMS inférieur ou égal à 2, ne pas avoir d'autres pathologies non contrôlées comme une infection bactérienne en cours, une maladie cardiaque concomitante à type de dysrythmie, d'insuffisance cardiaque nécessitant un traitement digitalo-diurétique, une hypertension artérielle non stabilisée (> 180/110 mm Hg), un angor ou un antécédents de nécrose myocardique, un trouble sévère de la conduction (BAV (Bloc Auriculo Ventriculaire) du 2$^{ème}$ degré et du 3$^{ème}$ degré non appareillés, bloc bi-fasciculaires) ou des signes ischémiques électrocardiographiques. Une fonction hématologique normale ainsi que l'absence d'insuffisance hépatique ou d'altération de la fonction rénale étaient requises. Les patients devaient avoir récupéré des effets indésirables des traitements antérieurs et une période de wash-out de minimum 4 semaines et 6 semaines en cas d'administration préalable de nitroso urés ou de mitomycine C était demandée. Les principaux critères d'exclusion étaient un antécédent médical de maladie auto-immune et un traitement par corticostéroïdes au long court.

## B. Schéma d'escalade de dose

Les expériences dans les modèles animaux ayant montré que l'activité anti tumorale maximale de l'OM-174 était observée après 15 injections, il a été décidé de prendre en compte non seulement la dose d'OM-174 mais aussi le nombre d'injections pour définir les différents paliers de dose à explorer. Le schéma d'escalade de dose prévoyait d'explorer les doses suivantes d'OM-174 : 600 µg/m², 800 µg/m², 1000 µg/m² et un nombre croissant d'injections, soit 5, 10 et 15. Trois à 6 patients étaient inclus à chaque niveau de dose. Les patients étaient surveillés durant les 2 premières semaines avant de pouvoir envisager le passage au niveau de dose supérieur. Selon la méthodologie classique des études de phase 1, la DMT (Dose Maximale Tolérée) a été définie comme le niveau de dose au cours duquel au moins 2 des patients inclus à un palier de dose présentèrent une toxicité dose-limitante. La dose recommandée était défini comme le niveau de dose en-dessous de la DMT.

## C. Définition des toxicités dose-limitantes

Les toxicités dose-limitantes étaient définies selon la terminologie CTCAE (Common Toxicity Criteria for Adverse Events) du National Cancer Institute version 2.0 comme tous les événements suivants imputables à l'OM-174 (c'est-à-dire survenant pendant la délivrance du médicament et une période de 30 jours après la dernière injection) :

- neutropénie de grade 4 durant plus de 5 jours consécutifs
- neutropénie fébrile
- infection associée à une neutropénie;
- thrombopénie de grade 4 ou thrombopénie de grade 3 associée avec des saignements nécessitant transfusion de plaquettes
- anémie de grade 4
- tout autre effet secondaire de grade 3 ou plus liés au traitement sauf nausées, vomissements et alopécie

## D. Modalité d'administration de l'OM-174

Dans cet essai ouvert, l'OM-174 était administré par voie intraveineuse en perfusion de 15 minutes deux fois par semaine à intervalle répété de 3 à 4 jours. Sur la base des résultats d'une

étude de phase I non publiée évaluant une administration unique d'OM-174 chez des patients porteurs de tumeurs solides réfractaires dans laquelle un seul événement indésirable grave, à savoir une hypoxie sévère transitoire, s'est produit à la dose de 800 µg/m² et la MTD a été définie à 1300 µg/m², il a été décidé que tous les patients recevraient une première administration de 600 µg/m² afin de réduire le risque de réaction sévère. Le protocole d'escalade de dose et les niveaux de dose sont décrits dans le tableau 1.

| Palier | Nombre injections par patients | Dose par injection |
|---|---|---|
| 1 | 5 | 600 µg/m² |
| 2 | 10 | 600 µg/m² |
| 3 | 15 | 600 µg/m² |
| 4 | 5 | 800 µg/m² |
| 5 | 10 | 800 µg/m² |
| 6 | 15 | 800 µg/m² |
| 7 | 5 | 1000 µg/m² |
| 8 | 10 | 1000 µg/m² |
| 9 | 15 | 1000 µg/m² |

**Tableau 1 : schéma d'escalade de dose**

## E. Evaluation préthérapeutique et suivi des patients

Pour chaque patient, il devait être réalisé dans les 7 jours qui précédaient le début du traitement la recherche de ses principaux antécédents. Son traitement habituel devait être précisé. Un examen physique complet évaluant notamment son poids, sa taille, sa surface corporelle, sa tension artérielle, son pouls, sa fréquence respiratoire, sa température et son état général selon les critères OMS (Organisation Mondiale de la Santé) était aussi réalisé ainsi que des analyses biologiques standards. Celles-ci comportaient une numération formule et plaquettes sanguines, un test de grossesse pour les femmes en âge de procréer, un ionogramme sanguin, un dosage de la créatinine, de la clairance de la créatinine mesurée ou estimée, de l'albumine, de la bilirubine, des enzymes hépatiques (Aspartate-Amino transférase et Alanine-Amino Transferase), des

phosphatases alcalines des gammaglutamyl-transpeptidases, de la Protéine C Réactive et des marqueurs tumoraux si utiles.

Durant le traitement, les constantes cliniques (tension artérielle, pouls, température) étaient mesurées 30 min avant puis 30 min, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 24 heures après le début de la perfusion. Une surveillance biologique comportant une numération formule sanguine et plaquettes ainsi qu'un bilan biochimique était réalisés avant chaque injection.

Toutes les toxicités ont été gradées selon les critères CTCAE version 2.0.

Chaque patient devait recevoir l'ensemble du traitement, sauf en cas de progression précoce, de survenue d'une toxicité inacceptable, du choix de l'investigateur ou le refus du patient.

Les évaluations tumorales étaient réalisées à l'inclusion du patient puis à la fin du traitement et en cas de contrôle de la maladie de façon mensuelle jusqu'à progression. Les réponses étaient évaluées en utilisant les critères RECIST version 1 [110].

## F. Détermination des paramètres pharmacocinétiques

Des échantillons sanguins permettant la détermination des paramètres pharmacocinétiques de l'OM-174 ont été réalisés juste avant la première administration puis 1 h, 2 h, 4 h, 24 h après et avant l'administration puis 1 et 2 h après les $2^{ème}$, $3^{ème}$, $5^{ème}$, $9^{ème}$ et $15^{ème}$ injections le cas échéant. Pour toutes les autres injections, deux échantillons sanguins ont été prélevés, un avant et un à la fin de la perfusion. Les paramètres pharmacocinétiques suivants ont été évalués : la concentration maximale ($C_{max}$), le délai d'atteinte de la $C_{max}$ ($T_{max}$), l'aire sous la courbe (AUC), l'aire sous la courbe à partir de l'instant zéro jusqu'à l'infini ($AUC_{0\text{-}inf}$) qui correspond à un calcul de la moyenne des niveaux de concentration, la clairance systémique, le volume de distribution (Vdβ) et la demi-vie (t1/2_lambda_z).

## G. Mesure des cytokines

Des échantillons sanguins ont été prélevés pour le dosage de différentes cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α) en même temps que des échantillons prélevés pour les analyses pharmacocinétiques. Les dosages de ces différentes cytokines ont été effectués par la technique Cytometric Bead Arrays (CBA, BD Biosciences®, NJ, US). Les sérums des patients ont été incubés avec des billes de capture marquées et des réactifs de détection pendant 3 heures dans

l'obscurité à température ambiante et ont été analysés avec un cytomètre de flux (FACSCalibur, BD Biosciences®, NJ, US) en utilisant le logiciel d'analyse CBA (BD Biosciences) et Bender MedSystems. Chaque dosage a été réalisé en double pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, comme précédemment décrit [111,112].

## H. Analyses de l'activité NK

Des échantillons de sang pour l'analyse de l'activité des cellules NK ont été collectés avant et 2 heures après la 1ère, 2ème, 3ème, 9ème et 15ème injections. Les cellules NK ont été isolées des lymphocytes circulants par centrifugation en gradient de concentration (Unicep, Novamed, Jérusalem) et purifiées avec des microbilles magnétiques recouvertes de CD56 (Miltenyi Biotec). Les cellules NK étaient ensuite incubées avec ou sans IL-2 recombinante pendant 40 h, puis incubées dans des plaques à 96 puits pendant 4 h avec des cellules leucémiques humaines K562 ou des cellules Daudi qui ont été utilisées comme cellules cibles afin d'obtenir un ratio NK / cellules cibles de 10. La cytotoxicité des cellules NK a ensuite été déterminée par la méthode classique du test de relargage du chrome.

## I. Analyse du polymorphisme de TLR4

L'analyse de 2 polymorphismes de nucléotides simples de TLR, à savoir $TLR4_{D299G}$ et $TLR4_{T399I}$ a été réalisée comme précédemment décrite par Ducloux et al [113].
Avant l'analyse du polymorphisme, l'ADN génomique a été extrait à partir du sérum de chaque patient et amplifié en utilisant la technique d'amplification du génome entier. L'analyse du polymorphisme a ensuite été effectuée en utilisant la méthode de restriction du polymorphisme et une PCR pour chaque polymorphisme de TLR4, ainsi qu'un séquençage direct des TLR4.

## J. Analyse statistique

En raison de la nature même de cette étude, l'évaluation des données consistait principalement en des analyses statistiques descriptives. Ainsi, les variables qualitatives ont été décrites par leur fréquence en pourcentage de la population concernée. Quant aux variables

quantitatives, elles ont été décrites par les caractéristiques suivantes : moyenne, écart type, médiane, minimum et maximum.

Concernant la description de la population incluse, l'analyse a porté d'une part sur la totalité des patients ayant reçu au moins une injection et d'autre part sur la population des patients éligibles et évaluables pour la réponse.

Concernant l'analyse du critère principal, à savoir la tolérance, celle-ci a été étudiée par palier de dose sur la totalité des patients ayant reçu au moins une injection d'OM-174, tout comme les paramètres biologiques analysés en fonction de la dose et du schéma de traitement.

Concernant les critères secondaires, le taux de réponse objective a été estimé sur la population dite d'analyse en intention de traiter. Le temps jusqu'à progression a été estimé chez les patients ayant reçu au moins une injection d'OM-174.

# II. Analyse histologique

## A. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran

C'est la coloration trichromique de routine en histopathologie L'hématoxyline est une substance plutôt basique, qui colore les noyaux en violet. L'éosine est une substance plutôt acide, qui colore les cytoplasmes en rose. Enfin, le safran colore les fibres de collagène en jaune.

- Déparaffinage

Après séchage des lames dans une étuve à 58°C pendant 16 minutes, un déparaffinage est réalisé en trempant les lames successivement dans deux bains de toluène puis un bain d'alcool à 100%, 95% et 70%. Chaque bain a une durée de 5 minutes.

- Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

Pour la coloration, les lames subissent les étapes suivantes :

- Bain de 5 minutes dans l'hématoxyline GILL 2 (Thermo scientific, Ref 6765007, Pittsburgh, PA)

- Rinçage à l'eau courante pendant 3 minutes
- Bain de 10 secondes dans l'alcool acide (3 ml d'acide chlorhydrique dans 650 ml d'éthanol absolu)
- Rinçage à l'eau bicarbonatée durant 1 minute
- Rinçage à l'eau courante durant 2 minutes
- Bain dans alcool à 100% pendant 1 minute
- Bain dans l'éosine Y alcoolique pendant 20 secondes (Thermo scientific, Ref 6766007, Pittsburgh, PA)
- Bain dans alcool à 100° pendant 2 fois 2 minutes
- Bain au safran alcoolique (20g de safran dans 1250 ml d'alcool absolu étuvé à 60°C) pendant 7 secondes
- Bain dans alcool à 100° pendant 2 minutes puis 1 minute
- Bain au toluène pendant 1 minute

Il est ensuite effectué le montage des lames. Après séchage à l'air ambiant, les neutrophiles sont quantifiés par comptage soit sous microscope optique soit après avoir scanné les lames avec un NanoZoomer® (Hamamatsu Photonics)

## B. Coloration au May-Grünwald Giemsa

C'est la coloration utilisée en routine pour identifier les cellules hématologiques avec les caractéristiques suivantes :

| Coloration May-Grünwald-Giemsa | Coloration |
|---|---|
| basophile | bleu |
| éosinophile | orange |
| neutrophile | beige-rose |
| azurophile | pourpre |

Cette coloration cytologique fait agir successivement 2 colorants neutres : le May Grünwald qui colore les noyaux en bleu et les cytoplasmes basiques en rouge et le Giemsa qui colore les noyaux en rouge violacé, les cytoplasmes en bleu ou en rose suivant les cellules et les

éléments azurophiles en rouge pourpre intense. Sur des préparations bien fixées et fines, cette coloration colore les cellules de façon plus nuancées, mettant particulièrement bien en évidence le caractère basique ou acide des cytoplasmes et les granulations des leucocytes.

- Déparaffinage

Après séchage des lames dans une étuve à 58°C pendant 16 minutes, un déparaffinage est réalisé en trempant les lames successivement dans deux bains de toluène puis un bain d'alcool à 100%, 95% et 70%. Chaque bain a une durée de 5 minutes.

- Coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Les lames déparaffinées sont plongées dans une solution diluée extemporanément de mélange May Grünwald / eau distillée (15 ml pour 60 ml d'eau distillée) pendant 15 min à 37°C à l'étuve. Les lames sont ensuite passées sans lavage préalable dans une solution diluée extemporanément de mélange Giemsa Lent (10 ml pour 90 ml d'eau distillée) pendant 40 min à 37°C à l'étude. Les lames sont ensuite lavées à l'eau distillée.
Après séchage à l'air ambiant, les neutrophiles sont quantifiés par comptage soit sous microscope optique soit après avoir scanné les lames avec un NanoZoomer® (Hamamatsu).

## C. Quantification de l'infiltrat tumoral en polynucléaires neutrophiles

La quantification de cette infiltration a été effectuée avec l'aide d'un pathologiste à partir de lames colorées de façon standard par le HES. Les tumeurs étaient ensuite classées en 4 groupes selon les critères définis dans le tableau 2.

La même analyse a ensuite été refaite à partir des lames colorées en MGG.

| Score | Infiltration tumorale en polynucléaires neutrophiles |
|---|---|
| **0** | Absence de polynucléaires neutrophiles dans les zones tumorales en dehors des zones d'ulcération, après analyse minutieuse de la coupe entière |
| **1+** | Présence de polynucléaires neutrophiles isolés ou en petits amas de 2-3 éléments dans les zones tumorales en dehors des zones d'ulcération. Ces polynucléaires neutrophiles sont difficiles à trouver après analyse minutieuse de la coupe entière |
| **2+** | Présence de polynucléaires neutrophiles isolés ou en petits amas dans les zones tumorales en dehors des zones d'ulcération. Ces polynucléaires neutrophiles sont faciles à trouver après analyse minutieuse de la coupe entière et intéressent plus d'une zone |
| **3+** | Présence évidente de polynucléaires neutrophiles isolés ou en amas dans plusieurs zones tumorales en dehors des zones d'ulcération. |

**Tableau 2 : score d'infiltration tumorale en polynucléaires neutrophiles**

## D. Marquage immunohistochimique par le granzyme B

Les marquages immunohistochimiques permettent d'identifier et de localiser différents constituants tissulaires et cellulaires en utilisant des Ac spécifiques. Ce marquage peut se faire de façon directe en utilisant un Ac couplé à une enzyme comme la peroxydase capable de dégrader un substrat tel le 3,3 diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) ou le 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) donnant un précipitât insoluble et coloré que l'on visualise aisément sur microscope optique. Ce marquage peut aussi se faire de manière indirect en utilisant un 2$^{ème}$ voir un 3$^{ème}$ Ac, ces derniers étant alors couplé à l'enzyme à l'origine de la réaction colorée.

Dans ce travail, afin de visualiser le granzyme B, un marquage immunohistochimique a été réalisé en utilisant un automate Benchmark XT (Ventana®, US, AR) à partir de lames fixées en paraffine. Après une étape de réhydratation des lames, les différentes étapes réalisées par l'automate ont été les suivantes :

- déparaffinage par l'utilisation d'une solution aqueuse EZ Prep (Ventana®, US, AR, Ref 950-102)
- démasquage antigénique (ou restauration antigénique) avec une 1ère solution tampon pH 7,8 (Cell Conditionner 1, Ventana®, US, AR, Ref 950-124) et une seconde solution équivalent du tampon citrate pH 6 (Cell Conditionner 2, Ventana®, US, AR, Ref 950-123)
- incubation avec l'Ac anti granzyme B (Ventana®, US, AR, Ref 760-4283) dilué au 1/100 pendant 32 minutes à 37°C
- après une étape de lavage, une contre coloration par l'hematoxyline est effectuée pendant 4 minutes suivi d'une post contre coloration avec une solution Bluing Reagent (Ventana®, US, AR, Ref 760-2037) pendant 4 minutes avant un dernier lavage

## E. Marquage en immunofluorescence

Afin de marquer les polynucléaires neutrophiles, nous avons utilisé un anticorps anti CD66b (Biolegend®, San Diego, CA). CD66b est une GPI-linked glycoproteine de 95 à 100 kD aussi dénommée CD67, CGM6 ou NCA-95, faisant partie de la superfamille des immunoglobulines, exprimée au niveau de la membrane des granuleux. Un marquage du granzyme B des neutrophiles ou des autres cellules immunitaires a été réalisé en utilisant un anticorps anti granzyme B (Thermo Scientific, , US, IL ; Ref PA1-26616).

Préalablement, toutes les lames sont déparaffinées en les trempant successivement dans trois bains de xylène de 3 min chacun puis successivement un bain d'alcool à 100%, 95% et 70% de 2 minutes chacun. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante puis un démasquage des Ag est réalisé en trempant les lames dans un tampon citrate pH 7,3 chauffé à 95°C pendant 20 min.

### a. Marquage des polynucléaires neutrophiles par le CD66b

Après avoir été refroidies pendant 20 min, les lames sont trempées dans un bain d'une solution PBS 1x/Tween 20 0,1%. Les sites antigéniques non spécifiques sont ensuite saturés par une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 3% et sérum de chèvre dilué au 1/20 (isotype de l'Ac secondaire biotinylé utilisé) pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps

primaire anti CD66b dilué au 1/50 dans une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1% est déposé sur les lames pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages successifs au PBS 1x/Tween 20 0,1%, les lames sont incubées dans une chambre humide à l'obscurité pendant 40 min avec un Ac secondaire couplé à la biotine dilué au 1/200 dans une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1%/ sérum humain 10%. Après 3 nouveaux lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1%, les lames sont incubées avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome (Alexa 488, Molecular Probes®, Invitrogen™ by Life technologiesTM) diluée au 1/500 dans la même solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1%/ sérum humain 10% pendant 40 min. Après 3 lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1% puis à l'eau distillée, des lamelles sont alors montées sur les lames à l'aide d'un milieu de montage contenant du DAPI ((Molecular Probes®, Invitrogen™ by Life technologiesTM) permettant à la fois de visualiser les noyaux et le marquage antigénique étudié. Les lames sont ensuite séchées pendant 12 heures à 4°C à l'obscurité.

### b. Marquage du granzyme B

Le même protocole que le précédent a été réalisé en utilisant comme anticorps primaire un Ac anti granzyme B dilué au 1/50 et comme fluorochrome l'Alexa 568 (Molecular Probes®, Invitrogen™ by Life technologies™) dilué au 1/500.

### c. Double marquage par le granzyme B et le CD66b

Après avoir été refroidies pendant 20 min, les lames sont trempées dans un bain d'une solution PBS 1x/Tween 20 0,1%. Les sites antigéniques non spécifiques sont ensuite saturées par une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 3% et sérum de chèvre dilué au 1/20 (isotype de l'Ac secondaire biotinylé utilisé) pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire anti granzyme B dilué au 1/50 dans une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1% est déposé sur les lames pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages successifs au PBS 1x/Tween 20 0,1%, les lames sont incubées dans une chambre humide à l'obscurité pendant 40 min avec un Ac secondaire couplé à la biotine dilué au 1/200 dans une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1%/ sérum humain 10%. Après 3 nouveaux lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1%, les lames sont incubées avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome (Alexa 568, Molecular Probes, Invitrogen) diluée au 1/500 dans la même solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1%/ sérum humain 10% pendant 40 min. Après 3 lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1%,

une nouvelle saturation est effectuée avec une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 3% suivie d'une incubation avec l'Ac anti CD66b dilué au 1/50 dans une solution PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1% pendant 40 min. Après 3 lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1%, les lames sont incubées pendant 40 min avec Ac spécifique marqué avec un fluorochrome (Alexa 488, Molecular Probes, Invitrogen) dilué au 1/500 dans une solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/BSA 1%/ sérum humain 10%. Après 3 lavages au PBS 1x/Tween 20 0,1% puis à l'eau distillée, des lamelles sont alors montées sur les lames à l'aide d'un milieu de montage contenant du DAPI (Molecular Probes®, Invitrogen™ by Life technologies™). Les lames sont ensuite séchées pendant 12 heures à 4°C à l'obscurité.

La lecture des lames a été faite sur un microscope à fluorescence Axio Imager 2 utilisant le logiciel AxioVision.

## F. Patients et maladies

Pour chaque patient dont les lames ont été analysées, les caractéristiques suivantes ont été collectés : âge au diagnostic, sexe, localisation tumorale, type histologique, stade de la maladie (taille tumorale, envahissement ganglionnaire, présence de métastases), traitement reçu et évolution.

## G. Analyse statistique

L'évaluation des données a consisté pour les variables qualitatives en la description de leur fréquence en pourcentage de la population concernée. Pour les variables quantitatives, elles ont été décrites par les caractéristiques suivantes : moyenne, écart type, médiane, minimum et maximum.

Les différences entre les différents groupes ont été évaluées en utilisant le test de Fisher en raison du faible effectif de la population étudiée. La survie globale a été définie par l'intervalle entre le diagnostic et le décès du patient. Pour les patients survivants, les données ont été censurées à la date des dernières nouvelles. Les courbes de survie ont été déterminées en utilisant la méthode de Kaplan Meier et comparées avec le test du log-rank. Des analyses univariées et

multivariées utilisant le modèle de Cox ont été réalisées pour calculer les hazard ratio avec des intervalles de confiance à 95%. Les différences étaient considérées comme significatives en cas de valeur de $p< 0,05$. Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel Stata V11 software.

# III. Analyse de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes a été faite à partir de bloc issus de patients porteurs de tumeurs colorectales en prélevant à la fois du tissu tumoral et du tissu sain péri lésionnel afin de pouvoir réaliser des études comparatives.

## A. RT-PCR

### a. Préparation et extraction des ARN totaux à partir des tissus

Cette extraction est réalisée à partir de 50 à 100 mg de tissu tumoral ou sain conservé dans l'azote liquide. Après avoir pesé les échantillons tissulaires, ces derniers sont dilacérés et homogénéisés à 4°C dans 1 mL trizol (TRIzol® Reagent Agent, Ambion®/RNA by Life Technologies™, CA) au moyen d'un Polytron (ULTRA TURRAX T25, Janke et Hunkle, IKA Labortechnik) 15 à 60 secondes au maximum de sa vitesse [114]. Les débris cellulaires insolubles sont éliminés par centrifugation 5 mn à 3000 g à 4°C. Le surnagent contenant l'ARN est ensuite transféré dans de nouveaux tubes.

- Phase de séparation

Cette étape est réalisée en ajoutant dans le surnageant 200 µL de chloroforme. Les tubes sont ensuite vortexés afin d'obtenir une solution homogène, laissées 2 mn à température ambiante puis centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse contenant l'ARN est récupérée, transférée dans nouveaux tubes. Cette étape de séparation est ensuite

réalisée une deuxième fois afin de limiter au maximum le risque de contamination. Enfin la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube.

- Phase de précipitation de l'ARN

Le surnageant est précipité avec 200 µL d'isopropanol. Après homogénéisation de la solution par vortexage, celle-ci est incubée pendant 10 minutes à température ambiante puis centrifugée à 18 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé par pipetages itératifs.

- Phase de lavage

L'ARN est lavé et resuspendu avec 1 mL d'éthanol à 75% puis centrifugé à 20 000 g à 4°C pendant 5 minutes. Ensuite l'éthanol est éliminé par pipetages itératifs et le culot d'ARN séché à 4°C. Un deuxième lavage à l'éthanol à 75% est ensuite réalisé.

- Phase de réhydratation et conservation

L'ARN est réhydraté dans 20 à 50 µL d'eau RNAse Free et conservé à - 80°C.

### b. Quantification des ARN totaux

La concentration d'ARN est déterminée par une simple lecture de la densité optique (DO) à la longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques qui est de 260 nm, en sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN. Cependant, comme pour l'ADN, une lecture optique de la DO est également faite à 280 nm pour vérifier l'absence de contamination protéique : par conséquent le rapport DO 260 nm/ DO 280 nm doit être compris entre 1,5 et 2.

La mesure est effectuée en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, US, IL).

### c. Réaction de RT-PCR

Une synthèse d'ADNc a été ensuite réalisée par reverse transcription à partir des ARN totaux extraits. La réaction se fait à partir de 1 µg d'ARN total contenu dans un volume final de

13 µL, en présence d'amorces aléatoires (Random hexamères) et de dNTP. Ce mélange est tout d'abord dénaturé 5 minutes à 65°C puis refroidi immédiatement sur la glace. On y ajoute ensuite du dithiotréitol (DTT) ainsi que la reverse transcriptase avec son tampon. Le volume final est alors de 20µl. Les conditions de reverse transcription sont les suivantes :

- 10 minutes à 25°C
- 50 minutes à 37°C
- 15 minutes à 70°C

Les ADNc synthétisés sont conservés à – 20°C.

## B. q-PCR (ou PCR quantitative)

### a. Détermination des amorces

Afin de déterminer la séquence de nos amorces pour la réalisation de la q-PCR, nous avons utilisé le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Nous avons ensuite vérifié l'absence de dimères d'amorces avec le site Oligo Design and Analysis Tools (http://eu.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx).

Les séquences des amorces ont été déterminées en fixant les conditions standards suivantes :

- Tm de 60°C +/- 1°C
- avec une taille d'amplicon de moins de 200 bp
- et au moins une amorce sur une liaison exon-exon

En fonction de la difficulté à trouver des amorces, ces conditions standards ont pu être modifiées notamment en ce qui concerne la taille de l'amplicon ainsi que la localisation exon-exon. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 2. Les contrôles avec les gènes de β-actine et 18S ont été réalisés avec respectivement les kits Endogenous control (Life technologies™) Human ACTB Endogenous Control (4326315E) et Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (4310893E).

| Gène d'intérêt | Séquence amorce sens<br>Séquence amorce anti sens | Taille amplicon (bp) | Tm (°C) |
|---|---|---|---|
| **IL-1β** | GAAGCTGATGGCCCTAAACA<br>AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG | 110 | 82.3 |
| **IL-2** | AATCCCAAACTCACCAGGATGCTCA<br>TCTGTGGCCTTCTTGGGCATGT | 59 | 74 |
| **IL-6** | CGAGCCCACCGGGAACGAAAG<br>ACTGGACCGAAGGCGCTTGTG | 88 | 80 |
| **IL-8** | TGACTTCCAAGCTGGCCGTGG<br>AAACTGCACCTTCACACAGAGCTGC | 72 | 77 |
| **IL-10** | CCTGACTGGGGTGAGGGCCA<br>GCTTGGCAACCCAGGTAACCCTTA | 210 | 71 |
| **IL-12β** | CTGCCCAGAGCAAGATGTGTCACC<br>GCCACGAGGGGAGATGCCAGAA | 79 | 79 |
| **CXCL1** | GAAAGCTTGCCTCAATCCTG<br>CTTCCTCCTCCCTTCTGGTC | 274 | 77 |
| **CXCL2** | GCTCCTTGCCAGCTCTCCTCCT<br>TGTGGCTATGACTTCGGTTTGGGC | 285 | 89 |
| **CXCL3** | CGCCCAAACCGAAGTCATAGCCA<br>TGGTAAGGGCAGGGACCACCC | 187 | 80 |
| **CXCL5** | TGTTGAGAGAGCTGCGTTGCGTT<br>GGAGGCTACCACTTCCACCTTGG | 122 | 80 |
| **NCF1** | GCAGACGTACCGCGCCATTG<br>GAACCACCAACCGCTCTCGC | 112 | 84 |
| **NCF2** | TGTTCAACGGGCAGAAGGGGC<br>GCTGGGATGTCGGACTGCGG | 115 | 83 |
| **Granzyme B** | AGCAAGGAGGAAACAACAGCAGCTC<br>TGATCTCCCCTGCATCTGCCCT | 114 | 83 |
| **IFN-γ** | CGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTA<br>GGCTGCCTAGTTGGCCCCTG | 295 | 76 |
| **IFN-α1** | AGCCCTTGTGCCTGGGAGGTT<br>GCATGGTCATAGTTATAGCAGGGGTGA | 201 | 78 |
| **azurocidine** | GAATCAAGGCAGGCACTTCT<br>CTCAGGTCATAGGCACCCAG | 126 | 85.5 |

**Tableau 3 : amorces utilisées pour la q-PCR**

### b. Conditions de q-PCR

La réaction se fait sur 12,5 ng d'ADNc en présence de 12,5 µL de Mix POWER Sybr® Green 2x, d'amorces sens 200 nM et d'amorces anti-sens 200 nM pour un volume final de 25 µL. Chaque échantillon est réalisé en duplicate.

Après une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C sont réalisés.

### c. Analyse des résultats

Les résultats ont été normalisés et analysés par rapport à l'expression de la Beta-actine en utilisant la méthode du $2^{e-\Delta CT}$ décrite par Livak et Schmittgen [115].

L'analyse statistique des résultats a été faite en utilisant les tests de Mann et Whitney, Kruska Wallis et Wilcoxon à partir du logiciel StatView® pour Windows. Les différences avec $p< 0, 05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Le programme GraphPad Prism, version 4.03 pour Windows a été utilisé pour la représentation graphique des résultats des analyses statistiques (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## IV. Analyse de l'impact fonctionnel de l'infiltration des neutrophiles sur la tumeur

Les données ont été décrites en termes de fréquence (pourcentage) ou de moyenne (déviation standard) et de médiane [min-max]. Les différences entre les groupes ont été évaluées par le test du chi carré ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives et le test de Student ou test de Kruskall Wallis pour les variables continues. La survie globale (OS) a été définie comme le temps écoulé depuis la date du diagnostic jusqu'au décès (toutes causes confondues). Les patients survivants ont été censurés à la date du dernier suivi. Les courbes de survie ont été établies avec la méthode de Kaplan-Meier et comparées avec le test du log-rank. Des analyses univariées et éventuellement multivariées (modèle de Cox des risques proportionnels) ont été utilisées pour calculer les ratios de risque avec des intervalles de confiance à 95%. Le suivi médian a été calculé avec la méthode de Kaplan-Meier inversé.
Toutes les valeurs p étaient jugées significatives lorsqu'elles étaient inférieures à 0,05. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel Stata V11.

# RESULTATS

# I. Etude de phase 1 avec l'OM-174 chez des patients adultes porteurs de tumeurs solides réfractaires

## A. Caractéristiques des patients inclus

Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 4.

| | N = 17 | % |
|---|---|---|
| **Age (années)** | | |
| Moyenne | 59,7 | |
| Médiane [min - max] | 59 [44 - 75] | |
| **Sexe** | | |
| Femmes | 8 | 47 |
| Hommes | 9 | 53 |
| **Performans Status OMS** | | |
| 0 | 3 | 18 |
| 1 | 12 | 70 |
| 2 | 7 | 12 |
| **Type de cancer** | | |
| Colo rectal | 7 | 41 |
| Sein | 5 | 29 |
| Ovaire | 2 | 12 |
| Poumon non à petites cellules | 1 | 6 |
| Tête et cou | 1 | 6 |
| Hépatocarcinome | 1 | 6 |
| **Sites de métastases** | | |
| Foie | 11 | 65 |
| Poumon | 9 | 53 |
| Ganglion | 5 | 29 |
| Os | 3 | 18 |
| Cérébral | 1 | 6 |
| Surrénales | 1 | 6 |

**Tableau 4 : caractéristiques des patients inclus dans l'étude de phase 1**

Dix-sept patients, 8 femmes et 9 hommes, ont été inclus sur une période de 33 mois. La médiane d'âge des patients était de 59 ans [44 - 75]. Les principaux types représentés étaient le cancer colo rectal (7 patients), le cancer du sein (5 patients) et le cancer du l'ovaire (1 patient). Les autres patients étaient traités pour un cancer bronchique non à petites cellules, un carcinome épidermoïde de la tête et du cou et un hépatocarcinome (un patient par type). Tous les patients ont été inclus alors qu'ils présentaient une tumeur réfractaire aux traitements standards validés pour leur tumeur, la majorité des patients ayant reçu au moins 5 lignes de chimiothérapie (tableau 5).

| | **N = 17** |
|---|---|
| **Nombre de lignes antérieures de chimiothérapie** | |
| Médiane [min - max] | 5 [1 - 11] |
| **Nombre de lignes antérieures de chimiothérapie (mois)** | |
| Médiane [min - max] | 1,5 [1 - 18] |

**Tableau 5 : traitements antérieurs par chimiothérapie des patients inclus dans l'étude de phase 1**

## B. Traitements administrés

Un total de 138 perfusions a été administré avec une médiane de 5 injections par patients [3-5]. Après inclusion des 15 premiers patients, le protocole a été modifié et amendé afin de supprimer les paliers de dose 6 et 7 et faciliter le recrutement des patients en leur permettant, si la tolérance était bonne et en cas de bénéfice pour le patient, de poursuivre les injections jusqu'à un nombre total de 15 comme prévu initialement aux paliers de dose supérieure.

Le nombre de patients et le nombre total de perfusions administrées pour chaque palier de dose est présenté dans le tableau 6.

| Palier | Nombre injections prévu | Dose par injection | Nombre de patients inclus | Nombre total d'injections réalisées. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 600 µg/m² | 3 | 15 |
| 2 | 10 | 600 µg/m² | 3 | 30 |
| 3 | 15 | 600 µg/m² | 3 | 36 |
| 4 | 5 | 800 µg/m² | 3 | 15 |
| 5 | 10 | 800 µg/m² | 3 | 17 |
| 6 | 15 | 800 µg/m² | 0 | 0 |
| 7 | 5 | 1000 µg/m² | 0 | 0 |
| 8 | 10 | 1000 µg/m² | 2 | 17 |
| 9 | 15 | 1000 µg/m² | 0 | 0 |

**Tableau 6 : Description du nombre de patients traités à chaque palier de dose**

La majorité des sujets (82%) a reçu l'ensemble des injections prévues au nombre et à la dose prévus. Les traitements arrêtés de façon prématurée l'ont été pour les raisons suivantes :

- au palier de dose 3 à savoir 15 injections d'OM-174 à 600 µg/m², une patiente âgée de 63 ans n'a reçu que 6 injections en raison d'une altération de son état général en rapport avec une progression rapide de sa pathologie tumorale. Cette-ci était suivie depuis 3 ans pour un adénocarcinome mammaire SBR III RH+ HER positif initialement classé T4dNxM0 très rapidement évolutif après un traitement ayant consisté en une chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une mammectomie associée à un curage (10 ganglions positifs sur 20 prélevés) puis une radiothérapie et une hormonothérapie. Cette patiente a ensuite présenté une poursuite évolutive de sa maladie non contrôlée par les 5 lignes de chimiothérapies différentes reçues, signant une maladie agressive et résistante intrinsèquement aux différents agents cytotoxiques administrés.
- au 5ème palier de dose à savoir 10 injections d'OM-174 à 800 µg/m², une 1ère patiente âgée de 46 ans porteuse d'un adénocarcinome endométrioïde d'origine ovarienne diagnostiqué 29 mois auparavant a arrêté son traitement après 4 injections en raison d'une progression tumorale rapide. A ce même palier de

dose, un patient âgé de 63 ans traité pour un hépatocarcinome a présenté au décours de la 3ème injection d'OM-174 un bronchospasme sévère rapidement et favorablement résolutif

## C. Données de tolérance

Concernant l'analyse des effets secondaires, tous les patients étaient évaluables. Aucune toxicité hématologique n'a été observée sur l'ensemble des patients. Par contre, des effets indésirables ont été observés. Ceux-ci sont résumés dans le tableau 7. L'évènement indésirable le plus fréquemment observé a été un syndrome pseudo grippal, rapporté chez 12 des 17 patients recevant l'OM-174. Ces derniers pouvaient survenir après chaque injection et ont été observés quelle que soit la dose d'OM-174 administrée. Les effets indésirables ont nécessité l'administration de paracétamol dans 68 cas sur l'ensemble des 138 injections (49%) et des anti inflammatoires non stéroïdiens dans 19 cas (14%). Des frissons sont survenus chez 12 patients associés à de la fièvre chez 7 patients. Des nausées, des vomissements et une asthénie sont apparus isolément chez 4 patients. Une diarrhée est survenue chez 3 patients et 3 autres ont présenté des céphalées.

Tous les autres événements indésirables, à savoir une hypertension ne nécessitant pas de traitement, des vertiges, une somnolence, une dysphagie, ont été observés chez 1 patient. Toutes ces toxicités cliniques étaient au maximum de grade 2. Sur le plan biologique, 1 patient avec une maladie progressive a présenté une cholestase de grade 1 et une cytolyse hépatique de même grade, probablement non liées à l'administration de l'OM-174.

Aucun décès toxique lié au médicament n'a été observé au cours de l'étude.

| Evènements indésirables | Tout grade N (%) | Grade 3 N (%) | Grade 4 N (%) |
|---|---|---|---|
| Syndrome pseudo-grippal | 12 (70) | - | - |
| Frissons | 12 (70) | - | - |
| Fièvre | 7 (41) | - | - |
| Nausées | 4 (23) | - | - |
| Vomissements | 4 (23) | - | - |
| Fatigue | 4 (23) | - | - |
| Céphalées | 3 (17) | - | - |
| Diarrhées | 3 (17) | - | - |
| Hypertension | 3 (17) | - | - |
| Vertiges | 1 (7) | - | - |
| Somnolence | 1 (7) | - | - |
| Dysphagie | 1 (7) | - | - |
| Cholestase | 1 (7) | - | - |
| Cytolyse hépatique | 1 (7) | - | - |
| Bronchospasme | 1 (7) | - | - |

**Tableau 7 : Evènements indésirables survenus au décours du traitement par OM-174**

## D. Détermination de la Dose Maximale Tolérée

L'ensemble des 17 patients inclus était évaluable pour la détermination de la Dose Maximale Tolérée. Des toxicités maximales de grade 2 étant survenues, aucune toxicité dose-limitante n'a été observée par conséquent il n'a pas été possible de déterminer de Dose Maximale Tolérée. Le patient traité au palier 5 (10 perfusions de 800 µg/m² d'OM-174) pour un hépatocarcinome a présenté au décours de la 3ème injection d'OM-174 un bronchospasme sévère avec désaturation. L'évolution de cet épisode a été rapidement favorable après l'administration IV de corticostéroïdes. Cet épisode n'a en fait pas été considéré comme une DLT car probablement d'origine immunologique et non lié à la dose. Cette hypothèse a été confortée par le fait qu'aucun épisode identique n'est survenu chez les 5 patients suivants recevant la même

dose d'OM-174 (800 µg/m²) pour un minimum de 5 injections et chez l'ensemble des patients traités à la posologie de 1000 µg/m².

## E. Pharmacocinétique

Les paramètres pharmacocinétiques ont pu être déterminés chez l'ensemble des 17 patients traités. Après la première perfusion IV à la dose unique de 600 µg/m², le profil pharmacocinétique de l'OM-174 a montré un $T_{max}$ plus long que la fin de la perfusion, un $C_{max}$ atteignant 394 ng/ml et une élimination en 2 étapes : une phase initiale de seulement quelques minutes et une seconde phase qui dure environ 22 h. La clairance et le volume de distribution étaient faibles, respectivement de 0,11 L / h (66 mL/hr/m²) et 4,6 L (2643 mL/m²). Aucune accumulation n'a été observée lors des injections répétées à la dose de 600 µg/m², tandis qu'une légère accumulation a pu être déterminée pour les doses plus élevées de 800 et 1000 µg/m².

## F. Evolution de la concentration plasmatique des cytokines

Tous les patients étaient évaluables pour la mesure de la concentration plasmatique de cytokines après injection d'OM-174. Les valeurs d'IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et de TNF-α au moment du pic de concentration, 1 ou 2 h après la première injection d'OM-174, sont présentées dans le tableau 8.

Les cinétiques des concentrations plasmatiques permettent de dégager plusieurs profils. Tout d'abord, les injections successives de l'OM-174 n'induisent pas d'augmentation de la concentration plasmatique d'IL-1β et d'IL-12 (résultats non montrés). Par contre, il est observé pour l'IL-8 (Figure 8) et dans une moindre mesure pour l'IL-10 (résultats non montrés) une augmentation constante de leur concentration après chaque injection d'OM-174 (temps 1 heure), alors que pour l'IL-6 (Figure 9) et pour le TNF-α (Figure 10) il est observé un pic de concentration qui diminue après chaque injection d'OM-174, suggérant un phénomène de tolérance (diminution de la production par les macrophages). Concernant l'IL-8, le pic de concentration survient 2 heures après l'injection d'OM-174, ceci indépendamment de la dose administrée et du nombre d'injections. Pour l'IL-6 et le TNF-α, le pic de concentration se situe respectivement 1 heure et 2 heures après la première injection d'OM-174 puis celui-ci diminue au fur et à mesure que les injections sont répétées.

| | | Dose administrée µg/m$^2$ | Mediane pg/ml | Minimum pg/ml | Maximum pg/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| **IL-8** | **2h** | 600 | 2417 | 54 | 5000 |
| | | 800 | 3053 | 443 | 5000 |
| | | 1000 | 1469 | 1169 | 1768 |
| **IL-6** | **2h** | 600 | 461 | 3 | 1521 |
| | | 800 | 1403 | 150 | 5000 |
| | | 1000 | 676 | 296 | 1058 |
| **IL-10** | **2h** | 600 | 42 | 4 | 138 |
| | | 800 | 90 | 4 | 326 |
| | | 1000 | 48 | 43 | 52 |
| **TNF-α** | **1h** | 600 | 907 | 4 | 1446 |
| | | 800 | 684 | 4 | 1970 |
| | | 1000 | 754 | 485 | 1024 |
| **IL-12** | **2h** | 600 | 12 | 0 | 35 |
| | | 800 | 0 | 0 | 11 |
| | | 1000 | 8 | 8 | 9 |
| **IL-1β** | **1h** | 600 | 34 | 0 | 115 |
| | | 800 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1000 | 13 | 12 | 14 |

**Tableau 8 : Pic de la concentration plasmatique de cytokines après la première injection d'OM-174.** Après la première injection d'OM-174, il est observé pour un pic de sécrétion d'IL-8, IL-6, IL-10 et de TNF-α contrairement à l'IL-12 et l'IL-1β pour lesquelles l'absence de pic est constaté. Ce pic ne semble pas proportionnel à la dose d'OM-174 administrée.

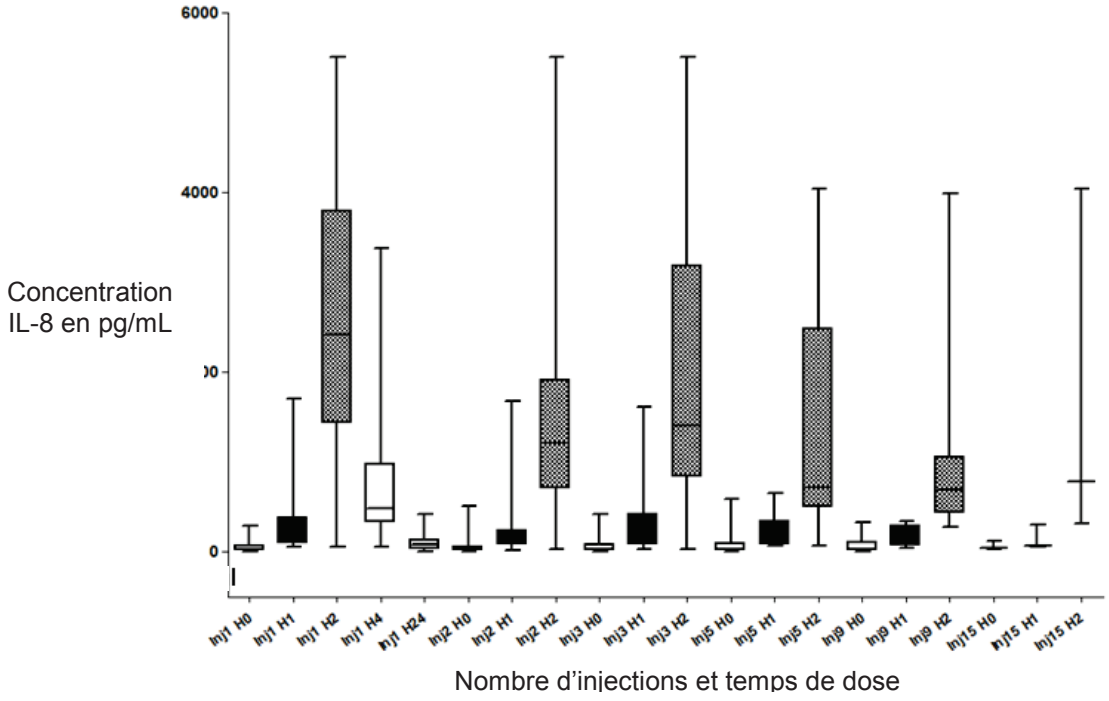



**Figure 8: Variation de la concentration plasmatique d'IL-8 après chaque injection d'OM-174.** Après chaque injection d'OM-174, il est observé une augmentation de la concentration de l'IL-8, avec un pic à la deuxième heure, indépendamment de la dose d'OM-174 et du nombre d'injections. Les boîtes noires, pointillées et blanches représentent la valeur de la cytokine d'intérêt respectivement 1, 2 et 4 heures après l'injection.

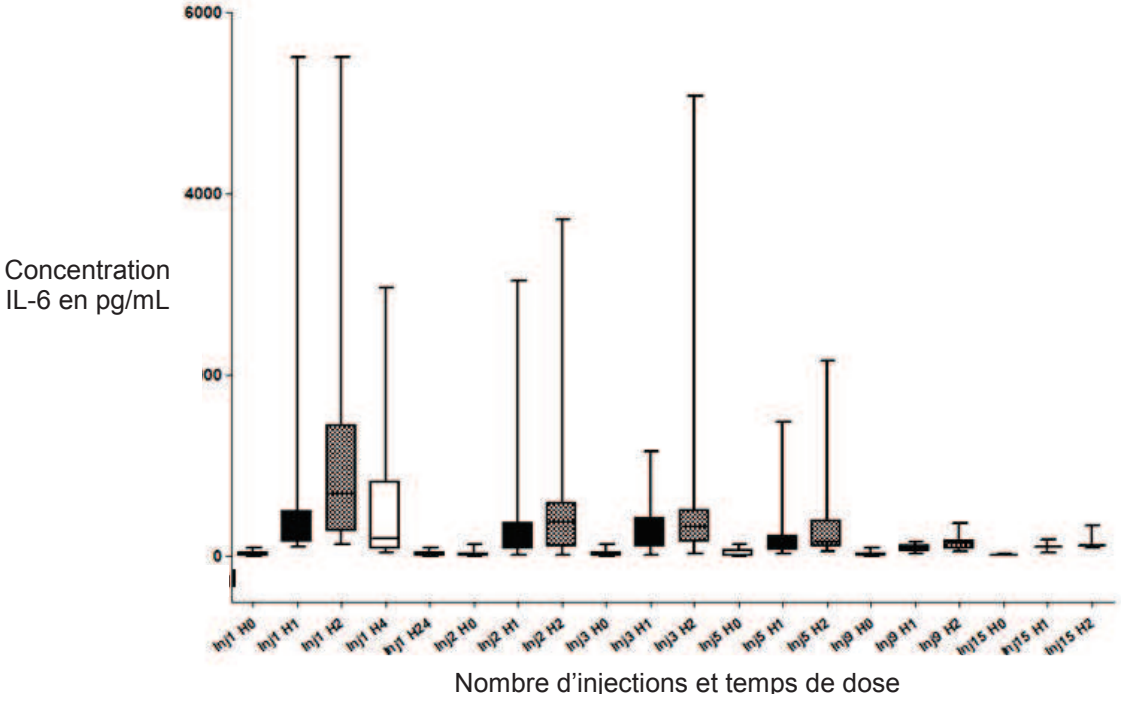



**Figure 9: Variation de la concentration plasmatique d'IL-6 après chaque injection d'OM-174.** Après chaque injection d'OM-174, il est observé une diminution du pic de sécrétion suggérant un phénomène de tolérance.

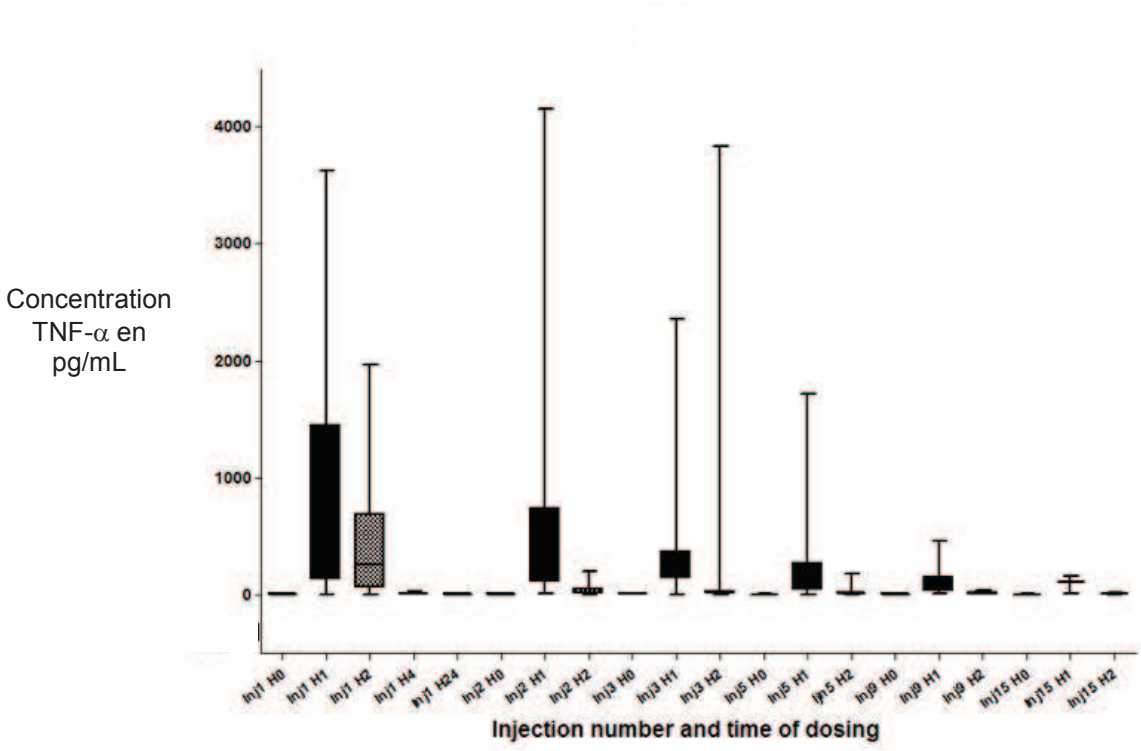



**Figure 10: Variation de la concentration plasmatique de TNF-α après chaque injection d'OM-174.** Après chaque injection d'OM-174, il est observé une diminution du pic de sécrétion suggérant un phénomène de tolérance.

## G. Activité cytotoxique des cellules Natural Killer

Cette analyse a porté sur l'ensemble des patients inclus dans l'étude. Il en ressort que l'activité cytotoxique des cellules NK n'était pas augmentée lors du traitement par OM-174, ceci quel que soit le nombre d'injections réalisées et la dose administrée sauf chez le dernier patient traité à la plus forte dose d'OM-174 (1000 $\mu g/m^2$) et avec le plus grand nombre d'injections (15). Il a en effet été observé chez celui-ci une augmentation progressive de l'activité des cellules NK lors des injections répétées d'OM-174 (Figure 11), que ce soit en absence ou en présence d'IL-2.

Par contre, pour les patients recevant l'OM-174, le nombre de cellules NK augmentait de façon significative avec le nombre des injections, passant de $0,67 \pm 0,25 \times 10^6$ à $2,21 \pm 0,17 \times 10^6$ cellules NK par ml ($p < 0,005$).

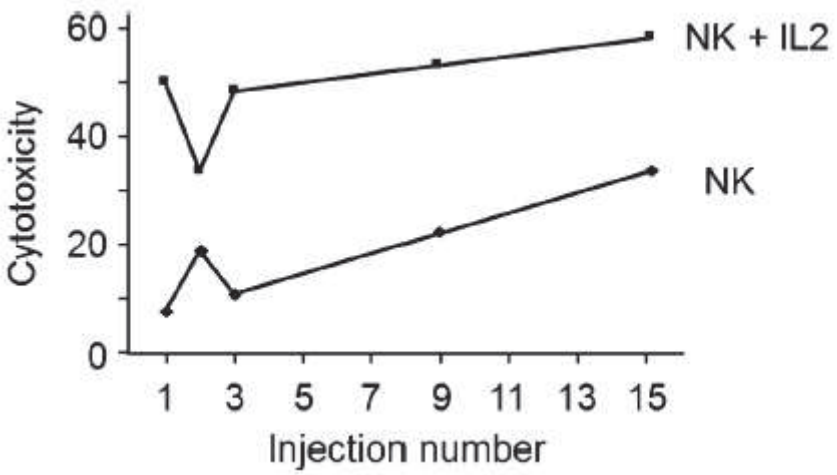



**Figure 11: Activité cytotoxique des cellules NK après chaque injection de 1000 µg/m² d'OM-174 en présence ou non d'IL-2.**

## H. Résultats de l'analyse du polymorphisme de TLR4

L'analyse du polymorphisme de TLR4 a mis en évidence que tous les patients sauf un étaient porteurs des allèles de type sauvage pour $TLR4_{D299G}$ et présentaient un polymorphisme pour $TLR4_{T399I}$. Il n'a donc pas été possible d'étudier et d'évaluer une relation éventuelle entre les polymorphismes TLR4 et une éventuelle réponse clinique et/ou biologique à l'OM-174.

## I. Activité antitumorale

Concernant l'évaluation de l'efficacité du traitement, celle-ci a été faite par le clinicien en utilisant les critères RECIST. Le patient ayant arrêté son traitement après la survenue d'un bronchospasme après la 3$^{ème}$ injection a été considéré comme non évaluable pour ce critère. La majorité des patients (13/16) ont été considérés comme ayant une maladie progressive à l'issue de la séquence thérapeutique. Trois stabilisations de la maladie ont été observées à la fin du

traitement chez des patients présentant une maladie rapidement progressive lors de leur inclusion:

- la première chez un patient âgé de 60 ans porteur d'une tumeur du rectum traité au palier de dose 3, avec une stabilisation pendant 1 mois après l'arrêt du traitement
- la seconde chez un patient âgé de 62 ans traité au palier 4 pour une tumeur colique, avec une stabilisation prolongée pendant 9 mois
- la troisième chez un patient âgé de 57 ans traité au palier 8 pour un cancer bronchique non à petites cellules, avec un contrôle de sa maladie pendant 2 mois après l'arrêt du traitement

## II. Les conditions d'une cytotoxicité des polynculéaires neutrophiles intratumoraux par l'intermédiaire du granzyme B sont-elles réunies ?

Dans un travail précédent conduit dans le laboratoire sur un modèle de cancer colique (DHD/K12-PROb), il a été démontré qu'un traitement par l'OM-174 provoquait une augmentation de la sécrétion des chimiokines CXCL1 et CXCL2, augmentait l'infiltration des neutrophiles et leur répartition dans la tumeur, modifiait le phénotype des neutrophiles qui devenaient capables de détruire les cellules tumorales via le granzyme B dont l'expression était induit par le microenvironnement tumoral [116]. Ces données ayant été obtenues à la fin de l'étude de phase 1, il n'a pas été possible d'étudier directement l'effet de l'OM-174 sur les neutrophiles intra tumoraux des patients traités. Nous avons donc cherché si, chez des patients porteurs de tumeurs, les conditions d'une cytotoxicité par l'intermédiaire du granzyme B des neutrophiles intratumoraux étaient réunies. Comme cela a déjà été rapporté dans la première partie de ce travail, 2 des 3 patients chez qui la maladie a été contrôlée par le traitement par l'OM-174 étaient porteur d'une tumeur colo-rectale. Suite à cette constatation, et au travail préclinique réalisé dans des modèles de cancer colique, nous avons décidé d'étudier des tumeurs coliques humaines.

Nous avons donc identifié 35 patients porteurs de tumeurs coliques traités au Centre Georges-François Leclerc pour lesquels nous disposions de blocs tumoraux à partir desquels

nous pouvions faire des colorations immunohistochimiques de lames et des extractions d'ARN. Ces tumeurs ont servi aux analyses dont les résultats sont maintenant rapportés.

## A. Retrouve-t-on des polynucléaires neutrophiles dans les tumeurs coliques humaines ?

Nous avons dans un premier temps recherché la présence de neutrophiles dans les tumeurs de 35 patients identifiés, traités pour un cancer du côlon. L'analyse a été effectuée dans un premier temps sur des lames colorées à l'HES (Figure 11) puis confirmée sur des lames colorées au MGG (Figure 12). Sur l'ensemble des lames, à la fois en coloration HES et en coloration MGG, il a été observé des neutrophiles infiltrant la tumeur, facilement reconnaissables par l'aspect polylobé de leur noyau. Ces neutrophiles étaient répartis dans l'ensemble de la tumeur avec une infiltration apparaissant hétérogène en fonction des lames étudiées. Cette hétérogénéité concernait le nombre de neutrophiles infiltrant la tumeur, certaines présentant un nombre important de neutrophiles intra tumoraux (Figure 12B,C,D ; Figure 13), d'autres semblant n'en présenter que de faibles quantités (Figure 12A). Au sein d'une même tumeur, il pouvait être observé des zones riches et d'autres avec peu ou pas de neutrophiles (Figure 14).

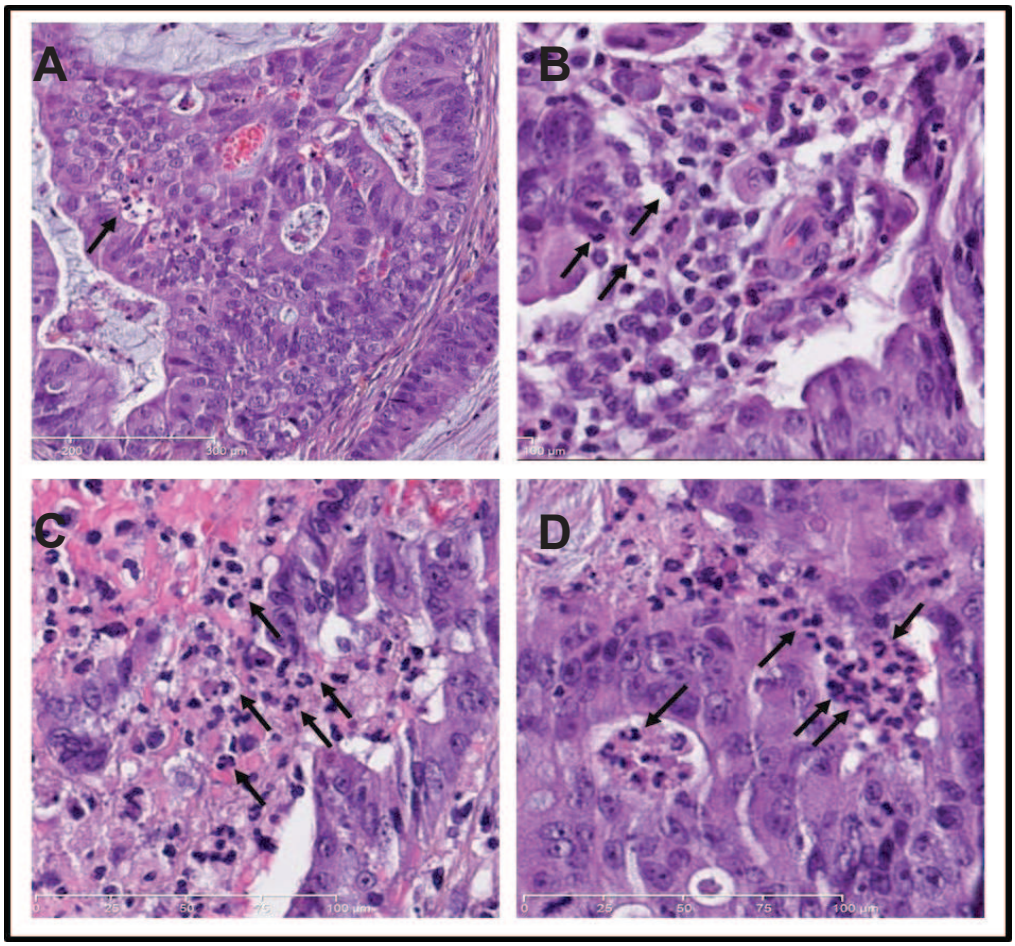



**Figure 12: Coupes histologiques de tumeur du colon en coloration HES. S**ur l'ensemble des différentes coupes analysées, il est observé des PNN (flèches noires) au sein du tissu tumoral. Les PNN apparaissent avec un noyau polylobé spécifique. Ces PNN peuvent être en petit nombre (Figure 11A, x20) ou en quantité beaucoup plus importante (Figure 11B, C, D, x40).

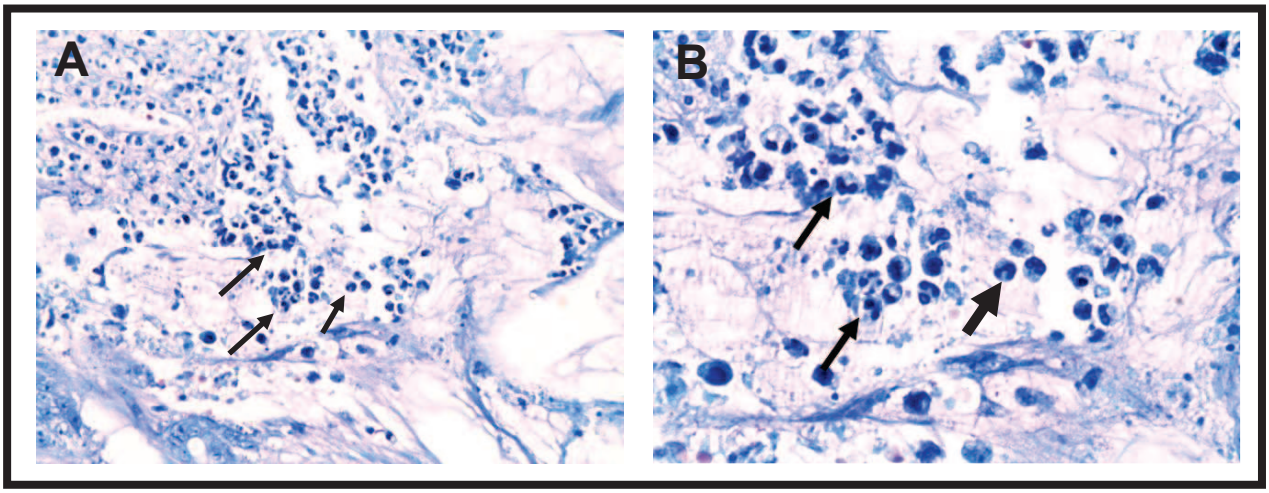



**Figure 13: Coupes histologiques de tumeur du colon en coloration MGG**. Sur la totalité des coupes analysées, il est retrouvé des PNN (flèches noires) au sein du tissu tumoral, PNN qui se caractérisent par un noyau polylobé d'aspect sombre et un cytoplasme plutôt de coloration beige (Figure 12A x20, 12B x40). Comme pour la coloration en HES, ces PNN peuvent être en petit nombre ou en quantité beaucoup plus importante

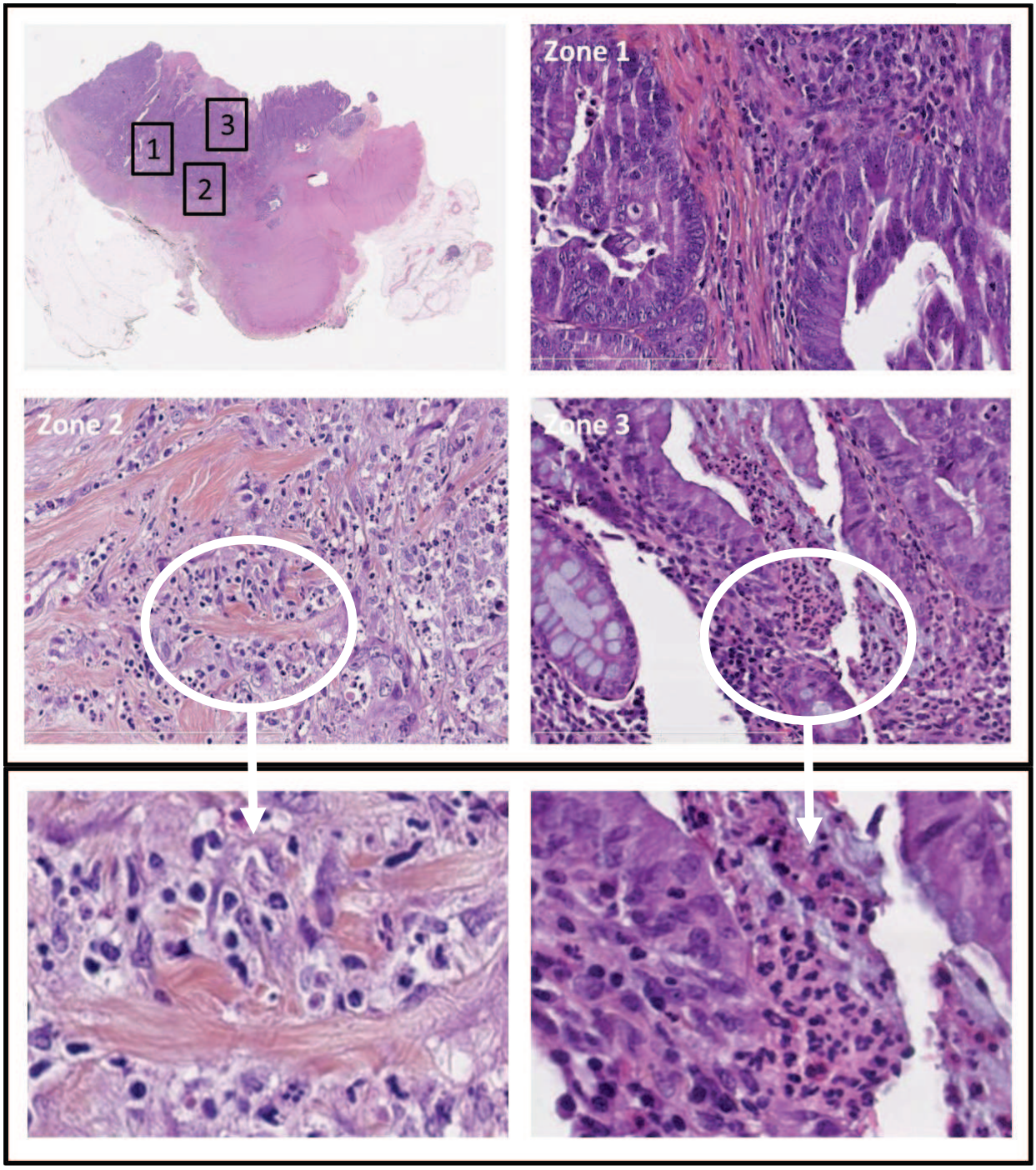



**Figure 14: Répartition des polynucléaires neutrophiles au sein de tumeur du colon.** Sur les coupes en coloration HES, il est observé une infiltration hétérogène des PNN avec des zones sans PNN ou quelques PNN isolés (zone 1), des zones avec un infiltrat un peu plus abondant (zone 2) et des zones avec un infiltrat riche, les PNN formant des foyers denses au sein des cellules tumorales (zone 3).

## B. Quantification de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles au sein des tumeurs

Comme dans le travail préliminaire mené chez l'animal il a été démontré que l'effet antitumoral de l'OM-174 était corrélé au degré d'infiltration de la tumeur par les neutrophiles, nous avons cherché à quantifier cette infiltration au sein des tumeurs des patients. La quantification de l'infiltrat a été faite avec l'aide d'un pathologiste (comme décrit dans le tableau 2) en plusieurs étapes (pour chaque patient, l'analyse a été faite sur 3 lames différentes) :

- tout d'abord une première analyse a été réalisée à partir des lames colorées en HES issus des 35 patients porteurs de tumeur du colon
- une 2ème analyse a ensuite été réalisée à partir de lames issues des mêmes tumeurs mais cette fois ci colorées en MGG
- enfin, en comparant les résultats de ces 2 analyses, il a été recherché quel était le niveau de concordance

Ce dernier point a été satisfaisant car aucune différence dans le score de l'infiltration en neutrophiles au sein de la tumeur n'a été observée entre les deux analyses. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 9.

| Score | Nombre de lames N (%) |
|---|---|
| 0 | 0 (0) |
| 1+ | 14 (40%) |
| 2+ | 10 (29%) |
| 3+ | 11 (31%) |

**Tableau 9** : **Quantification de l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles au sein de la tumeur**

Dans toutes les tumeurs, il a été retrouvé la présence de neutrophiles avec une répartition assez homogène entre tous les groupes. Dans aucun cas, les neutrophiles ont été absents de la tumeur.

## C. Retrouve-t-on des cellules exprimant le granzyme B au sein de la tumeur ?

Afin de déterminer si des cellules localisées au sein de la tumeur avaient la capacité de lyser les cellules tumorales du fait de l'expression de certaines protéases, nous avons recherché si l'on retrouvait en immunohistochimie des cellules exprimant le granzyme B au sein de la tumeur. Cette analyse a été effectuée sur 20 des 35 patients.

Nous avons ainsi pu observer que l'on retrouvait dans toutes les tumeurs étudiées un immunomarquage positif (Figure 15).

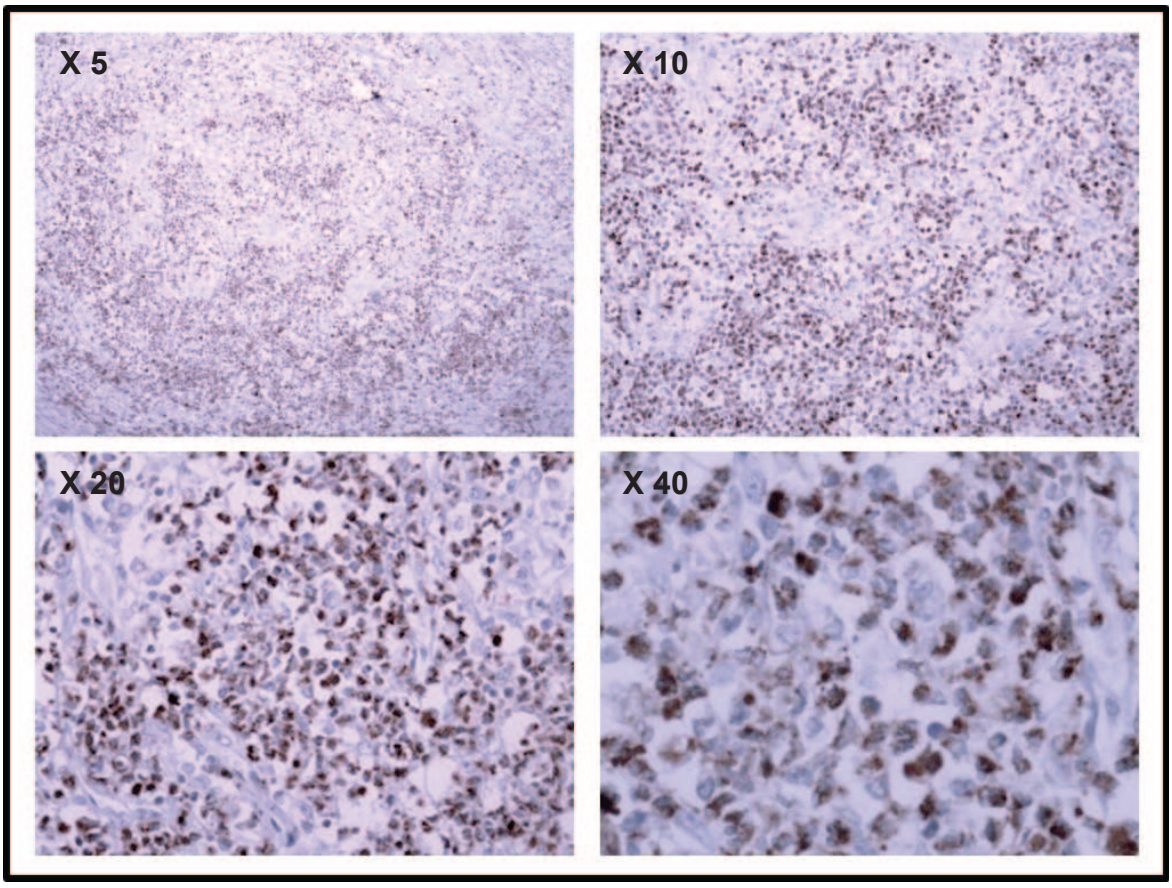



**Figure 15 : Marquage immunohistochimique par le granzyme B au sein d'une tumeur du colon (score 3+).** Dans chaque tumeur analysée, il est retrouvé un marquage positif (coloration brunâtre intracytoplasmique).

Cet immunomarquage a semblé aussi d'intensité variable selon les tumeurs analysées. Nous avons essayé de quantifier celui-ci en regroupant les tumeurs en 4 catégories :

- absence de marquage
- immunomarquage positif mais faible
- immunomarquage positif d'intensité moyenne
- immunomarquage positif et diffus

Sur l'ensemble des 20 lames étudiées, la répartition de l'immunomarquage était assez homogène dans les différents groupes comme cela est rapporté dans le tableau 10.

| Intensité immunomarquage granzyme B | Nombre de lames N (%) |
|---|---|
| Absence marquage | 0 (0) |
| Marquage faible | 6 (30%) |
| Marquage moyen | 6 (30%) |
| Marquage intense | 8 (40%) |

**Tableau 10: Quantification du marquage au Granzyme B au sein de la tumeur**

Nous avons aussi observé que l'expression était hétérogène au sein de la tumeur puisque le granzyme B a été retrouvé parfois en périphérie, parfois dans le centre ou dans l'ensemble de la la tumeur.

## D. Les polynucléaires neutrophiles expriment-ils le granzyme B au sein de la tumeur ?

Du fait que la toxicité des neutrophiles vis-à-vis des cellules tumorales ait été rattachée à l'expression du granzyme B et qu'il existait dans notre échantillon de tumeurs, une corrélation de 100% entre l'importance de l'expression de granzyme B et la quantité de neutrophiles se

trouvant dans la tumeur [116], nous avons cherché si le granzyme B retrouvé dans la tumeur était exprimé par les neutrophiles. Pour cela, nous avons réalisé un double marquage en immunofluorescence en utilisant un Ac anti granzyme B et un Ac anti CD66b, un membre de la famille de l'Ag carcino-embryonnaire spécifiquement exprimé par les neutrophiles, ceci après avoir préalablement vérifié la possibilité de marquer les neutrophiles par le CD66b et le granzyme B par un simple immunomarquage.

### a. Retrouve –t-on des polynucléaires neutrophiles en immunofluorescence dans les tumeurs du colon d'origine humaine ?

Afin de détecter la présence de neutrophiles dans les tumeurs par marquage immunohistofluroresent, nous avons testé l'utilisation d'un Ac dirigé contre le CD66b, spécifique des neutrophiles [117,118,119,120].

Nous avons ainsi pu observer dans l'ensemble des 35 tumeurs analysées la présence de neutrophiles exprimant CD66b. Ces neutrophiles, présents en quantité variables, sont retrouvés répartis de façon homogène dans la tumeur, pouvant être présents aussi bien en périphérie qu'au centre de la tumeur (Figure 16).

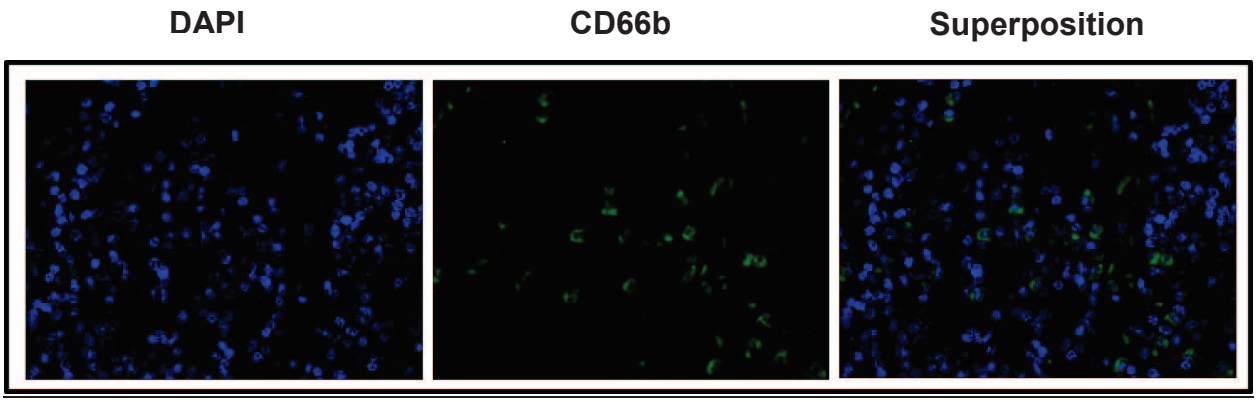



**Figure 16: Marquage immunofluorescent des polynucléaires neutrophiles par le CD66b au sein des tumeurs du colon.** La recherche de PNN dans la tumeur a été réalisée en utilisant un Ac anti CD66b (marquage vert). Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu).

### b. Existe-t-il des cellules exprimant le granzyme B dans les tumeurs du colon d'origine humaine ?

Après avoir montré préalablement en immunohistochimie que des cellules présentes dans les tumeurs coliques exprimaient le granzyme B, nous avons voulu vérifié s'il était possible d'identifier en immunofluorescence des cellules exprimant le granzyme B, ceci afin de réaliser dans un second temps un double marquage.

Nous avons ainsi observé dans l'ensemble des 35 tumeurs analysées la présence de cellules exprimant aussi le granzyme B (Figure 17).

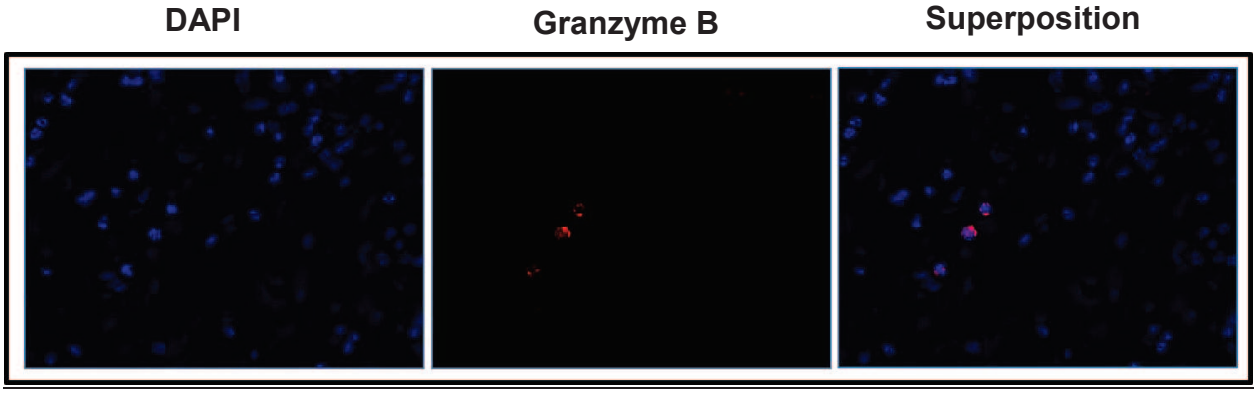



**Figure 17: Marquage immunofluorescent de cellules exprimant le granzyme B au sein d'une tumeur du colon.** Marquage du granzyme B par un Ac anti granzyme B fluorescent en rouge (x40). Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu).

### c. Les polynucléaires neutrophiles présents au sein des tumeurs expriment-ils le granzyme B ?

Après avoir montré préalablement en immunohistochimie que des cellules présentes dans les tumeurs coliques exprimaient le granzyme B, et en immunofluorescence que des neutrophiles infiltraient les mêmes tumeurs, nous avons cherché si ces neutrophiles exprimaient le granzyme B.

Nous avons ainsi observé dans l'ensemble des 35 tumeurs analysées la présence de neutrophiles exprimant aussi le granzyme B, capables ainsi d'avoir une activité cytotoxique. Cette caractéristique était observée dans toutes les tumeurs, quel que soit le degré d'infiltration par les neutrophiles (Figure 18 A, B).

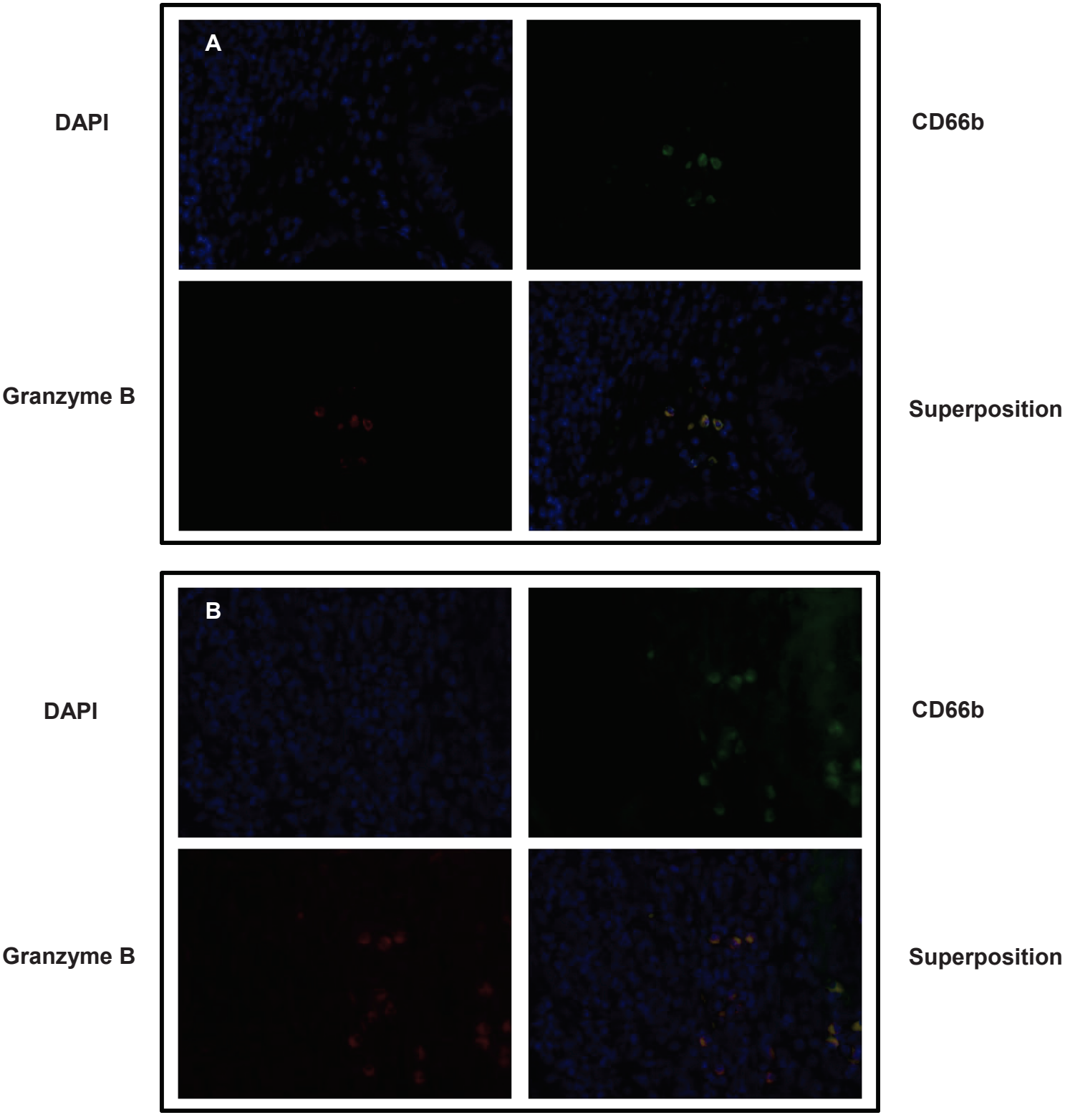
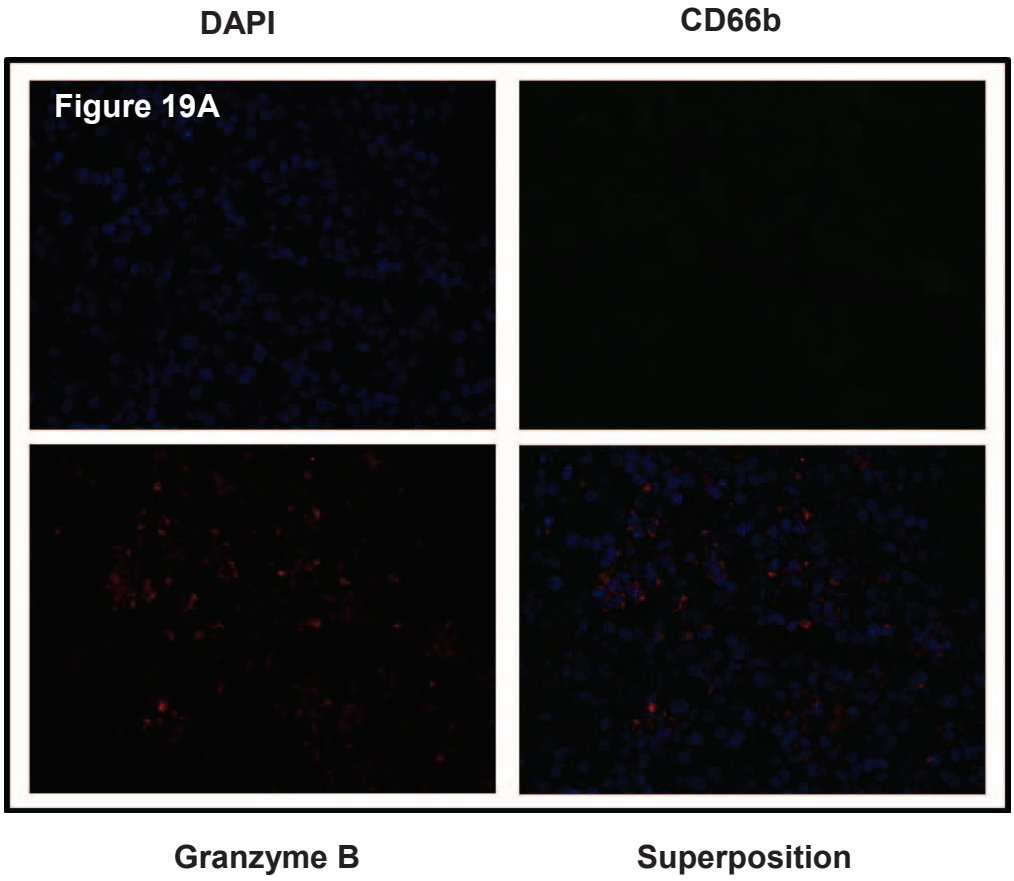
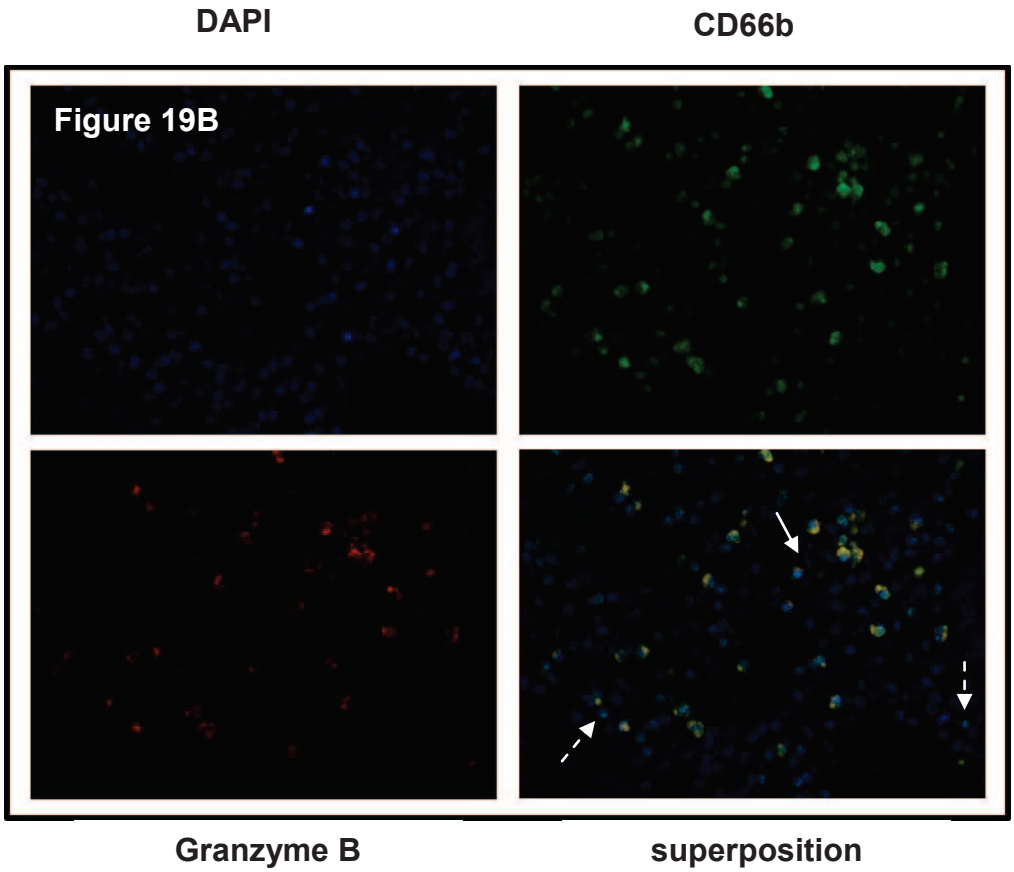



**Figure 18: Double marquage immunofluorescent par le CD66b et le granzyme B au sein d'une tumeur colique humaine (x40).** Figure 18A : tumeur avec une infiltration en neutrophiles de score 1+, Figure 18B : tumeur avec une infiltration en neutrophiles de score 3+. Au niveau de chaque tumeur, certaines zones présentent des neutrophiles (marquage vert) exprimant le granzyme B (marquage rouge), sans que d'autres cellules expriment le granzyme B. Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu).

### d. Les polynucléaires neutrophiles sont-elles les seules cellules de la tumeur qui expriment du granzyme B ?

Nous avons donc essayé d'identifier au sein des tumeurs d'autres cellules exprimant le granzyme B. Toujours en réalisant un double marquage CD66b et granzyme B, nous avons pu observer que certaines zones tumorales dépourvues de neutrophiles présentaient des cellules exprimant le granzyme B (Figure 19A). Ces dernières pouvaient être présentes en quantité importante dans certaines zones de la tumeur. Dans d'autres régions tumorales, coexistaient des neutrophiles exprimant le granzyme B avec des neutrophiles ne l'exprimant pas (Figure 19B,C).





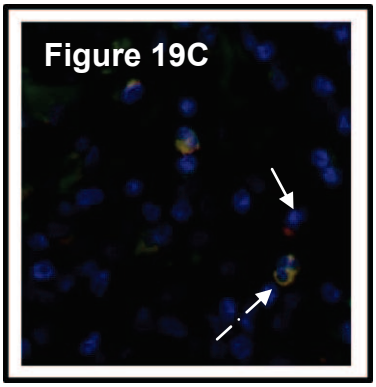




**Figure 19: Hétérogénéité de l'infiltrat cellulaire des tumeurs du colon.** Dans certaine tumeur (figure 19A), il est observé des zones dans lesquelles d'autres cellules que les PNN expriment le granzyme B. Dans une autre tumeur (Figure 19B), il est retrouvé dans la même zone des PNN exprimant le granzyme B avec des PNN n'exprimant pas le granzyme B (flèche blanche pointillée) et des cellules autres que les PNN exprimant le granzyme B (flèche blanche). La figure 19C est un agrandissement d'une autre zone de la tumeur de la figure 19B ou il est observé un neutrophile ayant un comarquage à côté d'une autre cellule exprimant le granzyme B.

## E. Existe-t-il une corrélation entre l'expression du granzyme B et l'infiltration des tumeurs par les polynucléaires neutrophiles?

Après avoir démontré qu'il existait dans les tumeurs coliques des neutrophiles en quantité variable ainsi que des cellules exprimant le granzyme B, nous nous sommes posés la question d'une éventuelle corrélation entre l'intensité de l'immunomarquage du granzyme B et l'importance de l'infiltration tumorale en neutrophiles.

C'est ainsi que l'on a pu observer que l'ensemble des 8 tumeurs présentant un marquage faible pour le granzyme B présentaient une infiltration en neutrophiles de score 1+. De même, les 6 tumeurs avec un marquage granzyme B moyen et les 6 tumeurs avec un marquage granzyme B intense étaient respectivement toutes de score 2+ et de score 3+ pour les neutrophiles. Ces observations ont permis d'affirmer l'existence d'une corrélation entre l'importance de l'infiltration tumorale en neutrophiles et la quantité de cellules exprimant le granzyme B dans la tumeur.

## F. Etude de contenu en cytokines du microenvironnement tumoral

Le recrutement des neutrophiles se faisant par l'intermédiaire d'un gradient de concentration de cytokines ou de chimiokines, nous avons étudié leur expression par q-PCR en comparant tissu sain et tissu tumoral. Cette analyse a donc concerné des chimioattractants des neutrophiles comme l'IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL5 mais aussi d'autres cytokines produites par les neutrophiles comme IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 ou des constituants des neutrophiles comme NCF1, NCF2, azurocidine ou le granzyme B. Cette analyse a porté sur un total de 25 tumeurs parmi les 35 pour lesquelles des blocs tumoraux étaient disponibles.

Cette analyse a dans un premier temps été faite de manière globale en comparant l'expression des différents gènes d'intérêt entre le tissu tumoral et le tissu sain avoisinant (Figure 20).

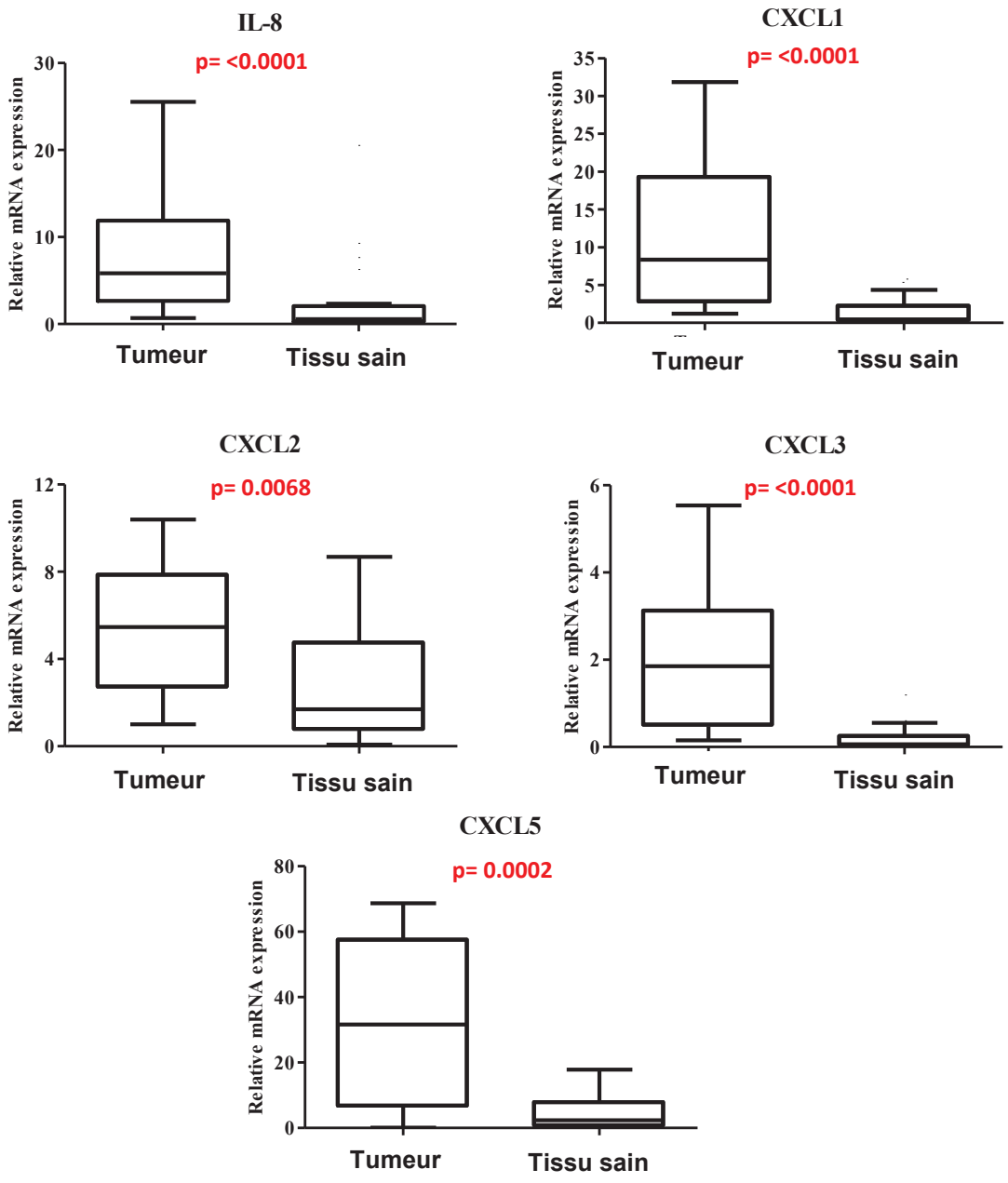



**Figure 20: Analyse comparative de l'expression de gènes de chimioattractants des neutrophiles entre tissu colorectal tumoral et tissu colorectal sain avoisinant.** Sont représentés sous forme de Box plots l'expression relative des gènes de l'IL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL5, gènes pour lesquels il existe une différence d'expression significative selon le test de Mann Whitney.

Il a été observé qu'il existait une surexpression statistiquement significative dans la tumeur comparativement au tissu sain des gènes codant pour des chimioattractants des neutrophiles, à savoir pour l'IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CXCL5.

Une analyse a ensuite été effectuée par sous-groupes selon le score d'infiltration en neutrophiles en utilisant le test de Wilcoxon du fait des effectifs de faibles tailles (score 1 N=8 ; score 2+ N=8 ; score 3+ N=9). Les résultats sont résumés dans le tableau 11.

| **Gène d'intérêt** | **Tissu colorectal tumoral vs tissu sain colorectal Score 1+ N=8** | **Tissu colorectal tumoral vs tissu sain colorectal Score 2+ N=8** | **Tissu colorectal tumoral vs tissu sain colorectal Score 3+ N=9** | **Tissu colorectal tumoral Score 1+ vs score 2+ vs Score 3+** |
|---|---|---|---|---|
| **IL-1β** | NS | NS | NS | NS |
| **IL-2** | NS | NS | NS | NS |
| **IL-6** | NS | NS | NS | NS |
| **IL-8** | NS | NS | p=0,0077 | NS |
| **IL-10** | p=0,0357 | NS | NS | NS |
| **IL-12β** | p=0,0499 | NS | NS | NS |
| **CXCL1** | p=0,0499 | p=0,0173 | p=0,0077 | NS |
| **CXCL2** | NS | NS | p=0,0284 | NS |
| **CXCL3** | p=0,0357 | p=0,0173 | p=0,0077 | NS |
| **CXCL5** | NS | p=0,0251 | p=0,0209 | NS |
| **NCF1** | p=0,0173 | p=0,0425 | NS | NS |
| **NCF2** | NS | NS | NS | NS |
| **Granzyme B** | NS | p=0,0117 | NS | NS |
| **IFN -γ** | NS | NS | NS | NS |
| **IFN-α1** | NS | NS | NS | NS |
| **azurocidine** | NS | NS | NS | NS |

**Tableau 11: Analyse par sous-groupes selon le score d'infiltration en neutrophiles.** Une surexpression a été retrouvée pour les gènes CXCL1 et CXCL3 dans les tumeurs comparativement au tissu sain avoisinant quel que soit le degré d'infiltration en neutrophiles au sein de la tumeur.

A l'issue de cette analyses par sous-groupes, les gènes codant pour CXCL1 et CXCL3 ont été retrouvés toujours surexprimés de façon significative dans chacun des 3 sous-groupes. Les autres gènes surexprimés dans la tumeur étaient pour le groupe avec un score 1+ (N=8) le gène de l'IL-10, de l'IL-12β et du NCF1, pour le groupe avec un score 2+, le gène de l'IL-8, de CXCL5 et du NCF1 alors que dans le groupe de score 3+, la différence concernait les gènes codant pour l'IL-8, CXCL2 et CXCL5.

Enfin, lorsque cette analyse a été faite en comparant les 3 sous-groupes tumoraux entre eux (score 1+ versus score 2+ versus score 3+) par le test de Kruskal Wallis, aucune différence significative n'a été mise en évidence, alors que lorsque la même analyse est effectuée en comparant 2 sous-groupes : score 1+ versus score 2+ et 3+, une expression significativement augmentée du gène codant pour le granzyme B est observée dans le sous-groupe score 2+ et score 3+.

## G. Impact fonctionnel de l'infiltration des neutrophiles sur la tumeur ?

Les données de la littérature sur le rôle de l'infiltration des tumeurs par les cellules immunitaires ne sont pas cohérentes.

Nous avons donc voulu savoir dans notre échantillon de 35 tumeurs colorectales, si l'infiltration en neutrophiles au sein de la tumeur pouvait avoir un impact sur les caractéristiques de la tumeur et son évolution.

Les caractéristiques des 35 patients sont présentées dans le tableau 12. 19 hommes (54%) et 16 femmes (46%) ont été inclus dans cette analyse avec un âge moyen de 70,4 ans et une médiane de 73 ans [41 – 95]. Tous les patients étaient porteurs d'adénocarcinomes colorectaux dont 15 bien différenciés (43%), 18 moyennement différenciés (51%) et 2 peu différenciés (6%). Six patients (22%) avaient au diagnostic une maladie métastatique au niveau hépatique (N=3), péritonéale (N=3), pulmonaire (n=3). Tous les patients ont été traités par une chirurgie d'exérèse même au stade métastatique et 15 (43%) ont bénéficié d'une chimiothérapie à base de 5-Fluoro uracile et d'oxaliplatine.

| | N = 35 | % |
|---|---|---|
| **Age (années)** | | |
| Moyenne | 70,4 | |
| Médiane [min - max] | 73 [41-95] | |
| **Sexe** | | |
| Femmes | 16 | 46 |
| Hommes | 19 | 54 |
| **Degré différenciation tumeur** | | |
| Bien différencié | 15 | 43 |
| Moyennement différencié | 18 | 51 |
| Peu différencié | 2 | 6 |
| **Taille de la maladie** | | |
| T1 | 0 | 0 |
| T2 | 8 | 23 |
| T3 | 19 | 54 |
| T4 | 6 | 17 |
| Tx | 2 | 6 |
| **Atteinte ganglionnaire** | | |
| N0 | 17 | 49 |
| N1 | 9 | 25 |
| N2 | 7 | 20 |
| Nx | 2 | 6 |
| **Stade métastatique** | | |
| M0 | 29 | 83 |
| M1 | 6 | 17 |
| **Siège de la tumeur** | | |
| Colon droit | 15 | 43 |
| Colon transverse | 4 | 11 |
| Colon gauche | 11 | 31 |
| Charnière recto sigmoïdienne | 4 | 11 |
| Rectum | 1 | 4 |

**Tableau 12: Caractéristiques des patients porteurs de tumeurs colorectales de l'étude**

### a. L'infiltration tumorale en neutrophiles influence-t-elle les caractéristiques tumorales?

Afin de déterminer un éventuel rôle des neutrophiles infiltrant la tumeur sur son développement, nous avons regardé si les caractéristiques de la tumeur étaient différentes selon l'importance de son infiltration en neutrophiles, notamment en ce qui concerne l'âge de survenue, le sexe, le stade de la maladie et le degré de différenciation de la tumeur au diagnostic. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau 13.

| | **Degré d'infiltration** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **+** | **++** | **+++** | **test de Fisher (p)** |
| **Sexe** | | | | 0,177 |
| Femme | 7 (46,7 %) | 2 (22,2 %) | 7 (63,6 %) | |
| Homme | 8 (53,3 %) | 7 (77,8 %) | 4 (36,4 %) | |
| **Age au diagnostic** | | | | 0,668 (Kruskall Wallis) |
| Moyenne (sd) | 70,8 (15.5) | 72,8 (14.2) | 67,8 (13,5) | |
| Médiane [min-max] | 73 [42-95] | 79 [41-83] | 67 [52-90] | |
| **Stade T** | | | | 0,842 |
| T2 | 4 (26,7 %) | 2 (22,2 %) | 2 (18,2 %) | |
| T3 | 6 (40,0 %) | 6 (66,7 %) | 7 (63,6 %) | |
| T4 | 4 (26,7 %) | 1 (11,1 %) | 1 (9,1 %) | |
| TX | 1 (6,7 %) | 0 (0 %) | 1 (9,1 %) | |
| **Stade N** | | | | 0,577 |
| N0 | 7 (46, %) | 6 (66,7 %) | 5 (45,5 %) | |
| N1 | 2 (13,.3 %) | 2 (22,2 %) | 4 (36.4 %) | |
| N2 | 5 (33,3 %) | 1 (11,1 %) | 1 (9,1 %) | |
| NX | 1 (6,7 %) | 0 (0 %) | 1 (9,1 %) | |
| **Stade M** | | | | 0,090 |
| M0 | 10 (66,7 %) | 9 (100,0 %) | 10 (90,9 %) | |
| M1 | 5 (33,3 %) | 0 (0 %) | 1 (9,1 %) | |
| **Degré de différenciation** | | | | 0,563 |
| Bien différencié | 8 (53,3 %) | 3 (33,3 %) | 4 (36,4 %) | |
| Moyennement différencié | 7 (46,7 %) | 5 (55,6 %) | 7 (63,6 %) | |
| Peu différencié | 0 (0 %) | 1 (11,1 %) | 0 (0 %) | |

**Tableau 13: Influence du degré d'infiltration en neutrophiles (+ versus ++ versus +++) sur les caractéristiques tumorales**

Les résultats n'étant pas statistiquement significatifs, cette analyse a été reconduite en regroupant les tumeurs ayant une infiltration en neutrophiles ++ et +++ versus les tumeurs ayant une infiltration en neutrophiles +, ceci en raison des faibles effectifs. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

| | Degré d'infiltration | | |
|---|---|---|---|
| | + | ++ | test de Fisher (p) |
| **Sexe** | | | 0,922 (Chi2) |
| Femme | 7 (46,7 %) | 9 (45 %) | |
| Homme | 8 (53,3 %) | 11 (55 %) | |
| **Age au diagnostic** | | | 0,880 (Student) |
| Moyenne (sd) | 70,8 (15.5) | 70,1 (13,7) | |
| Médiane [min-max] | 73 [42-95] | 75 [41-90] | |
| **Stade T** | | | 0,442 |
| T2 | 4 (26,7 %) | 4 (20 %) | |
| T3 | 6 (40,0 %) | 13 (65 %) | |
| T4 | 4 (26,7 %) | 2 (10 %) | |
| TX | 1 (6,7 %) | 1 (5 %) | |
| **Stade N** | | | 0,323 |
| N0 | 7 (46,7 %) | 11 (55 %) | |
| N1 | 2 (13,3 %) | 6 (30 %) | |
| N2 | 5 (33,3 %) | 2 (10 %) | |
| NX | 1 (6,7 %) | 1 (5 %) | |
| **Stade M** | | | 0,064 |
| M0 | 10 (66,7 %) | 19 (95 %) | |
| M1 | 5 (33,3 %) | 1 (5 %) | |
| **Degré de différenciation** | | | 0,591 |
| Bien différencié | 8 (53,3 %) | 7 (35 %) | |
| Moyennement différencié | 7 (46,7 %) | 12 (60 %) | |
| Peu différencié | 0 (0 %) | 1 (5 %) | |

**Tableau 14: Influence du degré d'infiltration en neutrophiles (+ versus ++ / +++) sur les caractéristiques tumorales**

Même en regroupant les tumeurs ayant une infiltration en neutrophiles avec un score ++ et +++, les différences ne sont pas significatives même s'il est constaté une différence à la limite de

la significativité sur le plan statistique en ce qui concerne la présence de métastases au diagnostic (pour les tumeurs avec un score + versus  pour les tumeurs avec un score ++ / +++ ; p=0,064).

### b. L'infiltration tumorale en neutrophiles influence-t-elle l'évolution de la maladie?

Afin de déterminer si le degré d'infiltration tumorale en neutrophiles pouvait influencer l'évolution de la maladie, nous avons cherché si la survie des patients était statistiquement influencée par l'infiltrat. Les courbes de survie obtenues sont présentées dans la figure 21.

Avec un suivi médian de 29.4 mois [0.5-39.5] (IC95% ; 19.7-33.5), 6 patients étaient décédés au moment de l'analyse dans le groupe +, alors que seulement 1 patient et 2 patients étaient décédés respectivement dans le groupe ++ et le groupe +++. Cependant cette différence n'est pas statistiquement significative, probablement du fait de l'effectif réduit de notre échantillon.

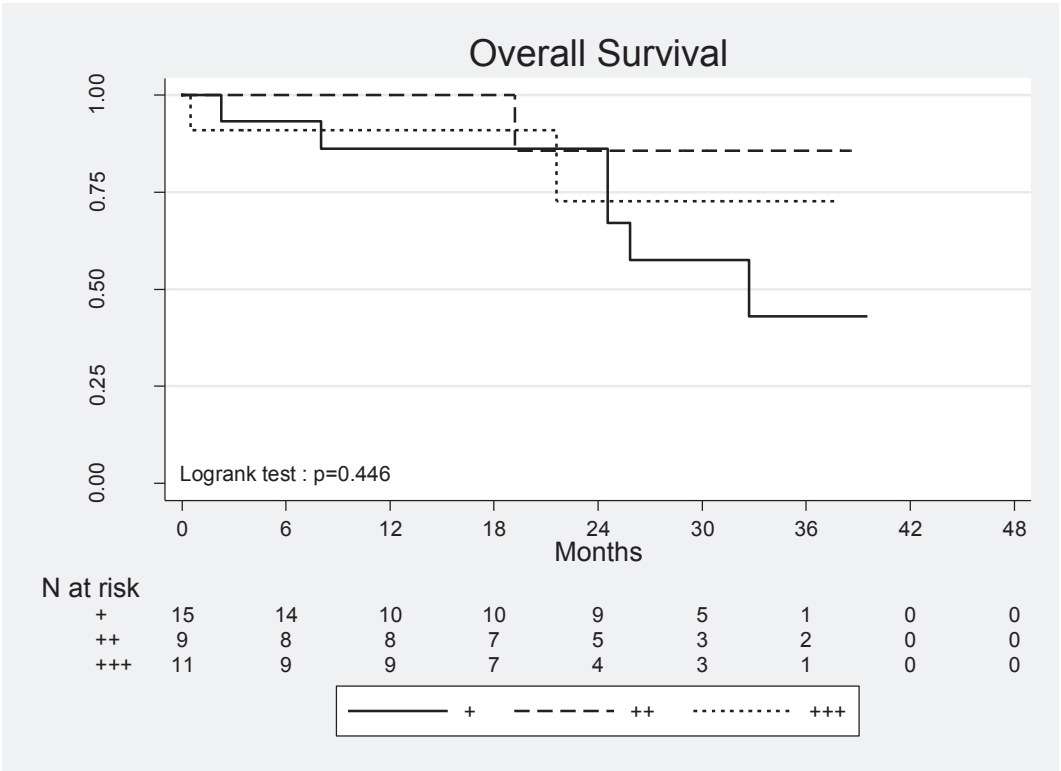



**Figure 21: Courbes de survie selon le degré d'infiltration tumorale en neutrophiles**

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans la littérature, l'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans la réponse anti tumorale porte particulièrement sur les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques, les cellules dendritiques, les macrophages activés, les lymphocytes Treg et les cellules myéloïdes suppressives. Les études portant sur l'effet anti tumoral des neutrophiles et leur utilisation en thérapeutique sont peu nombreuses. Il est maintenant admis que les neutrophiles sont présents au niveau des tumeurs, où leur rôle vis-à-vis de la tumeur est controversé, pouvant exercer soit une action pro-tumorale, soit une action anti-tumorale [43]. Dans un travail mené par notre équipe dans des modèles de cancer du côlon chez le rat et chez la souris, il a été montré que les neutrophiles étaient nécessaires à l'effet anti-tumoral d'un triacyl lipide A, l'OM-174, par leur capacité à secréter du granzyme B induit par les cytokines du microenvironnement tumoral. Le lipide A induit la relocalisation des neutrophiles dans la tumeur, qui côtoient alors les cellules tumorales, provoque la sécrétion du granzyme B et la mort des cellules tumorales due au granzyme B [116].

**Le travail présenté dans ce mémoire a donc consisté dans une première partie à conduire un essai clinique de phase I afin de déterminer si le lipide A est bien toléré par les patients et s'il peut induire, chez ces mêmes patients, la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire et notamment dans le recrutement des neutrophiles.**

L'étude de phase I a démontré que le profil de tolérance de l'OM-174 était tout à fait acceptable notamment au palier maximal à savoir 2 injections intraveineuses à 1000 µg/m² par semaine pour un total de 15 injections. Les effets secondaires ont toujours été d'intensité au maximum de grade 2 selon le CTC NCI version 2 ce qui explique que la dose maximale tolérée n'a pas pu être déterminée. Ils ont disparu après administration de paracétamol, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de corticostéroïdes

Dans la littérature, il a été rapporté que la survenue de signes généraux comme la fièvre était corrélée à l'obtention d'une réponse objective et d'une augmentation de la survie chez des patients traités par de l'IL-2 pour un mélanome malin, laissant supposer que l'administration de paracétamol ou de corticostéroïdes pour traiter ces symptômes pouvait avoir un effet péjoratif sur ce traitement [121]. Cependant, dans les modèles précliniques chez la souris et chez le rat, l'OM-174 n'induit pas de sécrétion d'IL-2 circulante. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques des autres cytokines notamment de l'IL-8, ne varient pas dans le temps, que les patients aient reçu ou non un traitement symptomatique. Ce niveau d'observation n'est sans doute pas le meilleur, les

réactions étant locales, au niveau de la tumeur et probablement des ganglions. Comme seules 3 stabilisations tumorales ont été observées, nous n'avons pas pu vérifier si l'administration de paracétamol, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de corticostéroïdes avait une influence sur la réponse tumorale, ce qui d'ailleurs n'est pas l'objectif d'un essai de phase I. Nous avons cependant constaté que ces 3 patients avaient tous reçu du paracétamol au décours de leur traitement. Ce sujet mérite d'être approfondi, y compris in vivo chez l'animal. Le profil de tolérance de l'OM-174 est similaire à celui d'autres lipides A, qu'il s'agisse de lipide A de synthèse comme le SDZ LMR 953 et l'ONO-4007, ou de lipide A préparés à partir de *Salmonella typhimurium et minnnesota* comme dans l'essai de phase I réalisée par Vosika et al [103,104,105]. Comme dans notre étude, Vosika et al. décrivent la survenue d'un bronchospasme considéré comme un événement indésirable grave. Dans cette même étude, un autre patient a présenté, à la dose la plus élevée (500 µg/m²), une hypotension sévère qui a été considérée comme une toxicité dose limitante. Nous avons pu évaluer la tolérance d'une dose de lipide A deux fois plus élevée que dans l'étude de Vosika et al ainsi qu'une répétition plus grande du nombre d'injections (15 contre 8) à ces doses élevées avec une tolérance acceptable [105].

Concernant les paramètres pharmacocinétiques de l'OM-174, ces derniers sont indépendants de la dose, entre 600 et 1000 µg/m², bien qu'une discrète augmentation non significative ait été observée pour les doses les plus élevées. Concernant la clairance de l'OM-174, celle-ci est faible (0,11 l / h), tout comme son volume de distribution (4,6 L). Ces caractéristiques sont concordantes avec celles observées par de Bono et collaborateurs, avec l'ONO-4007, un autre analogue synthétique de lipide A, dont la pharmacocinétique est indépendante de la dose, la clairance systémique faible (environ 1,3 ml / min), le volume de distribution faible (5-8 litres) et la demi-vie d'élimination longue (74-95 h). Ces données pharmacocinétiques ont validé le choix de l'administration de l'OM-174, deux fois par semaine chez les patients [103].

L'OM-174 administré par voie intraveineuse induit une augmentation significative de la concentration d'IL-8, d'IL-10, d'IL-6 et de TNF-α. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre la dose d'OM-174 et les pics de concentrations plasmatiques de chaque cytokine. La diminution du pic de concentration plasmatique du TNF-α et de l'IL-6 au fur et à mesure des injections d'OM-174 suggère l'installation d'une tolérance. L'apparition d'une tolérance ou d'un phénomène de désensibilisation de l'hôte lors de l'administration de doses multiples de produits microbiens est connue depuis longtemps chez l'animal et chez l'homme [122]. Nous avons déjà montré avec l'OM-174 que la stimulation in vitro de macrophages péritonéaux de rats ou de

souris les activait (production d'IL-1β, de TNF-α, d'IL-6, cytotoxicité directe) alors qu'une seconde stimulation restait sans effet et que la répétition des stimulations les rendait incapables de répondre pendant plusieurs jours. Il en est de même in vivo, chez le rat comme la souris, une première injection d'OM-174 active les macrophages péritonéaux ou les monocytes circulants, une seconde est sans effet, la répétition des injections rend les monocytes/macrophages totalement non répondeurs et ceci pendant plusieurs semaines. Il est probable que le même processus se produise chez l'homme en partant de l'idée que le TNF-α et l'IL-6 plasmatiques proviennent des monocytes/macrophages. Et en supposant que les macrophages de la tumeur se comportent comme les monocytes ou les macrophages péritonéaux, il serait tentant de penser que la tolérisation des macrophages est une condition de l'activité anti-tumorale du lipide A. Dans l'étude de De Bono et collaborateurs (ONO-4007), une augmentation des concentrations plasmatiques de l'IL-1α, de l'IL-6 et du TNF-α a été observée alors que ce n'était pas le cas avec SDZ LMR 953 dans l'étude de Kiani et collaborateurs [103,104]. Nos résultats sont partiellement en accord puisque nous avons observé une augmentation de TNF-α, de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'IL-10, mais pas de l'IL-1β et de l'IL-12. Les variations de concentrations des cytokines observées entre les trois essais cliniques pourraient être dues à la dose utilisée (de 2 ng/kg à 125 mg par patient), ou au rythme d'administration choisi (tous les jours pour SDZ LMR 953, chaque semaine pour l'ONO 4007). Cependant, la meilleure tolérance clinique de l'OM 174 en fait un médicament de choix pour le développement clinique.

De plus, la sécrétion importante d'IL-8 induite par l'OM-174 laisse suggérer que celui-ci peut être à l'origine d'un recrutement des neutrophiles au niveau de la tumeur.

Fait intéressant, notre étude montre qu'un nombre suffisant d'injections d'OM-174 doit être administré pour atteindre une activité biologique, puisque le nombre de cellules NK circulantes a augmenté de façon significative avec le nombre des injections d'OM-174. Par contre, bien qu'il y ait eu une tendance à l'augmentation de l'activité des cellules NK chez les patients recevant 15 infusions, les résultats n'ont pas été significatifs. Comme seulement trois patients ont reçu un total de 15 injections d'OM-174, ces résultats méritent d'être confirmés par des études supplémentaires. D'autant qu'une étude antérieure faite in vitro a montré que l'activité naturelle des cellules NK prélevées sur des patientes porteuses de tumeur du sein était effondrée par rapport à des volontaires saines mais était restaurée par l'OM-174 de façon significative.

TLR4 étant le récepteur des lipides A, nous avons recherché d'éventuelles mutations qui auraient pu expliquer la variabilité inter patient, en termes d'activités biologiques et cliniques. Sur les 17 patients de notre étude, 16 n'avaient aucune mutation. Mais, aucune analyse fonctionnelle n'ayant été réalisée, nous ne pouvons pas exclure de variations dans l'activité de TLR4. Par exemple des variations d'agrégation ou de migration dans les radeaux lipidiques. Néanmoins, tous les patients ayant répondu biologiquement, présentaient des cellules TLR4+ fonctionnelles.

Concernant l'efficacité clinique, nous n'avons observé aucune réponse tumorale objective, comme celles observées par Vosika ou de Bono [103,105]. Toutefois des stabilisations de la maladie ont été constatées chez 3 patients dont 2 atteints de cancer colo-rectal et 1 d'un cancer bronchique non à petites cellules. Ces stabilisations ayant été observées à 3 paliers avec des doses d'OM-174 et des nombres d'injection différents, aucune indication n'a pu être dégagée en ce qui concerne un schéma de traitement.

**Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché une potentielle implication des neutrophiles dans l'activité anti-tumorale du lipide A, de manière similaire à celle montrée dans les modèles de cancers coliques chez le rat et la souris. En particulier nous avons cherché si le micro-environnement tumoral induisait l'expression de granzyme B dans les neutrophiles intratumoraux. Nous avons montré que, contrairement aux neutrophiles du tissu sain adjacent à la tumeur, des neutrophiles intratumoraux exprimaient le granzyme B. Cette propriété n'est pas suffisante pour s'opposer à la croissance tumorale, mais nous avons montré que toutes les tumeurs étaient infiltrées par des neutrophiles dont certains étaient situés au voisinage des cellules tumorales. Par conséquent l'effet majeur du lipide A, qui est de provoquer la sécrétion du granzyme B, a toutes les chances d'être efficace d'autant plus que le lipide A augmente l'expression de granzyme B dans les neutrophiles.**

Les données de la littérature sur l'activité antitumorale des neutrophiles sont relativement limitées. Cette activité a été démontrée soit en réalisant une déplétion en neutrophiles, soit en inhibant le recrutement des neutrophiles ce qui a pour conséquence une augmentation de la croissance tumorale [69]. Cependant, le rôle des neutrophiles sur la régression tumorale n'a que rarement été étudié, tout comme la description des effecteurs de leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales, notamment chez l'homme. Parmi ceux-ci, il a notamment été rapporté que les

neutrophiles, préalablement stimulés par du G-CSF exprimaient des récepteurs Fc de type I des IgG, capables de lyser les cellules tumorales en présence d'un Ac dirigé contre un Ag HLA de classe 2 [72]. Les neutrophiles sont capables de tuer les cellules tumorales en produisant des ROS ou TRAIL [123,124]. Dans un travail mené dans le laboratoire, il a été démontré dans des modèles de cancer du côlon chez le rat et la souris, qu'un traitement par l'OM-174 induisait la relocalisation des neutrophiles dans la tumeur, augmentait l'expression de granzyme B induite par le microenvironnement tumoral et provoquait sa sécrétion induisant la mort des cellules tumorales.

Chez l'homme, nous avons montré que des neutrophiles étaient présents dans les tumeurs du colon. Cette présence a été retrouvée dans toutes les tumeurs de notre cohorte. Les neutrophiles étaient présents en quantité plus ou moins importante, avec une répartition se faisant de façon égale entre les différents groupes (score 1+, 2+ et 3+). Ceci est cohérent avec l'expression des chimiokines CXCL1, 2, 3, 5 et 8 (IL-8) dont les ARNm sont augmentés dans les tumeurs par rapport au tissu sain. L'augmentation est toujours significative pour CXCL1 et 3 et d'autant plus que les tumeurs sont plus infiltrées par les neutrophiles, ce qui laisse supposer que ces 2 chimiokines sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles dans les tumeurs.

Le granzyme B a été retrouvé exprimé dans toutes les tumeurs, et son expression est d'autant plus forte que l'infiltration des neutrophiles est forte, la corrélation étant significative, nous pouvons supposer que l'expression du granzyme B est due aux neutrophiles.

Grace à un double marquage avec un marqueur spécifique des neutrophiles (CD66b) et un anticorps spécifique du granzyme B nous avons constaté que des neutrophiles expriment le granzyme B. Dans les tumeurs les plus infiltrées par les neutrophiles, seuls les neutrophiles expriment le granzyme B, mais dans les tumeurs les moins infiltrées, des cellules n'étant pas des neutrophiles l'expriment aussi.

Dans les tumeurs les plus infiltrées, les neutrophiles sont au voisinage des cellules tumorales, par ailleurs tous les neutrophiles exprimant le granzyme B sont activés (les cellules granzyme B + et CD66- n'ont pas la morphologie de neutrophiles). Donc seuls les neutrophiles sont en situation d'être cytotoxiques par l'intermédiaire du granzyme B, parce que ce sont les seules cellules au voisinage des cellules tumorales qui expriment le granzyme B et peuvent donc le transférer.

Les cellules n'étant pas des neutrophiles qui expriment le granzyme B sont probablement des cellules NK ou des lymphocytes T CD8, ce ne sont sans doute pas des cellules tumorales ayant reçu du granzyme B. Chez l'homme comme dans les modèles animaux, les neutrophiles expriment le granzyme B sous l'effet du microenvironnement tumoral mais ne le sécrètent pas.

L'ensemble de ces éléments confirme que, dans les tumeurs du colon chez l'homme, les conditions d'une cytotoxicité des neutrophiles intratumoraux par l'intermédiaire du granzyme B sont réunies. Elles pourraient devenir efficaces si chez l'homme comme chez l'animal le lipide A provoquait la sécrétion du granzyme B, et par ailleurs augmentait le nombre de neutrophiles infiltrant et augmentait l'expression du granzyme B par les neutrophiles.

Pour conforter ces résultats, il nous faut montrer une corrélation négative significative entre l'expression de granzyme B par les neutrophiles infiltrant les tumeurs primaires au moment du diagnostic et le stade de la maladie. Il deviendra alors légitime d'amplifier cette réponse avec un lipide A pour la conduire à terme.

Pour étayer l'idée qu'au point de vue fonctionnel le granzyme B produit par les neutrophiles intervient dans la croissance tumorale et s'oppose à elle, certains points sont à conforter.

- Montrer que CXCL1 et 3 sont bien à l'origine de l'infiltration des tumeurs par les neutrophiles.
- Identifier les cytokines du microenvironnent tumoral qui induisent l'expression du granzyme B par les neutrophiles humains.
- Identifier les cellules infiltrant la tumeur, autres que les neutrophiles, qui expriment le granzyme B et quantifier cette expression.
- S'assurer que les cellules tumorales n'expriment pas le granzyme B
- Montrer in vitro que les neutrophiles primés par des cytokines du microenvironnement tumoral et activés par le lipide A sont bien cytotoxiques via le granzyme B pour des cellules cancéreuses coliques humaines.

Le tout devant être vérifié chez des patients traités par le lipide A.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

3. INCa. La situation du cancer en France en 2012. *INCa* 2012.

4. Herr HW, Laudone VP, Badalament RA, Oettgen HF, Sogani PC, Freedman BD, et al. Bacillus Calmette-Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J Clin Oncol* 1988 Sep;6(9):1450-5.

5. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den Eynde BJ, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol* 2007 Mar 1;178(5):2617-21.

6. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009;27:83-117.

7. Marcus R, Hagenbeek A. The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* 2007 Jan;(67):5-14.

8. Rossi AR, Pericle F, Rashleigh S, Janiec J, Djeu JY. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. *Blood* 1994 Mar 1;83(5):1323-8.

9. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, et al. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* 2002 Oct;188:33-42.

10. Khammari A, Labarriere N, Vignard V, Nguyen JM, Pandolfino MC, Knol AC, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *J Invest Dermatol* 2009 Dec;129(12):2835-42.

11. Negrier S, Michon J, Floret D, Bouffet E, Gentet JC, Philip I, et al. Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in 15 children with advanced metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1991 Aug;9(8):1363-70.

12. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989 Oct;210(4):474-84.

13. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996 Jan;14(1):7-17.

14. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007 May;56(5):641-8.

15. El HF, bouzahr-Rifai S, Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S. [Immune response and cancer]. *Bull Cancer* 2008 Jan;95(1):57-67.

16. Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008 Apr;14(4):179-89.

17. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001 May;53(4):279-87.

18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Feb 24;124(4):783-801.

19. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

20. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009 Jan;9(1):57-63.

21. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del BL, Re F. Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal* 2011;11:2037-50.

22. Lillard JW, Jr., Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 19;96(2):651-6.

23. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010 Nov 24;33(5):657-70.

24. Witko-Sarsat V, Rieu P, scamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000 May;80(5):617-53.

25. Gungor N, Pennings JL, Knaapen AM, Chiu RK, Peluso M, Godschalk RW, et al. Transcriptional profiling of the acute pulmonary inflammatory response induced by LPS: role of neutrophils. *Respir Res* 2010;11:24.

26. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011 Aug;11(8):519-31.

27. Schymeinsky J, Mocsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007 Aug;98(2):262-73.

28. Wagner C, Iking-Konert C, Denefleh B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004 Feb 1;103(3):1099-104.

29. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000 Jul;68(1):9-14.

30. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995 Jan;16(1):21-6.

31. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 1997 Oct 1;159(7):3595-602.

32. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992 Jul 27;307(1):97-101.

33. Zurier RB. Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1976;2:815-8.

34. Parks KR, Davis JM. Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. *Surg Infect (Larchmt )* 2012 Oct;13(5):300-6.

35. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.

36. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989 Mar 3;243(4895):1160-5.

37. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 Oct 1;84(7):2068-101.

38. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986 Jul 1;137(1):245-54.

39. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1986 Mar 1;136(5):1680-7.

40. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004 Nov;6(5):447-58.

41. DuPre' SA, Hunter KW, Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol* 2007 Feb;82(1):12-24.

42. Di CE, Coletti A, Modesti A, Giovarelli M, Forni G, Musiani P. Local release of interleukin-10 by transfected mouse adenocarcinoma cells exhibits pro- and anti-inflammatory activity and results in a delayed tumor rejection. *Eur Cytokine Netw* 1998 Mar;9(1):61-8.

43. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009 Sep 8;16(3):183-94.

44. Becker EL. The cytotoxic action of neutrophils on mammalian cells in vitro. *Prog Allergy* 1988;40:183-208.

45. Dallegri F, Ottonello L, Ballestrero A, Dapino P, Ferrando F, Patrone F, et al. Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation* 1991 Feb;15(1):15-30.

46. Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982 Jul;47(1):5-18.

47. Lichtenstein A. Neutrophil-mediated nonoxidative tumor lysis stimulated by high concentrations of phorbol myristate acetate. *Clin Immunol Immunopathol* 1988 Jun;47(3):296-309.

48. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A* 2009 Jun;75(6):475-81.

49. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984 Nov;64(5):959-66.

50. Clark RA, Szot S. The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity. *J Immunol* 1981 Apr;126(4):1295-301.

51. English D, Lukens JN. Regulation of neutrophil inflammatory mediator release: chemotactic peptide activation of stimulus-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 1983 Feb;130(2):850-6.

52. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 1982 Sep;70(3):598-607.

53. Kindzelskii AL, Petty HR. Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytolysis. *J Immunol* 1999 Mar 15;162(6):3188-92.

54. Kushner BH, Cheung NK. GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* 1989 May 15;73(7):1936-41.

55. Kushner BH, Cheung NK. Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity. *Blood* 1992 Mar 15;79(6):1484-90.

56. Ragnhammar P, Frodin JE, Trotta PP, Mellstedt H. Cytotoxicity of white blood cells activated by granulocyte-colony-stimulating factor, granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor and macrophage-colony-stimulating factor against tumor cells in the presence of various monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1994 Oct;39(4):254-62.

57. Wagner C, Stegmaier S, Hansch GM. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haemotopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol* 2008 Mar;45(6):1761-6.

58. Grossman WJ, Ley TJ. Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. *Blood* 2004 Aug 1;104(3):906-7.

59. Metkar SS, Froelich CJ. Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood* 2004 Aug 1;104(3):905-6.

60. Nicoletti G, de GC, Lollini PL, Bagnara GP, Scotlandi K, Landuzzi L, et al. In vivo and in vitro production of haemopoietic colony-stimulating activity by murine cell lines of different origin: a frequent finding. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989 Sep;25(9):1281-6.

61. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 1995 Jan 1;181(1):435-40.

62. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol* 2004 Mar 1;172(5):2853-60.

63. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordsmark M, Lundbeck F, von der MH. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009 Oct 1;27(28):4709-17.

64. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 2005 Oct 1;65(19):8896-904.

65. Imai Y, Kubota Y, Yamamoto S, Tsuji K, Shimatani M, Shibatani N, et al. Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study. *J Gastroenterol Hepatol* 2005 Feb;20(2):287-93.

66. Gungor N, Haegens A, Knaapen AM, Godschalk RW, Chiu RK, Wouters EF, et al. Lung inflammation is associated with reduced pulmonary nucleotide excision repair in vivo. *Mutagenesis* 2010 Jan;25(1):77-82.

67. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003 Jan;3(1):23-35.

68. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004 Dec;25(12):677-86.

69. Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell* 2011 Sep 13;20(3):300-14.

70. Musiani P, Allione A, Modica A, Lollini PL, Giovarelli M, Cavallo F, et al. Role of neutrophils and lymphocytes in inhibition of a mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IFN-alpha, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Lab Invest* 1996 Jan;74(1):146-57.

71. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* 2013 May;14(6):e218-e228.

72. Elsasser D, Valerius T, Repp R, Weiner GJ, Deo Y, Kalden JR, et al. HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1996 May 1;87(9):3803-12.

73. Valerius T, Repp R, de Wit TP, Berthold S, Platzer E, Kalden JR, et al. Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood* 1993 Aug 1;82(3):931-9.

74. Valone FH, Kaufman PA, Guyre PM, Lewis LD, Memoli V, Deo Y, et al. Phase Ia/Ib trial of bispecific antibody MDX-210 in patients with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses the proto-oncogene HER-2/neu. *J Clin Oncol* 1995 Sep;13(9):2281-92.

75. van de Winkel JG, Bast B, de Gast GC. Immunotherapeutic potential of bispecific antibodies. *Immunol Today* 1997 Dec;18(12):562-4.

76. Ghosh AK, Dazzi H, Thatcher N, Moore M. Lack of correlation between peripheral blood lymphokine-activated killer (LAK) cell function and clinical response in patients with advanced malignant melanoma receiving recombinant interleukin 2. *Int J Cancer* 1989 Mar 15;43(3):410-4.

77. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 2002 Jul;161(1):125-34.

78. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 2010 Feb;16(2):219-23.

79. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003 Mar;9(3):269-77.

80. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, et al. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 2000 Apr;163(4):1124-9.

81. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med* 1910;3(Surg Sect):1-48.

82. Brade H, Brade L, Schade U, Zahringer U, Holst O, Kuhn HM, et al. Structure, endotoxicity, immunogenicity and antigenicity of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins, O-antigens). *Prog Clin Biol Res* 1988;272:17-45.

83. Galanos C, Lehmann V, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, et al. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. *Eur J Biochem* 1984 Apr 16;140(2):221-7.

84. Wolff SM. Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J Infect Dis* 1973 Jul;128:Suppl-64.

85. Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ, Warren HS. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1990 Jul;58(7):2375-82.

86. Blondiau C, Lagadec P, Lejeune P, Onier N, Cavaillon JM, Jeannin JF. Correlation between the capacity to activate macrophages in vitro and the antitumor activity in vivo of lipopolysaccharides from different bacterial species. *Immunobiology* 1994 Apr;190(3):243-54.

87. Keller R, Gehri R, Keist R. The interaction of macrophages and bacteria: Escherichia coli species, bacterial lipopolysaccharide, and lipid A differ in their ability to induce tumoricidal activity and the secretion of reactive nitrogen intermediates in macrophages. *Cell Immunol* 1992 Apr 15;141(1):47-58.

88. Jeannin JF, Klein R, Reisser D, Lagadec P, Vincent M, Tatischeff I. Correlation between the synergistic effect of liposomes and endotoxins on the activation of macrophage tumoricidal activity and the effect of liposomes on the rough endoplasmic reticulum of macrophages. *J Membr Biol* 1988 Sep;104(2):107-18.

89. Jeannin JF, Onier N, Lagadec P, von JN, Stutz P, Liehl E. Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology* 1991 Sep;101(3):726-33.

90. Lagadec P, Jeannin JF, Reisser D, Pelletier H, Olsson O. Treatment with endotoxins of peritoneal carcinomatosis induced by colon tumor cells in the rat. *Invasion Metastasis* 1987;7(2):83-95.

91. Martin F, Caignard A, Jeannin JF, Leclerc A, Martin M. Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer* 1983 Nov 15;32(5):623-7.

92. Miyamoto K, Koshiura R, Hasegawa T, Kato N. Antitumor activity of Klebsiella 03 lipopolysaccharide in mice. *Jpn J Pharmacol* 1984 Sep;36(1):51-7.

93. Dye ES, North RJ. Macrophage accumulation in murine ascites tumors. I. Cytoxan-induced dominance of macrophages over tumor cells and the anti-tumor effect of endotoxin. *J Immunol* 1980 Oct;125(4):1650-7.

94. Abe S, Tsubouchi J, Takahashi K, Yamazaki M, Mizuno D. Combination therapy of murine tumors with lentinan plus lipopolysaccharide plus cyclophosphamide. *Gann* 1982 Dec;73(6):961-7.

95. Westphal O, Luderitz O, Rietschel ET, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharide and its lipid A component: some historical and some current aspects. *Biochem Soc Trans* 1981 Jun;9(3):191-5.

96. Rietschel ET, Brade L, Brandenburg K, Flad HD, de Jong-Leuveninck J, Kawahara K, et al. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev Infect Dis* 1987 Sep;9 Suppl 5:S527-S536.

97. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.

98. Ogawa T, Uchida H, Amino K. Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of Porphyromonas gingivalis. *Microbiology* 1994 May;140 ( Pt 5):1209-16.

99. Brunda MJ, Wright RB, Luistro L, Harbison ML, Anderson TD, McIntyre KW. Enhanced antitumor efficacy in mice by combination treatment with interleukin-1 alpha and interferon-alpha. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994 May;15(4):233-41.

100. Ukei S, Iida J, Shiba T, Kusumoto S, Azuma I. Adjuvant and antitumour activities of synthetic lipid A analogues. *Vaccine* 1986 Mar;4(1):21-4.

101. Takayama K, Ribi E, Cantrell JL. Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity. *Cancer Res* 1981 Jul;41(7):2654-7.

102. Nakatsuka M, Kumazawa Y, Ikeda S, Yamamoto A, Nishimura C, Homma JY, et al. Antitumor and antimicrobial activities of lipid A-subunit analogue GLA-27. *J Clin Lab Immunol* 1988 May;26(1):43-7.

103. de Bono JS, Dalgleish AG, Carmichael J, Diffley J, Lofts FJ, Fyffe D, et al. Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide. *Clin Cancer Res* 2000 Feb;6(2):397-405.

104. Kiani A, Tschiersch A, Gaboriau E, Otto F, Seiz A, Knopf HP, et al. Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients. *Blood* 1997 Aug 15;90(4):1673-83.

105. Vosika GJ, Cornelius DA, Gilbert CW, Sadlik JR, Bennek JA, Doyle A, et al. Phase I trial of ImmTher, a new liposome-incorporated lipophilic disaccharide tripeptide. *J Immunother (1991 )* 1991 Aug;10(4):256-66.

106. Brandenburg K, Lindner B, Schromm A, Koch MH, Bauer J, Merkli A, et al. Physicochemical characteristics of triacyl lipid A partial structure OM-174 in relation to biological activity. *Eur J Biochem* 2000 Jun;267(11):3370-7.

107. Onier N, Hilpert S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Davies JG, Jeannin JF, et al. Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis* 1999 Jun;17(4):299-306.

108. Onier N, Lejeune P, Martin M, Hammann A, Bauer J, Hirt P, et al. Involvement of T lymphocytes in curative effect of a new immunomodulator OM 163 on rat colon cancer metastases. *Eur J Cancer* 1993;29A(14):2003-9.

109. Rickham PP. Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br Med J* 1964 Jul 18;2(5402):177.

110. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization

for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000 Feb 2;92(3):205-16.

111. Lirussi F, Rakotoniaina Z, Madani S, Goirand F, Breuiller-Fouche M, Leroy MJ, et al. ADRB3 adrenergic receptor is a key regulator of human myometrial apoptosis and inflammation during chorioamnionitis. *Biol Reprod* 2008 Mar;78(3):497-505.

112. Prunet C, Montange T, Vejux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, et al. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry A* 2006 May;69(5):359-73.

113. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005 Jun;67(6):2454-61.

114. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979 Nov 27;18(24):5294-9.

115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.

116. Martin A, Seignez C, Scagliarini A, Godard C, Decologne N, Isambert N, et al. Antutumoral effect of granzyme B from tumor neutrophils. *J Exp Med* 2013;(soumis).

117. Schmidt T, Zundorf J, Gruger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol* 2012 May;91(5):791-802.

118. Carus A, Ladekarl M, Hager H, Nedergaard BS, Donskov F. Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br J Cancer* 2013 May 28;108(10):2116-22.

119. Goddard DS, Yamanaka K, Kupper TS, Jones DA. Activation of neutrophils in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005 Dec 1;11(23):8243-9.

120. Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol* 2006 Sep;67(9):676-82.

121. Ellegaard M, Bastholt L, Jakobsen A, Donskov F, Schmidt H. Interleukin-2-induced fever in relation to objective tumor response and survival in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2010;28:15s.

122. Rockwell C, Morison D, Qureshi N. Lipid-A mediated tolerance and cancer therapy. *In Cancer therapy Edited by Jeannin JF* 2010;81-99.

123. Lichtenstein A, Seelig M, Berek J, Zighelboim J. Human neutrophil-mediated lysis of ovarian cancer cells. *Blood* 1989 Aug 1;74(2):805-9.

124. Simons MP, Nauseef WM, Griffith TS. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. *Immunol Res* 2007;39(1-3):79-93.

# ARTICLE

Isambert et al. BMC Cancer 2013, 13:172
http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/172

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

# Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors

Nicolas Isambert[1,2,4,5*], Pierre Fumoleau[2,3], Catherine Paul[1,4,5], Christophe Ferrand[1], Sylvie Zanetta[2], Jacques Bauer[6], Kevin Ragot[3,5], Gérard Lizard[3,5], Jean-François Jeannin[1,4,5] and Marc Bardou[1,3,5,7]

## Abstract

**Background:** Lipids A, the lipophilic partial structure of lipopolysaccharides, induce regression of several tumor types in animal models. Rather than exerting direct cytotoxic effect, these compounds trigger the immune system which in turn stimulates secretion of cytokines, and activates the inducible nitric oxide synthase, as well as immune cell infiltration of tumors. OM-174 is an analogue of lipid A with dual action on Toll-like receptors 2 and 4. In an experimental model of peritoneal carcinomatosis induced in BDIX rats by intraperitoneal injection of syngeneic PROb colon cancer cells, it induced a complete regression of tumors. The present phase I trial was conducted to determine the maximum tolerated dose, the recommended phase II dose and biological response associated with OM-174 administered as intravenous infusion.

**Methods:** Patients received OM-174 twice weekly for a total of 5, 10 or 15 injections of either 600, 800 or 1000 μg/m$^2$. Blood samples for pharmacokinetic analysis and cytokine dosages were collected. NK cells activity and Toll-like receptors 4 polymorphism analysis were also performed.

**Results:** Seventeen patients were included. The highest dose administered was 1000 μg/m$^2$ repeated in 15 injections. The most common toxicities were a chills, fever, nausea/vomiting, diarrhea, fatigue and headache. No patient experienced haematological side effects. As no dose limiting toxicity was observed, despite a grade 3 respiratory complication, the maximal tolerated dose and recommended dose were not established. Three patients exhibited disease stabilization with a mean duration of 4 months. Pharmacokinetic profile of OM-174 was characterized by a low distribution volume and clearance. Analysis of TLR 4 polymorphysm showed that most (16/17) patients carried the wild type alleles. A progressive increase in NK cell number and activity was observed only in patients receiving 1000 μg/m$^2$ of OM-174. A peak of IL-8 and IL-10 concentrations were observed after each OM-174 injection. Peaks of TNF-alpha and IL-6 concentrations were detected after the first infusion and decreased progressively suggesting tolerance.

**Conclusion:** OM-174 therapy was well tolerated at biologically active concentrations. Whereas the recommended dose was not determined, further studies are planned in combination with chemotherapy as animal models suggest a strong synergistic antitumor effect.

**Trial registration:** NCT01800812 (ClinicalTrials.gov Identifier).

**Keywords:** Immune response, OM-174, Lipid A analogue, Refractory solid tumors, Phase I

* Correspondence: nisambert@cgfl.fr
[1]INSERM CIC-P803, CHU de Dijon, Batiment du Pr Marion, 14 rue Gaffarel, BP77908, 21079, Dijon Cedex, France
[2]Centre G-F Leclerc, 1 rue du Pr Marion, BP77980, 21079, Dijon Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Isambert et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Background

Despite a downward trend of mortality rates [1-5], cancer remains the second cause of death, after cardiovascular diseases, in industrialized countries accounting for 570,000 deaths in the USA in 2010 [6,7].

Whereas the primary tumor can, in most cases, be efficiently treated by a combined therapeutic approach, preventing the metastatic spread of the disease is often not effective. The eradication of disseminated tumor cells present in the blood circulation and micro-metastases in distant organs therefore represents another promising approach of cancer immunotherapy. The immune system could recognize tumor-specific antigens, and eliminate cancer cells. Furthermore it has been highlighted that some cancers, such as colorectal cancer, cause direct inhibition of the host's immune response with a detrimental effect upon prognosis suggesting that stimulation of the immune system might offer a therapeutic strategy to counteract these effects [8]. This has been observed with Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4 and TLR9 agonists, such as BCG and paclitaxel, which have demonstrated significant benefit for the treatment of bladder and breast cancers [9-11].

Toll-like receptors (TLRs) are important sensors of foreign microbial components as well as products of damaged or inflamed self-tissues. TLRs are a family of type I transmembrane proteins that are the major pattern recognition receptors, and using TLR proteins, host can recognize the conserved molecular structures found in pathogens called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In addition to their recognition of PAMPs, several TLRs have also been shown to recognize endogenous ligands associated with inflammation, which have been termed danger-associated molecular patterns (DAMPs). Then, TLRs have an important role in maintaining tissue homeostasis by regulating the inflammatory and tissue repair in responses to injury. There are 13 TLRs described in mammals with a broad expression profile but TLR11, 12 and 13 are not expressed in the human genome. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 reside in the plasma membrane and recognize extracellular ligands [12]. It is now well recognized that TLR4 is signalling receptor for lipopolysaccharides (LPS) and more specifically lipid A [13,14].

LPS are major cell wall components of Gram-negative bacteria and were found to be able to induce regression of several tumor types in animal models [15]. This antitumor activity is related to lipids A, a component of LPS with oligosaccharide core and polysaccharide chain [16-19]. Lipids A do not induce direct cytotoxicity on tumor cells but trigger the immune system [16,19] stimulating expression and secretion of several cytokines [20,21], and activating the inducible nitric oxide synthase (NOSII) [22]. They also induce activation of various immune cells which infiltrate the tumors [15,17,23,24].

OM-174 is an analogue of lipid A that exerts, in experimental models, anti-tumoral effect against different tumor types including colon and breast cancers and melanoma [17,25]. In a model of peritoneal carcinomatosis induced in BDIX rats by intraperitoneal injection of syngeneic PROb colon cancer cells, intravenous (IV) administration of OM-174 (1 mg/kg, 15 times every third day), induced complete regression of tumors and hemorrhagic ascitis in 95% of cases [17]. This anti tumoral activity was associated with cytokine secretion and NOSII activation [22].

Based on these experimental data showing that several administrations are needed to achieve antitumor effect, as well as on the overall favourable safety profile of lipid A analogues observed in phase I studies [26-28] including two with single IV-administration of OM-174, one conducted in healthy volunteers and the other in patients with solid cancer, we designed a phase I study with repeated dose of OM-174. The aim of this study was to determine tolerability, toxicities, the maximum tolerated dose (MTD) based upon predetermined dose limiting toxicities (DLT) and the recommended phase II dose of OM-174 administered as a 15 minutes intravenous infusion, repeated twice weekly for 5, 10 or 15 administrations.

This new phase one was deemed necessary as animal data suggested that repeated administration of OM-174 were needed to observe anti-tumor effect, with a maximal effect observed after 15 injections. This study also aimed to assess the pharmacokinetic profile and the biological response induced by OM-174 in the multidose administration schedule.

## Methods

This was a single center phase I study conducted in the clinical research unit (Centre Georges-François Leclerc - INSERM CIC-P 803) in Dijon France. The study protocol and its amendments were approved by Ethics Committee and Health Authorities (NCT01800812 (ClinicalTrials.gov Identifier)). The trial was designed according to the current Declaration of Helsinki [29] and conducted in accordance with Good Clinical Practice Guidelines. Written informed consent was obtained from each participating patient before study entry. The study was supported by a grant from the French Ministry of health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique, PHRC 2002). OM-174 was a generous gift from OM-Pharma (Geneva, Switzerland).

### Patients selection

Patients were eligible if they were ≥ 18 years, had histologically proven metastatic solid tumor with measurable progressive disease outside the central nervous

system for which no standard curative measures exist. Other requirements included predicted life expectancy ≥ 3 months; a WHO performance status (PS) ≤ 2, no severe or uncontrolled medical conditions; adequate hematologic count), no severe liver impairment and adequate renal function according to international standard values.

Patients must have recovered from adverse events due to agents administered > 4 weeks earlier or ≥ 6 weeks for nitro urea or mitomycine C.

Main non-inclusion criteria were medical history of cardiac disorders; medical history of auto immune disease and corticosteroids use.

### Study design and dose escalation scheme

Based on animal models suggesting that maximal anti-tumoral was achieved with 15 infusions it was decided to include the number (Nb) of infusions in the definition of Dose Levels to confirm the good tolerance of a growing number of OM-174 injections. A standard phase I design was thus used with 3 to 6 patients to be included per each OM-174 infusion dose level (DL: 600, 800 and 1000 μg/m2) and each number of infusions (5, 10, 15). Patients were observed for the first 2 weeks before the next dose escalation was deemed possible. The MTD was defined as the DL at which two or more out of 3 or 6 patients of a DL developed a dose-limiting toxicity (DLT). The recommended dose (RD) for further clinical testing, defined as the DL below the MTD, had to be assessed in at least 6 patients.

### Dose Limiting Toxicities (DLTs)

DLTs were defined using the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 2.0 (CTCAE) as any of the following events deemed attributable to OM-174, i.e. occurring during the time of the deliverance of this drug and a follow-up period of 30 days: Grade 4 neutropenia lasting 5 or more consecutive days; febrile neutropenia; neutropenic infection; Grade 4 thrombocytopenia or Grade 3 thrombocytopenia with bleeding requiring platelet transfusion; Grade 4 anaemia, any Grade 3 or greater drug related non haematological toxicity (except nausea, vomiting, alopecia).

### Study drug administration

In this open-label, nonrandomised phase I study, with double dose escalation protocol, OM-174 was administered intravenously as a 15 minutes infusion twice weekly at repeated intervals of 3 and 4 days. OM-174 was manufactured by OM Pharma Pharmaceuticals, Inc (Geneva, Switzerland).

Based on the results of a previous unpublished phase I study of single administration of OM-174 to cancer patients where only one serious adverse event, a severe transient hypoxia, occurred at the dose level of 800 μg/m$^2$, with no other safety concerns with OM-174 dose up to 1300 μg/m$^2$, it was decided that all patients would have to receive a first administration of 600 μg/m$^2$ to reduce the risk of severe reaction. The dose escalation protocol and the dose levels are depicted in Table 1.

### Pre-treatment evaluation and follow up

At baseline, physical examination and routine laboratory tests were performed and WHO PS determined. Complete blood cell count was obtained on a weekly basis. Biochemical profile was performed at inclusion and each drug administration. All toxicities were graded using the CTCAE version 2.0. Each patient had to receive the full course of treatment, except in case of early progression, unacceptable toxicity, serious intercurrent illness, or patient refusal. Tumor measurements were performed at baseline, at the end of the treatment (i.e 3, 5 and 8 weeks after the beginning of treatment in the cohorts with 5, 10 and 15 infusions respectively). In case of control of disease, tumor assessment was performed on a monthly basis. Responses were assessed using RECIST [30].

### Pharmacokinetic assessment

Blood samples for pharmacokinetic (PK) of OM-174 were drawn at pre-dose, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h for the first infusion and at pre-dose, 1 and 2 h for the 2$^{nd}$, 3$^{rd}$, 5$^{th}$, 9$^{th}$ and 15$^{th}$ infusions, when appropriate. For all other interim injections, two blood samples were collected, before and at the end of IV-infusion.

PK parameters assessed were Cmax, Tmax, area under the curve (AUC) Last, and AUC0-inf., systemic clearance (Cl), volume of distribution (Vdβ) and elimination half-life (t1/2_lambda_z).

### Cytokines measurement

Blood samples were collected for cytokine dosage (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α) at the same

**Table 1 Dose escalation schedule**

| Dose level | Nb of infusion per patients | Dose per infusion | Nb of patients included | Total of infusions delivered |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 600 μg/m$^2$ | 3 | 15 |
| 2 | 10 | 600 μg/m$^2$ | 3 | 30 |
| 3 | 15 | 600 μg/m$^2$ | 3 | 36 |
| 4 | 5 | 800 μg/m$^2$ | 3 | 15 |
| 5 | 10 | 800 μg/m$^2$ | 3 | 17 |
| 6 | 15 | 800 μg/m$^2$ | 0 | 0 |
| 7 | 5 | 1000 μg/m$^2$ | 0 | 0 |
| 8 | 10 | 1000 μg/m$^2$ | 2 | 25 |
| 9 | 15 | 1000 μg/m$^2$ | 0 | 0 |

Suppression of dose level 6 and 7 after amendment of the protocol.

time as samples for pharmacokinetic analysis. Cytokine measurements were determined by Cytometric Bead Array (CBA; BD Biosciences). Serum of patients were incubated with labeled capture beads and detection reagent for 3 h in the dark at room temperature and were analyzed with a flow cytometer (FACSCalibur; BD Biosciences) using the respective CBA Analysis software (BD Biosciences) and Bender MedSystems software. Each experiment was performed in duplicate to ensure for reproducibility of results, as previously described [31,32].

### Natural Killer activity analysis

Blood samples for NK cell activity analysis were collected before and 2 h after the first and the $2^{nd}$, $3^{rd}$, $9^{th}$ and $15^{th}$ injections. NK cells were isolated with lymphocytes from blood by density gradient centrifugation (Unicep, Novamed, Jerusalem) and purified with CD56 coated magnetic microbeads (Miltenyi Biotec). They were incubated with or without recombinant IL-2 for 40 h, then incubated in 96-well plates for 4 h with K562 human leukemia cells or Daudi cells which were used as NK and LAK target cells (TC), to yield a NK :TC ratio of 10. NK cytotoxicity was classically calculated as in chrome test assay.

### TLR 4 polymorphism analysis

The analysis of 2 single nucleotide polymorphisms of TLR $TLR4_{D299G}$ and $TLR4_{T399I}$ was performed as previously described by Ducloux et al. [33].

Prior to polymorphism analysis, gDNA was extracted from serum and amplified using the Whole Genome Amplification method Polymorphisms analysis was then performed using restriction fragment length polymorphism method and direct PCR sequencing for TLR4 (2 polymorphisms).

### Statistical analysis

Because of the nature of this study, no formal statistical analysis was planned. Evaluation of the data consisted primarily on summary displays (i.e., descriptive statistics and graphs). Qualitative data were summarized by frequency and percentages, while quantitative data were summarized by descriptive statistics.

## Results

### Patient characteristics

From November 2004 to July 2007, 17 patients were enrolled. Their characteristics are described in Table 2. Main tumour type was colon or rectal cancers, followed by breast cancer and ovarian cancer. All patients were included after failure of optimal standard treatment, including chemotherapy which consisted in the majority (58.8%) of cases in 4 or more lines, according to their tumor type.

**Table 2 Patient's characteristics**

| Characteristic | Nb of patient (%) |
|---|---|
| Nb of registered and treated patients | 17 |
| Age (years) | |
| Median | 59 |
| Range | 44 - 75 |
| Gender | |
| Male | 9 (53) |
| Female | 8 (47) |
| WHO performance status | |
| 0 | 3 (18%) |
| 1 | 12 (70%) |
| 2 | 2 (12%) |
| Type of cancer | |
| Colon or colorectal cancer | 7 (41%) |
| Breast cancer | 5 (29%) |
| Ovarian cancer | 2 (12%) |
| Non-small-cell-lung cancer | 1 (6%) |
| Head and neck cancer | 1 (6%) |
| Hepatocarcinoma | 1 (6%) |
| Status disease | |
| Minimal | 5 (29%) |
| Bulky | 12 (71%) |
| Metastatic sites | |
| Liver | 11 (65%) |
| Lung | 9 (53%) |
| Lymph nodes | 5 (29%) |
| Bone | 3 (18%) |
| Skin | 3 (18%) |
| Brain | 1 (6%) |
| Adrenal gland | 1 (6%) |
| Previous lines of chemotherapy | |
| Median | 5 |
| Range | 1 - 11 |
| Distance by last chemotherapy | |
| Median (months) | 1,5 |
| Range | 1 - 18 |

### Drug delivery

A total of 138 infusions were administered with a median number of 5 injections (range: 3 to 15). Protocol was amended after 15 patients have been included, to suppress dose level 6 and 7 to facilitate patient enrollment. The investigator had the choice to continue treatment as up to a total of 15 infusions if a benefit was observed for the patient.

Number of patients and total of delivered infusions in each DLs are depicted in Table 1.

The majority of the subjects (82%) received all the administrations planed in each DL. At DL3 (15 injections

of 600 μg/m$^2$), a 63-year-old woman with a metastatic breast cancer, received only 6 infusions due to a rapid alteration of her general status in relation to a progressive disease; at DL 5 (10 injections of 800 μg/m$^2$), a 46-year -old woman with ovarian cancer and a 68-year-old man with liver cancer received respectively only 4 and 3 out of 10 OM-174 infusions because of a progressive disease in the first case and a severe adverse event, bronchospasm, in the other one.

### Safety results

All patients were evaluable for safety analysis. No haematological disorders were observed after OM-174 administration, in any patient.

Non haematological adverse events are shown in Table 3, according to treatment cycle. The most frequent adverse event was flu-like syndrome, reported by 12 of the 17 patients. However no grade 3 and 4 events were observed. Chills occurred in 12 patients, associated with fever in 7 cases. For patient's convenience, IV acetaminophen had to be administered after 68 of 138 (49%) OM-174 infusions and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) after 19 (14%) OM-174 infusions to treat flu-like syndromes.

Gastro-intestinal disorders were seen in 7 patients. Four of them had nausea or vomiting and 3 diarrhea. Four patients experienced fatigue and three reported having headache after OM-174 administration.

All other adverse events, hypertension not requiring treatment, dizziness, somnolence, and dysphagia, were graded one and were experienced by a single patient.

Grade 1 hepatic cytolysis and cholestasis were observed in a patient who had a progressive disease, and it was concluded that this abnormalities were unlikely related to the drug.

No death related to the drug was observed during the study.

**Table 3 Incidence of worst grade for most common drug-related non haematological adverse events per cycle**

| | NCI CTC grading | | |
|---|---|---|---|
| Adverse Events | All grades N (%) | G3 N (%) | G4 N (%) |
| Chills | 12 (70) | - | - |
| Fever | 7 (41) | - | - |
| Nausea | 4 (23) | - | - |
| Vomiting | 4 (23) | - | - |
| Fatigue | 4 (23) | - | - |
| Headache | 3 (17) | - | - |
| Diarrhoea | 3 (17) | - | - |
| High blood pressure | 1 (7) | - | - |
| Dizziness | 1 (7) | - | - |
| Somnolence | 1 (7) | - | - |
| Dysphagia | 1 (7) | - | - |
| Cholestasis | 1 (7) | - | - |
| Cytolysis | 1 (7) | - | - |
| bronchospasm | 1 (7) | - | - |

### Determination of the MTD

All the 17 patients enrolled were evaluable for the determination of the MTD, but since no DLT was observed its determination was not feasible.

However, a patient included in the study for progressive hepatocarcinoma and scheduled to be treated at dose level 5 (10 infusions of 800 μg/m$^2$ of OM-174) experienced a serious adverse event after the third administration. The patient exhibited a severe bronchospasm with oxygen desaturation, hypoxemia immediately at the end of the treatment. He fully recovered after an IV-infusion of corticosteroids but did not receive any further administration of the study drug. This was not considered as a dose-limiting toxicity since it was not related to the dose and was more likely to be of immunological origin, as patients receiving the next dose of 1000 μg/m$^2$ and the 5 additional patients who received the same dose of OM-174 (800 μg/m$^2$) for at least five administrations did not experience such grade 3 or 4 toxicity.

### Pharmacokinetics

All 17 patients were evaluable for PK.

After the first IV infusion at the single dose of 600 μg/m$^2$, OM-174 pharmacokinetic profile showed a Tmax longer than the end of the infusion, a Cmax reaching 394 ng/ml and a two phases elimination process (an initial phase of only a few minutes and a second phase lasting about 22 hr). Clearance and volume of distribution were low, 0.11 L/h (66 mL/hr/m$^2$) and 4.6 L (2643 mL/m$^2$), respectively. No accumulation occurred at the multiple dosages of 600 μg/m$^2$ twice a week, whereas a small accumulation was evidenced for the higher 800 and 1000 μg/m$^2$ dosages.

### Cytokines dosage

All patients were evaluable for this analysis. Cytokine changes induced by OM-174 infusions are summarized in Table 4. Several profiles were observed. Unlike IL-1β and IL-12 which were not detectable (data not shown), IL-8 (Figure 1a) and to a lesser extend IL-10 increased after each OM-174 injection within same range, whereas peaks of TNF-α and IL-6 concentrations decreased from the first to the last injection of OM-174, suggesting tolerance (Figures 1b and 1c).

### Natural killer activity analysis

When all patients with available data were considered, neither the number nor the activity of NK cells were increased. Nevertheless in patients receiving 15 injections

**Table 4 Results of dosage of cytokines after the administration of OM-174**

| | | Dose level in ug/m$^2$ | Median pg/ml | Minimum pg/ml | Maximum pg/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| IL8 | 2h | 600 | 2417 | 54 | 5000 |
| | | 800 | 3053 | 443 | 5000 |
| | | 1000 | 1469 | 1169 | 1768 |
| IL6 | 2h | 600 | 461 | 3 | 1521 |
| | | 800 | 1403 | 150 | 5000 |
| | | 1000 | 676 | 296 | 1058 |
| IL10 | 2h | 600 | 42 | 4 | 138 |
| | | 800 | 90 | 4 | 326 |
| | | 1000 | 48 | 43 | 52 |
| TNF-α | 1h | 600 | 907 | 4 | 1446 |
| | | 800 | 684 | 4 | 1970 |
| | | 1000 | 754 | 485 | 1024 |
| IL12 | 2h | 600 | 12 | 0 | 35 |
| | | 800 | 0 | 0 | 11 |
| | | 1000 | 8 | 8 | 9 |
| IL1β | 1h | 600 | 34 | 0 | 115 |
| | | 800 | 0 | 0 | 0 |
| | | 1000 | 13 | 12 | 14 |

of OM-174, irrespective of the dose, NK cell number was increased compared with baseline value, from 0.67 ± 0.25 × 106 to 2.21 ± 0.17 × 106 NK cells ($p<0.005$). Furthermore, patient 17, who received the highest dose of OM-174 (1000 μg/m$^2$) and the highest number of injections (15) showed a significant progressive increase in NK cell activity as OM-174 infusions were repeated (Figure 2).

### TRL 4 polymorphism analysis

All but one (16 out of 17) patients of this cohort carried the wild type alleles for $TLR4_{D299G}$ and all for $TLR4_{T399I}$ polymorphisms, making us unable to assess the relationship between TLR4 polymorphisms and response to OM-174, either in terms of biological or clinical response.

### Antitumor activity

Responses were assessed by the investigator in every patient.

One patient with hepatocellular carcinoma who was withdrawn from the study after the third administration because of grade 3 toxicity (bronchospam) was not available for tumor response.

Stabilization of disease was documented in 3 patients (17%) and seen at DL 3, DL4 and DL8. Characteristics of these patients are summarized in Table 5. Although no formal statistics were performed, no trend was observed for a correlation between disease course and any of the biological parameters that were assessed in the present study.

## Discussion

Our study strengthens data on the overall very favourable safety profile of OM-174, as administered for up to 15 injections as a biweekly infusion and up to 1000 μg/m$^2$ which is the recommended dose. Chills (70%) and fever (41%) were the most common adverse advents, with no grade 3 or 4, explaining that the MTD could not be determined, and were reversible with acetaminophen, NSAID or steroid treatments. Furthermore no increase in severity occurred as injections were repeated. It might be argued that giving acetaminophen or NSAIDs to patients with grade 1 or 2 fever might impair antitumoral effect as it has been suggested that response to IL-2 plus interferon-alpha might be altered by acetaminophen in patients with metastatic melanoma [34]. Nevertheless our patients were included prior to this report that has never been published as a full paper and only a trend was suggested. The number of patients with disease stabilization observed in our study (3) is too small to allow for an appropriate assessment of the influence of acetaminophen or NSAIDs use in tumour response, but it has to be noticed that these 3 patients all received acetaminophen.

Others adverse events included nauseas, vomiting, fatigue, headache and diarrhoea and were generally of mild to moderate intensity. The more severe adverse event was an episode of bronchospasm which occurred for a patient with a progressive hepatocarcinoma after the third infusion of 800 μg/m$^2$.

The safety profile of OM-174 we describe here is similar to that observed in others studies with other lipids A [26-28], whether the lipid A was of synthetic origin as SDZ MRL 953 [26] and ONO-4007 [27], or prepared from S typhimurium and minnnesota as in the phase I trial performed by Vosika et al. Similarly to our study, Vosika et al. described bronchospasm in one patient, considered as a severe adverse event. In this study another patient experienced, at the highest dose level (500 μg/m$^2$) a severe hypotension which was considered by the authors as a DLT. It has to be noted that we assessed twice higher dose and number of injections (15 vs. 8) of lipid A than in the study by Vosika et al [28].

OM-174 PK parameters appeared to be independent of dose within the dose range of 600 – 1000 μg/m$^2$. A trend toward higher OM-174 concentrations was observed when administered doses increased, but the difference was not significant. OM-174 is a drug with a low systemic clearance (0.11 L/h) and a small distribution volume (4.6 L). Our results are in agreement with those of de Bono et al. [27] who described that the pharmacokinetic of ONO-4007, another synthetic lipid A analogue,

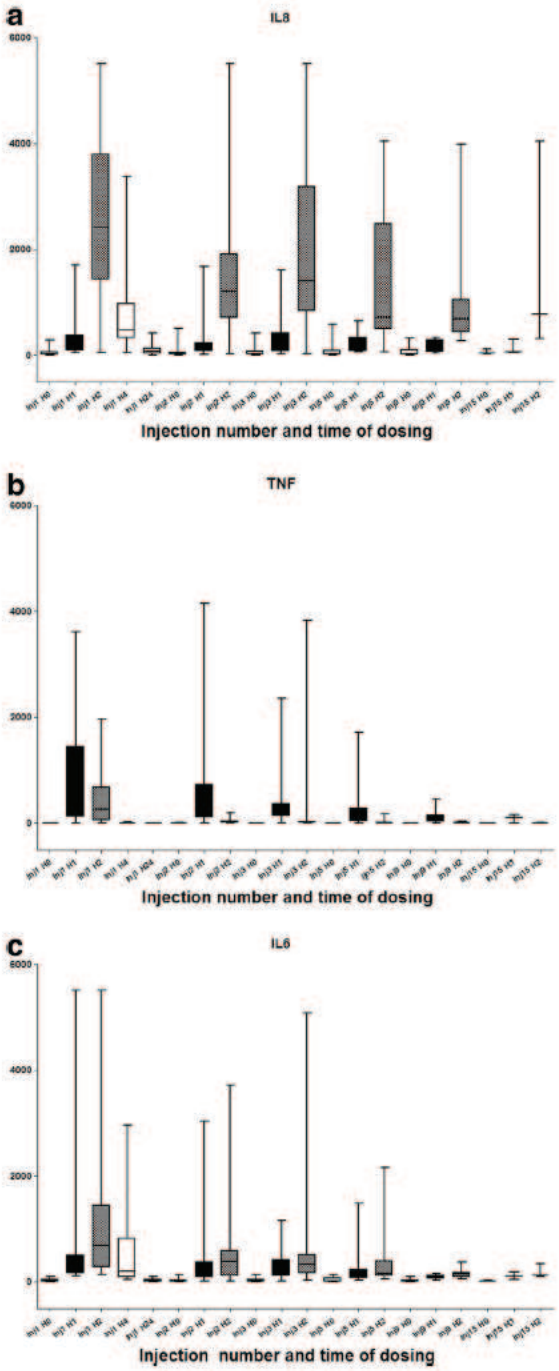



**Figure 1 a Increase of IL-8 concentration after each injection of OM-174 with a peak at second hour, independently of dose of OM-174 and number of injections.** Black, doted and white boxes represent the value of the cytokine of interest 1, 2 and 4 hours after the injection of interest. Analyses were conducted on all 17 patients according to their number of OM-174 injections. **1b** and **1c** Both concentration of TNF-α and IL-6 decreased after each injection of OM-174 suggesting a tolerance. The peak of secretion is observed respectively 1 and 2 hours after the first injection of OM-174 for TNF-α and IL-6. Black, doted and white boxes represent the value of the cytokine of interest 1, 2 and 4 hours after the injection of interest. Analyses were conducted on all 17 patients according to their number of OM-174 injections.

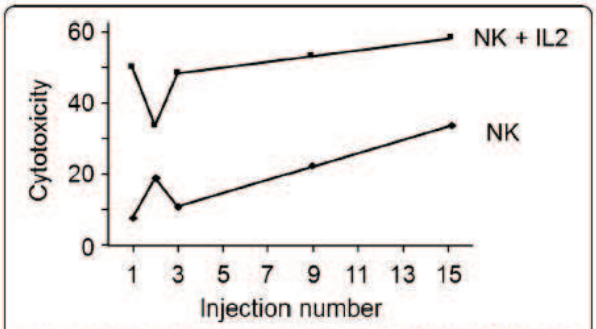



**Figure 2** Increase of NK activity after each injection of 1000 μg/m² OM-174 and in association with IL-2.

appeared to be independent of dose and showed linearity with respect to time. ONO-4007 was described to have a low systemic clearance (approximately 1.3 ml/min) and a small volume of distribution (5-8 liters) with a long t1/2 of 74-95 h. These data validated the twice weekly administration protocol. It has previously been reported that shorter intervals between repeated injection of LPS lead to the development of LPS tolerance [35] and similar tolerance might have occurred with Lipid A analogues even if it has never been studied.

Pharmacodynamic studies showed OM-174 IV-infusion induced a significant increase in IL-8, IL-10, IL-6 and TNF-α concentrations. IL-8 and IL-10 concentrations increased after each OM-174 injection whereas TNF-α and IL-6 concentrations were highest after the first OM-174 injection and declined thereafter as OM-174 injections were repeated. This response was not correlated to the dose of OM-174 and is known as tolerance. The occurrence of tolerance or host desensitization in animals and humans administered multiple doses of microbial products has long been recognized [36]. It was reported with OM-174 in preclinical studies. In the study by De Bono et al. [27], an increase in IL-1α, IL-6, and TNF-α concentration was observed whereas it was not the case with SDZ MRL 953 in the study by Kiani et al. [26]. Our study is in partial agreement with both studies as we observed an increase in TNF-α, IL-6, IL-8 and IL-10, but not in IL-1β or IL-12. This increase of secretion of TNF-α is in the same magnitude as that observed with ONO-4007 (1970 versus 1200 pg/ml), suggesting a similar biological activity and confirming that OM-174 activates the TLR4 receptor as has been demonstrated in preclinical models. The variations of cytokines secretion could be due to the dose (from 2 to 125 mg/patient), or administration schedules (every day for SDZ MRL 953, every week for ONO-4007) differences, between the three clinical assays. However, the best clinical tolerance of OM-174 makes it a drug of choice for clinical development.

Interestingly, our study also suggests that a sufficient number of OM-174 injections has to be administered to reach a biological activity since a trend toward an increase in NK cells number and activity was observed only in patients receiving 15 infusions. As only three patients received 15 infusions these findings deserve further studies to be confirmed.

As OM-174 has been shown, in mice, to induce TNF-α production via TLR4 receptors, a family of receptors which recognized pathogen-associated microbial structure and are involved in innate immune cell activation and antitumor immune response inducing tumor cell death [37], we search for possible mutations that may explain inter patient variability in terms of biological and clinical activities. Sixteen out of seventeen patients in our study carried the wild type suggesting that TLR4 responsiveness was unaltered in our population. Since no functional analysis was performed, we cannot formally rule-out a TLR4-mediated variability in clinical response, but in the absence of genomic variability this is unlikely to be the case. However, the finding of TNF secretion after administration of OM-174 in our study as has been observed in mice suggested that OM-174 activates TLR4 well.

We did not observed objective tumour responses, as it was the case in the Vosika [28] or de Bono [27] studies, but disease stabilisation occurred in 3 patients including 2 patients with colo-rectal carcinoma and one patient with non-small cell lung carcinoma. As disease stabilisation was observed at 3 different dose levels including three different doses and number of infusion, and as no patients were included in some dose levels, no trend can be suggested toward the most interesting dose level. Nevertheless, even if these stabilizers have no significant value, they deserve our interest on the mechanisms involved, including the induction of cytokine.

It has to be agreed that lipid A analogues, such as OM-174, do not appear very promising when used alone in cancer patients. Nevertheless our team has been working extensively in animal model and our knowledge of underlying mechanism or tumor growth inhibition

**Table 5 Characteristics of patients with stable disease**

| Nb of patients | Age (YEARS) | Sex | Previous lines of chemotherapy | DL | Type of cancer | Duration of stable disease (MONTHS) | Global survival (MONTHS) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Patient 9 | 60 | Male | 11 | 3 | rectum | 1 | 6 |
| Patient 12 | 62 | Male | 3 | 4 | colon | 9 | 19 |
| Patient 17 | 57 | Male | 4 | 8 | lung | 2 | 12 |

led us to assess the possible synergy of OM-174 with different drugs. Like this, we have shown (unpublished data) that whereas treatment by either oxaliplatin or OM-174 alone doesn't lead to regression of voluminous peritoneal tumors, induced in BDIX rats by intraperitoneal injection of syngeneic PROb colon cancer cells. Their combination induces the disappearance of carcinomatosis.

## Conclusion

We have shown that the lipid A analog, OM-174, administered twice weekly, for up to 15 injections and 1000 μg/m$^2$ offers a predictable and overall favourable safety profile and good tolerability at biologically active concentrations. Clinical and biological activities deserve further experiments, likely in conjunction with chemotherapy, as preclinical experiments conducted in our unit suggest that this combination might be synergistic. To confirm this hypothesis, we have designed a phase Ib study in association with a derivate of platine that will soon be enrolling patients.

### Competing interest

All the authors except Jacques Bauer declare that they have no competing interests. Jacques Bauer is an employee of OM-Pharma which has been integrated in Vifor Pharma in 2009.

### Authors' contributions

Conceived and designed: JB, JFJ, MB. Acquisition of data: NI, PF, SZ, MB. Analysis and interpretation of data: NI, PF, CP, KR, GL, JFJ, MB. Wrote the paper: NI, CP, JB, JFJ, MB. Read and approved the final version of the manuscript: NI, PF, CP, SZ, JB, KR, GL, JFJ, MB. All authors read and approved the final manuscript.

### Author details

[1]INSERM CIC-P803, CHU de Dijon, Batiment du Pr Marion, 14 rue Gaffarel, BP77908, 21079, Dijon Cedex, France. [2]Centre G-F Leclerc, 1 rue du Pr Marion, BP77980, 21079, Dijon Cedex, France. [3]Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 21000 Dijon, France. [4]EPHE, Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, 21000 Dijon, France. [5]Centre de Recherche INSERM U866, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France. [6]OM-Pharma, 1217 Geneva, Switzerland. [7]Service de Pharmacologie, 21000CHU, Dijon, France.

Received: 17 September 2012 Accepted: 19 March 2013
Published: 2 April 2013

### References

1. Becker N, Altenburg HP, Stegmaier C, Ziegler H: **Report on trends of incidence (1970-2002) of and mortality (1952-2002) from cancer in Germany.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2007, **133**:23–35.
2. Center MM, Jemal A, Ward E: **International trends in colorectal cancer incidence rates.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**:1688–1694.
3. Cress RD, Morris C, Ellison GL, Goodman MT: **Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ethnicity, 1992-2001.** *Cancer* 2006, **107**:1142–1152.
4. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Eheman C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I: **Seeff LC, van BM, Goede SL, Ries LA: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates.** *Cancer* 2010, **116**:544–573.
5. Karim-Kos HE, De VE, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW: **Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s.** *Eur J Cancer* 2008, **44**:1345–1389.
6. Heron M: **Deaths: leading causes for 2007.** *Natl Vital Stat Rep* 2011, **59**:1–95.
7. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: **Cancer statistics, 2010.** *CA Cancer J Clin* 2010, **60**:277–300.
8. Evans C, Dalgleish AG, Kumar D: **Review article: immune suppression and colorectal cancer.** *Aliment Pharmacol Ther* 2006, **24**:1163–1177.
9. Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, Moore JM, Vanoosten RL, Moses B, Leidal K, Nauseef WM, Griffith TS: **Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L.** *Blood* 2005, **106**:3474–3482.
10. Manegold C, Gravenor D, Woytowitz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, Al-Adhami M, Readett D, Krieg AM, Leichman CG: **Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:3979–3986.
11. Mauri D, Kamposioras K, Tsali L, Bristianou M, Valachis A, Karathanasi I, Georgiou C, Polyzos NP: **Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis.** *Cancer Treat Rev* 2010, **36**:69–74.
12. Keogh B, Parker AE: **Toll-like receptors as targets for immune disorders.** *Trends Pharmacol Sci* 2011, **32**:435–442.
13. Cluff CW: **Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results.** *Adv Exp Med Biol* 2009, **667**:111–123.
14. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA: **Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.** *Immunology* 2004, **113**:153–162.
15. Inagawa H, Nishizawa T, Noguchi K, Minamimura M, Takagi K, Goto S, Soma G, Mizuno D: **Anti-tumor effect of lipopolysaccharide by intradermal administration as a novel drug delivery system.** *Anticancer Res* 1997, **17**:2153–2158.
16. Jeannin JF, Onier N: **Lagadec P, von JN, Stutz P, Liehl E: Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat.** *Gastroenterology* 1991, **101**:726–733.
17. Onier N, Hilpert S, Arnould L, Saint-Giorgio V, Davies JG, Jeannin JF, Jeannin JF: **Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats.** *Clin Exp Metastasis* 1999, **17**:299–306.
18. Parr I, Wheeler E, Alexander P: **Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA.** *Br J Cancer* 1973, **27**:370–389.
19. Sassi N, Paul C, Martin A, Bettaieb A, Jeannin JF: **Lipid A induced response in vivo.** In *Lipid A in cancer therapy*. Springer edition. Edited by Jeannin J; 2010:69–80.
20. Blondiau C, Lagadec P, Lejeune P, Onier N, Cavaillon JM, Jeannin JF: **Correlation between the capacity to activate macrophages in vitro and the antitumor activity in vivo of lipopolysaccharides from different bacterial species.** *Immunobiology* 1994, **190**:243–254.
21. van de Wiel PA, van der PA, Bloksma N: **Role of tumour necrosis factor in the tumour-necrotizing activity of agents with diverging toxicity.** *Cancer Immunol Immunother* 1991, **33**:115–120.
22. Reisser D, Pance A, Jeannin JF: **Mechanisms of the antitumoral effect of lipid A.** *Bioessays* 2002, **24**:284–289.
23. Onier N, Lejeune P, Martin M, Hammann A, Bauer J, Hirt P, Lagadec P, Jeannin JF: **Involvement of T lymphocytes in curative effect of a new immunomodulator OM 163 on rat colon cancer metastases.** *Eur J Cancer* 1993, **29A**:2003–2009.
24. Shimizu T, Iida K, Iwamoto Y, Yanagihara Y, Ryoyama K, Asahara T, Ikeda K, Achiwa K: **Biological activities and antitumor effects of synthetic lipid A analog linked N-acylated serine.** *Int J Immunopharmacol* 1995, **17**:425–431.
25. D'Agostini C, Pica F, Febbraro G, Grelli S, Chiavaroli C, Garaci E: **Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions.** *Int Immunopharmacol* 2005, **5**:1205–1212.
26. Kiani A, Tschiersch A, Gaboriau E, Otto F, Seiz A, Knopf HP, Stutz P, Farber L, Haus U, Galanos C, Mertelsmann R, Engelhardt R: **Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients.** *Blood* 1997, **90**:1673–1683.
27. de Bono JS, Dalgleish AG, Carmichael J, Diffley J, Lofts FJ, Fyffe D, Ellard S, Gordon RJ, Brindley CJ, Evans TR: **Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**:397–405.

28. Vosika GJ, Barr C, Gilbertson D: **Phase-I study of intravenous modified lipid A.** *Cancer Immunol Immunother* 1984, **18**:107–112.
29. Rickham PP: **Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki.** *Br Med J* 1964, **2**:177.
30. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van GM, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG: **New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**:205–216.
31. Lirussi F, Rakotoniaina Z, Madani S, Goirand F, Breuiller-Fouche M, Leroy MJ, Sagot P, Morrison JJ, Dumas M, Bardou M: **ADRB3 adrenergic receptor is a key regulator of human myometrial apoptosis and inflammation during chorioamnionitis.** *Biol Reprod* 2008, **78**:497–505.
32. Prunet C, Montange T, Vejux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Neel D, Petit JM, Steinmetz E, Brenot R, Gambert P, Lizard G: **Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients.** *Cytometry A* 2006, **69**:359–373.
33. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P: **Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation.** *Kidney Int* 2005, **67**:2454–2461.
34. Ellegaard M, Bastholt L, Jakobsen A, Donskov F, Schmidt H: **Interleukin-2-induced fever in relation to objective tumor response and survival in patients with metastatic melanoma.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:15s.
35. Engelhardt R, Mackensen A, Galanos C: **Phase I trial of intravenously administered endotoxin (Salmonella abortus equi) in cancer patients.** *Cancer Res* 1991, **51**:2524–2530.
36. Rockwell C, Morison D, Qureshi N: **Lipid-A mediated tolerance and cancer therapy.** In *Lipid A in cancer therapy*. Edited by Jeannin J; 2010:81–99.
37. Garay RP, Viens P, Bauer J, Normier G, Bardou M, Jeannin JF, Chiavaroli C: **Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help.** *Eur J Pharmacol* 2007, **563**:1–17.

doi:10.1186/1471-2407-13-172
**Cite this article as:** Isambert *et al.*: Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 2013 **13**:172.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

# ANNEXE

**Neutrophils kill tumor cells via granzyme B in rat and mouse models of colon cancer**

Amandine Martin*[1], Cédric Seignez*[1], Alessandra Scagliarini[1], Cindy Godard[1], Nathalie Decologne[1], Nicolas Isambert[1,2], Sylvie Reveneau[1], Arlette Hammann[3], Amandine Bataille[4], Laurent Arnould[2], Ali Bettaieb[1], Jean-François Jeannin[1], Catherine Paul[1, 5]

**These authors contributed equally to this work.*

*[1]EPHE Cancer Immunotherapy Laboratory, Dijon, F-21000, France; EA7269 EPHE-University of burgundy, Dijon, F-21000, France; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France; [2]Centre GF Leclerc, Dijon, F-21000, France; [3]INSERM UMR 866 Dijon, F-21000, France; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France; [4]CellImaP SFR100 Santé STIC; University of Burgundy, Dijon, F-21000, France*

**Short title: Antitumor effect of neutrophils**

**[5] Corresponding author:**

Catherine Paul, EPHE-Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France.

Tel.: 33 3 80 39 34 19

Fax: 33 3 80 39 34 34

catherine.paul@u-bourgogne.fr

The authors have no conflicting financial interests.

This manuscript contains 3317 words.

**Abstract**

Neutrophils are known to promote tumor growth and progression. However recent data demonstrate that the composition of tumor microenvironment can modify the functional status of neutrophils. We explored the hypothesis that neutrophils, under an appropriate environment, could induce an effective response against tumor cells with a special focus on the role of granzyme B. In two models of rat and mouse colon cancer, the antitumor efficacy of a Lipid A was impaired when neutrophils were inhibited from infiltrating tumors. Granzyme B was expressed in tumor-associated neutrophils, a process dependent on the tumor microenvironment, and was released after Lipid A treatment leading to tumor cell death. Inhibition of granzyme B function in tumor cells decreased the anti-tumor effect of Lipid A. A cocktail of cytokines detected in the tumor microenvironment was demonstrated to trigger granzyme B expression in neutrophils from spleens of tumor-bearing animals. Importantly, neutrophils expressing granzyme B were also detected in tumors of patients with colon cancer. These results identify granzyme B-expressing neutrophils as a key driver of Lipid A-mediated colon cancer regression in rat and mouse models of colon cancer and the molecular mechanisms involved may provide novel approaches for human therapeutic intervention.

Keywords: Neutrophils, Granzyme B, Tumor, Immune response, Lipid A

## Introduction

A well-known example of cancer immunotherapy in use for more than 30 years is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy of non-invasive bladder carcinomas. This is currently the most effective immunotherapy for solid tumors [1]. The molecular mechanisms involved are likely dependent on the binding of BCG, an avirulent strain of *Mycobacterium bovis*, to the Toll-like receptors (TLR) 4 [2]. This TLR play a critical role in the activation of immune system by stimulating antigen uptake and presentation, maturation of dendritic cells (DC), differentiation of helper T cells, and inhibition of regulatory T cells [3].

TLR4 are the classic receptors of lipopolysaccharides (LPS) and lipid A molecules [4], the lipid part of LPS to which the anti-tumor activity of LPS was attributed [5]. However LPS and natural forms of lipid A are too toxic to be used in clinic. Lipid A analogs have been developed and some of them, like OM-174 (LipA), are well tolerated by patients [6] and effective against tumors in animal models. LipA is a triacyl diglucosamine diphosphate acting through TLR4 to induce total regression or growth inhibition of macroscopic tumors in rat and mouse models [7-9].

Immunotherapy results in tumor cell death. Granzymes, known to induce apoptosis, are the main mediators of cytotoxicity induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells [10,11]. Over the last decade, there were some controversy about granzymes A and B expression in other cell types like neutrophils. Some reports show that granzymes are constitutively expressed in human blood neutrophils [12,13] or transformed neutrophils in culture [14], while others indicate that granzymes are not at all expressed in neutrophils [15,16]. The same controversy was extended to granzyme expression in mouse neutrophils [17]. Granzyme B (GZMB) expression in tumor neutrophils has not been studied. Even though neutrophils are known to support tumor growth by producing angiogenic factors like matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor [18], recent data demonstrate that the microenvironment can alter neutrophil activity. For example, blocking transforming growth factor beta (TGF-β1) induced the switch of neutrophils from a pro-tumorigenic (N2) to an anti-tumorigenic (N1) state [19] .

As neutrophils have been implicated in the mechanism of action of BCG immunotherapy [20-22], we sought to elucidate their role in LipA immunotherapy in rat and mouse models of colon cancer and we checked that human neutrophil exhibited the same properties.

## Methods

**Animal tumor models.** BD-IX rats, 2-3 month-old males, and Balb/C mice, 6-8 week-old females, were purchased from Charles River Laboratory (L'Arbresle). Carcinomatosis in BD-IX rats was initiated by i.p. injection of colon cancer cells PROb [23,24]. As previously described [8], the treatment began at day 14 and consisted of 15 i.v. injections of LipA at 1 mg/kg or of physiological solution (in control rats), at the rate of 3 injections per week. Tumors in Balb/C mice were initiated by s.c. injection of $5.10^5$ CT26 cells. The treatment began at day 3 and consisted of 5 i.v. injections of LipA at 8 mg/kg or physiological solution (in control mice) every 5 day. Inhibitors of neutrophils, SB225002 (Tocris Bioscience) and Ly6G antibodies (BioXCell) were injected i.p. at respectively 4 and 5 mg/kg the day before and at the same time that LipA injections. The studies were reviewed and approved by the Burgundy University ethics committee for animal experimentation.

**Lipid A analog. OM-174 (**OM-Pharma, Meyrin, Switzerland), is a 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2-[(R)-3-dodecanoyloxytetra decanoylamino]-4-O-phospho-β-D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytetradecanoylamino]-α-D-glycopyranosyl dihydrogenphosphate.

**Antibodies and reagents.** See supplementary Material and methods.

**Detection of CXCL1 and CXCL2 by Ab array.** Tumors were harvested, lysed in lysis buffer [25] and an equal amounts of proteins (Dc Protein Assay kit (BioRad) were incubated with rat cytokine array membranes (R&D Systems). The revelation was performed according to the manufacturer's protocol and optical density was measured with ImageJ software.

**RT-PCR.** Total RNA was extracted from tumors using the RNeasy kit (Qiagen). RT-PCR were performed with the Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The primer list was in supplementary Material and methods. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis (1.5% agarose) and stained with ethidium bromide (Invitrogen). The amplified cDNA length was evaluated using the 100-bp DNA ladder (Promega). All densitometric analyses were performed with ImageJ software.

**ELISA.** Granzyme B concentrations in spleen neutrophil supernatants were detected by ELISA (Uscn Life Science Inc) according to the manufacturer's protocol. Absorbance was read on a spectrophotometer (Asys UVM 340) at 450 nm wavelength.

**Histopathology.** Paraffin-embedded samples were cut into 5 µm thick. Sections were deparaffined, rehydrated and stained with hematoxylin-eosinY (HE) or May-Grünwald Giemsa (MGG).

**Immunohistofluorescence (IHF) and immunofluorescence (IF).** For IHF, fixed tumors were embedded in *OCT* (Labonord) after impregnation with 20% sucrose/PBS. Sections were cut into 5 µm thick and fixed for 10 min in cold acetone. Antigen retrieval was performed (citrate buffer pH 7.3, 96°C, 20 min) before the blocking of nonspecific sites with 3% BSA. For IF, neutrophils ($10^4$) were plated in Lab-Tek II (Nalge Nunc), fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.2% Triton X-100 and incubated with 3% BSA. Slides for IHF and IF were incubated with primary antibodies in 1% BSA/PBS/0.1% Tween, then with appropriate secondary antibodies in 1% BSA/PBS/0.1% Tween. Slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen). Images from rat or mouse colon cancer were captured on a Nikon Eclipse E400 epifluorescent microscope at 40x magnification, images from human colon cancer were captured on a Axio Imager 2 microscope with Axiovision software.

**Apoptotic cell detection.** Apoptotic cells were detected by TUNEL kit (Millipore) according to the manufacturer's protocol.

**Neutrophil isolation and culture**. Neutrophils were purified from spleens removing of red blood cells by osmotic lysis and purification with Ab-anti HIS48 coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec, France). Neutrophils (98% purity) were cultivated in Ham's F-10 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza). Neutrophils were pretreated for 18 h with 1 ng/mL recombinant IL-2, 1 ng/mL IL-12, 100 ng/mL IL-21 and 250 U/mL IFN-γ before treatment for 6 h with or without 10 µg/mL OM-174.

**Methylene blue toxicity assays.** After 24 h the supernatants from the above neutrophil cultures were collected and added to $2 \times 10^4$ PROb cells that were then treated with or without 50 µM GZMB inhibitor-1 in 96-well microplates for 24 h. The cytotoxicity of neutrophil conditioned media to PROb cells was evaluated using the methylene blue assay as previously described [7].

**Statistical analyses.** Experimental data are expressed as means ± SEM. Statistical analysis was performed using StatView software. The Mann-Whitney *U* test was used to compare data

between two treatment groups. Differences were considered statistically significant as follows: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; and ***, $P \leq 0.005$.

## Results

**The antitumor effect of the LipA treatment requires the infiltration of tumors by neutrophils.** The LipA treatment induced the regression of tumors and cured 95% of tumor-bearing rats (Figure 1*A*). Typical structures of tumors after the second injection of physiological solution (control) or LipA are shown after hematoxylin-eosin Y (HE) staining (Figure 1*B*). Both types of tumors consisted of core of tumor cells surrounded by a distinct ring of non-tumor cells at the edges of nodules. However, in treated tumors, this ring was thicker than in control tumors (Figure *1C*) and the number of tumor cells decreased drastically (Figure1*D*). We analyzed the cytokine and chemokine contents of tumors using antibody arrays. The largest differences in tumors from treated compared to control rats were detected after the second injection when CXCL1 and CXCL2 were significantly higher (approximately five-fold) in treated rats (Figure 2*A*). In agreement tumor *cxcl1* and *cxcl2* mRNA levels were higher after the first injection of LipA compared to control rats (Figure 2*B*). As a consequence, tumors isolated from treated rats contained many more neutrophils than tumors from control rats (Figure 2*C* and 2*D*). In agreement, specific neutrophil mRNA transcripts (*ncf1* and *ncf2*) were higher in treated rats compared to control rats (Figure 2*E*). However neutrophils remained at the edges of tumor nodules in control rats whereas they infiltrated the entire nodule after LipA treatment (Figure 2*C*). Moreover the antitumor effect of LipA in a mouse model of subcutaneous colon cancer was drastically decreased by inhibition of neutrophil recruitment using a CXCR2 antagonist (Figure 2*F*) or LY6G antibody (data not shown).

**Apoptotic tumor cells are in the vicinity of anti-tumorigenic neutrophils in LipA treated rats.** By TUNEL analysis, we found that apoptotic death occurred in cells that were located in the core of treated tumors (Figure 3*A*). We confirmed by immunostaining that most apoptotic cells containing cleaved caspase 3 in treated rats were tumor cells (Figure 3*B*). Moreover, double immunostaining of neutrophils and M30 (a marker of apoptotic epithelial cells) demonstrates that in treated tumors the death of tumor cells occurred near neutrophils (Figure 3*C*). On the contrary, apoptosis was not detected in control tumors in which neutrophils were at the edges of

tumors, distant from tumor cells, and presented a pro-tumorigenic phenotype (N2 state) (Figure 2*C* and Figure 3*D*,*E*). Moreover, analysis of neutrophil activation states showed that LipA induced the acquisition of an anti-tumorigenic phenotype by neutrophils (N1 state) with iNOS expression and low arginase-1 content (Figure 3*D*,*E*).

**The antitumor effect of the LipA treatment requires the transfer of GZMB into tumor cells.** GZMB was particularly detected in tumors from treated rats than from control rats. Strikingly, GZMB staining was observed only at the edge of tumor sections from control rats, but throughout the whole tumor sections from treated rats (Figure 4*A*) while the presence of GZMB was associated with neutrophils in both treated and control tumors. Moreover, GZMB was found inside tumor cells from treated rats, but not from control rats (Figure 4*B*). Further, double immunostaining of GZMB and M30 demonstrates that apoptotic tumor cells in treated rats contained GZMB (Figure 4*C*). Taken together, these data suggest that GZMB contributed to tumor cell apoptosis in LipA treated rats. Some other cells were known to express GZMB like NK cells and T lymphocytes (αβ and γδ). However these cells were present only at the edges of the tumors, none were detected in the core of tumors from control or treated rats (Supplementary Figure 1*A*, *B*, *C*). As we showed that tumor cells were located (Figure 1*C*) and died (Figure 3*A*, *B*, *C*) in the core of tumor nodules, we deduced that the latter cell types were not involved in tumor cell death in LipA immunotherapy, at least at the beginning of treatment.

Conditioned media of spleen neutrophils from control rats were not cytotoxic (Figure 5*A*) and contained less than 5 pg of GZMB/ml (Figure 5*B*). GZMB was undetectable in these neutrophils by immunostaining (Figure 5*C*, *two upper panels*). However, conditioned media from neutrophils treated with LipA in vitro were significantly more cytotoxic causing a 40% decrease in the number of adherent tumor cells (Figure 5*A*). They contained six-fold more GZMB than untreated cells (Figure 5*B*, *left*). GZMB was also detected in these neutrophils by immunostaining (Figure 5*C*, *two lower panels*). The cytotoxic effect of conditioned media of LipA treated neutrophils was dependent on GZMB as it was abrogated in the presence of a GZMB inhibitor (Figure 5*A*).

Conditioned media of spleen neutrophils from treated rats were 20% more cytotoxic (Figure 5*A*) and contained four-fold more GZMB than spleen neutrophils from control rats (Fig. 5B). When these neutrophils were further treated with LipA in vitro, conditioned media showed 40% cytotoxicity (Figure 5*A*) and contained twice amount of GZMB (Figure 5*B*, *right*). As previously seen, cytotoxicity was abrogated in the presence of the GZMB inhibitor (Figure 5*A*).

Moreover antitumor effect of LipA in mice was highly abrogated by inhibition of granzyme B cytotoxicity with overexpression of serpin B9 in tumor cells (Figure 5*D*).

**Tumor microenvironment induces granzyme B expression in neutrophils.** Cytokines like IL-2, IL-12, IL-21 and IFN-γ were known to play a key role in GZMB production in lymphocytes or NK cells. Different expression patterns of these cytokines were observed in vivo between tumors and spleens in control rats. IL-21 was expressed at similar levels in tumors and spleens. IL-12 mRNA levels were lower whereas IL-2 and IFN-γ mRNA levels were higher in tumors than in spleens (Figure 6*A*). Treatment of spleen neutrophils from control rats with an interleukin mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21), IFN-γ or ILs plus IFN-γ induced the production of GZMB by neutrophils (Figure 6*B*, *white bars*). As previously observed (Figure 5*B*, *C*) in the presence of LipA, significant levels of GZMB were produced. While ILs alone or IFN-γ alone did not enhance the effect of LipA, the combination enhanced the GZMB production induced by LipA (Figure 6*B*, *grey bars*).

Moreover GZMB expression by neutrophils was further extended at humans (Figure 7), showing that tumor neutrophils from different species expressed GZMB.

## Discussion

Here we have demonstrated that GZMB from neutrophils plays an active role in the regression of tumors due to a lipid A analog in models of colon cancer in rat and mouse.

Neutrophils are rarely the focus of research on tumor development or tumor therapies. But given that neutrophils express CXCR1 and CXCR2 at their surface and are recruited by their ligands including CXCL-1 and CXCL-2 [26] which can be produced by tumor or endothelial cells or fibroblasts [27], and that CXCL1 and CXCL2 contribute to mobilizing neutrophils from bone marrow and sustain neutrophil recruitment at sites of inflammation [28-30], it was conceivable that neutrophils can be attracted to tumors in this way. We have demonstrated here that the anti-tumoral effect of LipA was associated with a strong increase in CXCL1 and CXCL2 levels in tumors, concomitant with an infiltration of tumors by neutrophils. The expression of CXCL1 and CXCL2 in human colon tumors has been described [31,32] and there is a report that CXCL1 is highly expressed in poor invasive tumors [33]. However descriptions of neutrophils in

human colon cancer are few [34] without significant correlation with prognosis. As far as we know there has been no correlation made between CXCL1, CXCL2 or neutrophils with the effects of therapy on colon cancer in human. It has been shown that CpG oligodeoxynucleotides and a vascular disrupting agent induced the regression of colon tumors in mice, and this correlates with an increase in CXCL1 and neutrophil infiltration in tumors [35,36]. Furthermore, colon tumor bearing mice receiving cyclophosphamide plus IL-12 gene therapy are more likely to reject tumors when infiltrated by neutrophils [37]. It is therefore coherent that increased recruitment of neutrophils in treated tumors could be due to CXCL1 and CXCL2. Such an effect has been reported in lungs of mice that have inhaled LPS [38].

Important question was: are neutrophils involved in the anti-tumor effect of LipA? Inhibition of neutrophil recruitment with CXCR2 antagonist or LY6G antibody (data not shown) caused a drastic decrease in LipA antitumor activity showing that neutrophils were implied in the treatment.

In treated tumors we found neutrophils in the vicinity of apoptotic tumor cells. Apoptotic tumor cells were detected only in treated tumors, but LipA was not directly toxic to tumor cells. Knowing that apoptosis can be induced either by granzymes, or by death effectors, like FasL [10,39], we sought to ascertain whether neutrophils killed tumor cells via granzyme action. Supporting evidence for this, in rat like in mouse models (data not shown), is that neutrophils and GZMB were located throughout treated nodules, neutrophils and tumor cells contained GZMB, and tumor cells that contained GZMB were dying by apoptosis. Moreover strong demonstration that GZMB was engaged in the antitumor effect of LipA was its abrogation by inhibiting GZMB cytotoxicity through overexpression of serpin B9 in tumor cells.

We noted that GZMB was spontaneously produced in tumors, whether or not the rats were treated with LipA. Moreover GZMB expression was further extended at mice and humans showing that tumor environment induced infiltrating neutrophils from rat, mice and humans to express GZMB.

The distance between GZMB and target cells might be important in regulating cytotoxicity. In control tumors, GZMB was found associated with neutrophils at the edges of nodules while in treated regressing tumors, GZMB and neutrophil densities increased throughout nodules and was found associated with neutrophils and dying tumor cells. Induction of apoptosis by GZMB needs this transfer into tumor cells. As we checked that PROb tumor cells did not produce GZMB either in vivo or in vitro, whatever the treatment (data not shown) and as neutrophils were the only GZMB producer in the vicinity of tumor cells, we deduce that neutrophils were the main, if not the only cells, able to kill tumor cells via GZMB. This result

also highlights the importance of the spatial control of activated neutrophil infiltration into the tumor core in determining the efficacy of LipA tumor therapy.

The influence of the tumor environment might explain why GZMB is produced in neutrophils from control tumors. Little is known about how rat neutrophils are activated to secrete GZMB. NK cells are known to produce GZMB when stimulated with IL-2 and IL-12 in humans, plus IL-21 in mice [40-42]. Here we compared the expression of cytokines in spleens and tumors of control rats. Although varying in concentration, IL-2, IL-12 and IL-21 (ILs) were all expressed in control tumors. So, we tested their combined effect on spleen neutrophils from control tumor bearing rats. These cells were stimulated to produce GZMB in vitro by ILs alone, IFN-γ alone, and ILs plus IFN-γ. We can conclude that tumor microenvironment was able to induce the production of GZMB by neutrophils and that LipA was able to increase this production.

It has been proposed that tumor associated neutrophils (TAN) can be classified into two phenotypes depending on their activation state [19]: type 1 anti-tumorigenic ($iNOS^{+}$, $Arg\text{-}1^{low}$), cytotoxic towards tumor cells in vitro and type 2 pro-tumorigenic ($iNOS^{-}$, $Arg\text{-}1^{high}$). In our model TAN from control rats fit the type 2 while TAN from LipA treated rats resemble type 1. Moreover bone marrow, blood and spleen neutrophils correspond to type 2 when from control rats and to type 1 when from treated rats (data not shown). Since LipA reaches the bone marrow of treated rats (data not shown), we supposed that differentiation from type 2 to type 1 probably occurs in bone marrow and not in the tumor itself. Rather type 1 (treated rats) or type 2 (control rats) neutrophils go on to infiltrate the tumors. There, the microenvironment: cytokines plus LipA for type 1 and cytokines for type 2 neutrophils, induces their differentiation to express GZMB. This defines N1 $GZMB^{+}$ ($iNOS^{+}$, $Arg\text{-}1^{low}$, $GZMB^{+}$) and N2 $GZMB^{+}$ ($iNOS^{-}$, $Arg\text{-}1^{high}$, $GZMB^{+}$) tumor associated neutrophils.

Overall, we provide strong evidence for the involvement of GZMB produced by neutrophils in immuno-induced tumor regression, widening the field of tumor immunotherapy mechanisms.

**Acknowledgments**

We thank Valérie Saint-Giorgio for her expert technical assistance.

Financial support: this work was partially supported by grants from Conseil Régional de Bourgogne (Bourgogne Technologies no. 610 002 51 and n° 2008 9201CPERO 002S00431) and from Ligue Contre le Cancer, comité Grand Est. AM was supported by a grant from EPHE, CS by a grant from Conseil Régional de Bourgogne and AS by a grant from INCA.

**Author contributions**

AM and CS conceived and carried out experiments and analysed data, AS carried out experiments, analysed data and discussed data, CG, ND, SR, AH, AB, LA, NI analysed data, AB discussed data, JFJ conceived experiments, prepared and edited the manuscript, CP conceived experiments, interpreted data, prepared and edited the manuscript, coordinated the experiments, all authors had final approval of manuscipt.

The authors have no conflicting financial interests.

## References


1. Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; **168**: 1964-1970.
2. Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK*, et al.* TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J Leukoc Biol* 2003; **74**: 277-286.
3. Wang RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene* 2008; **27**: 181-189.
4. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T*, et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; **11**: 443-451.
5. Parr I, Wheeler E, Alexander P. Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA. *Br J Cancer* 1973; **27**: 370-389.
6. Isambert N, Fumoleau P, Paul C*, et al.* Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 2013; **13**: 172.
7. Gautier T, Paul C, Deckert V*, et al.* Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J* 2010; **24**: 3544-3554.
8. Onier N, Hilpert S, Arnould L*, et al.* Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clin Exp Metastasis* 1999; **17**: 299-306.
9. Onier N, Hilpert S, Reveneau S*, et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int J Cancer* 1999; **81**: 755-760.
10. Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev* 2010; **235**: 105-116.
11. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 251-262.
12. Hochegger K, Eller P, Rosenkranz AR. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in innate immunity? *Blood* 2004; **103**: 1176.
13. Wagner C, Iking-Konert C, Denefleh B*, et al.* Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004; **103**: 1099-1104.
14. Wagner C, Stegmaier S, Hänsch GM. Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haemotopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol* 2008; **45**: 1761-1766.
15. Grossman WJ, Ley TJ. Granzymes A and B are not expressed in human neutrophils. *Blood* 2004; **104**: 906-907; author reply 907-908.
16. Metkar SS, Froelich CJ. Human neutrophils lack granzyme A, granzyme B, and perforin. *Blood* 2004; **104**: 905-906; author reply 907-908.
17. Martin P, Wallich R, Pardo J*, et al.* Quiescent and activated mouse granulocytes do not express granzyme A and B or perforin: similarities or differences with human polymorphonuclear leukocytes? *Blood* 2005; **106**: 2871-2878.
18. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 12493-12498.

19. Fridlender ZG, Sun J, Kim S*, et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009; **16**: 183-194.
20. Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK*, et al.* Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 2005; **106**: 3474-3482.
21. Rosevear HM, Lightfoot AJ, O'Donnell MA*, et al.* The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* 2009; **28**: 345-353.
22. Suttmann H, Riemensberger J, Bentien G*, et al.* Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* 2006; **66**: 8250-8257.
23. Jeannin JF, Onier N, Lagadec P*, et al.* Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology* 1991; **101**: 726-733.
24. Martin F, Caignard A, Jeannin JF*, et al.* Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer* 1983; **32**: 623-627.
25. Leon-Bollotte L, Subramaniam S, Cauvard O*, et al.* S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* 2011; **140**: 2009-2018, 2018.e2001-2004.
26. Mantovani A, Savino B, Locati M*, et al.* The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**: 27-39.
27. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 2010; **16**: 133-144.
28. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A*, et al.* Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol* 2004; **75**: 641-648.
29. Rittner HL, Mousa SA, Labuz D*, et al.* Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 1022-1032.
30. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC*, et al.* The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 2008; **111**: 42-49.
31. McLean MH, Murray GI, Stewart KN*, et al.* The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One* 2011; **6**: e15366.
32. Wen Y, Giardina SF, Hamming D*, et al.* GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 5951-5959.
33. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW*, et al.* Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 437-443.
34. Roxburgh CS, Wallace AM, Guthrie GK*, et al.* Comparison of the prognostic value of tumour- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative surgery for colon cancer. *Colorectal Dis* 2010; **12**: 987-994.
35. Sharma S, Karakousis CP, Takita H*, et al.* Cytokines and chemokines are expressed at different levels in small and large murine colon-26 tumors following intratumoral injections of CpG ODN. *Neoplasia* 2004; **6**: 523-528.
36. Wang LC, Thomsen L, Sutherland R*, et al.* Neutrophil influx and chemokine production during the early phases of the antitumor response to the vascular disrupting agent DMXAA (ASA404). *Neoplasia* 2009; **11**: 793-803.

37. Medina-Echeverz J, Fioravanti J, Zabala M*, et al.* Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol* 2011; **186**: 807-815.
38. Reutershan J, Basit A, Galkina EV*, et al.* Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; **289**: L807-815.
39. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009; **23**: 1625-1637.
40. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ*, et al.* IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 2004; **172**: 2048-2058.
41. Fehniger TA, Cai SF, Cao X*, et al.* Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 2007; **26**: 798-811.
42. Zhang B, Zhang J, Tian Z. Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFNalpha on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**: 989-996.

**Figure 1**

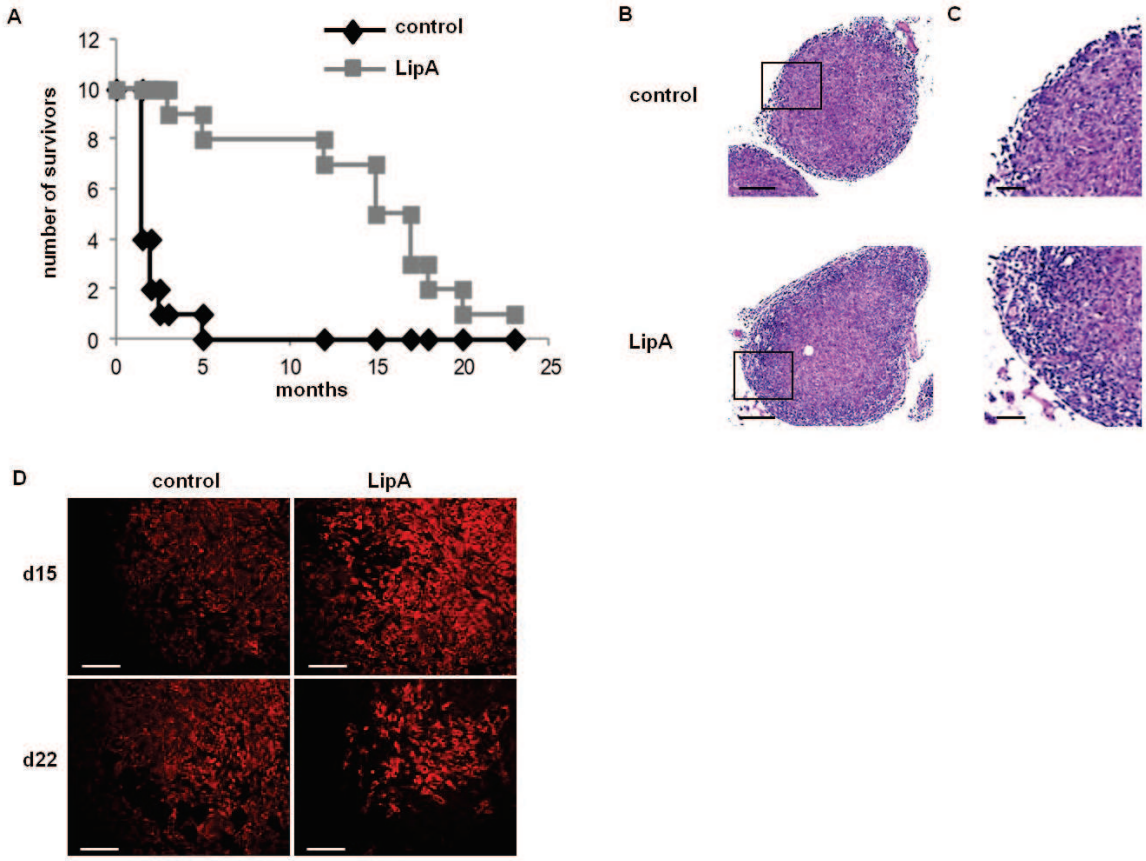

A
control
LipA
number of survivors
months
B
C
control
LipA
D
control
LipA
d15
d22

**Figure 2**

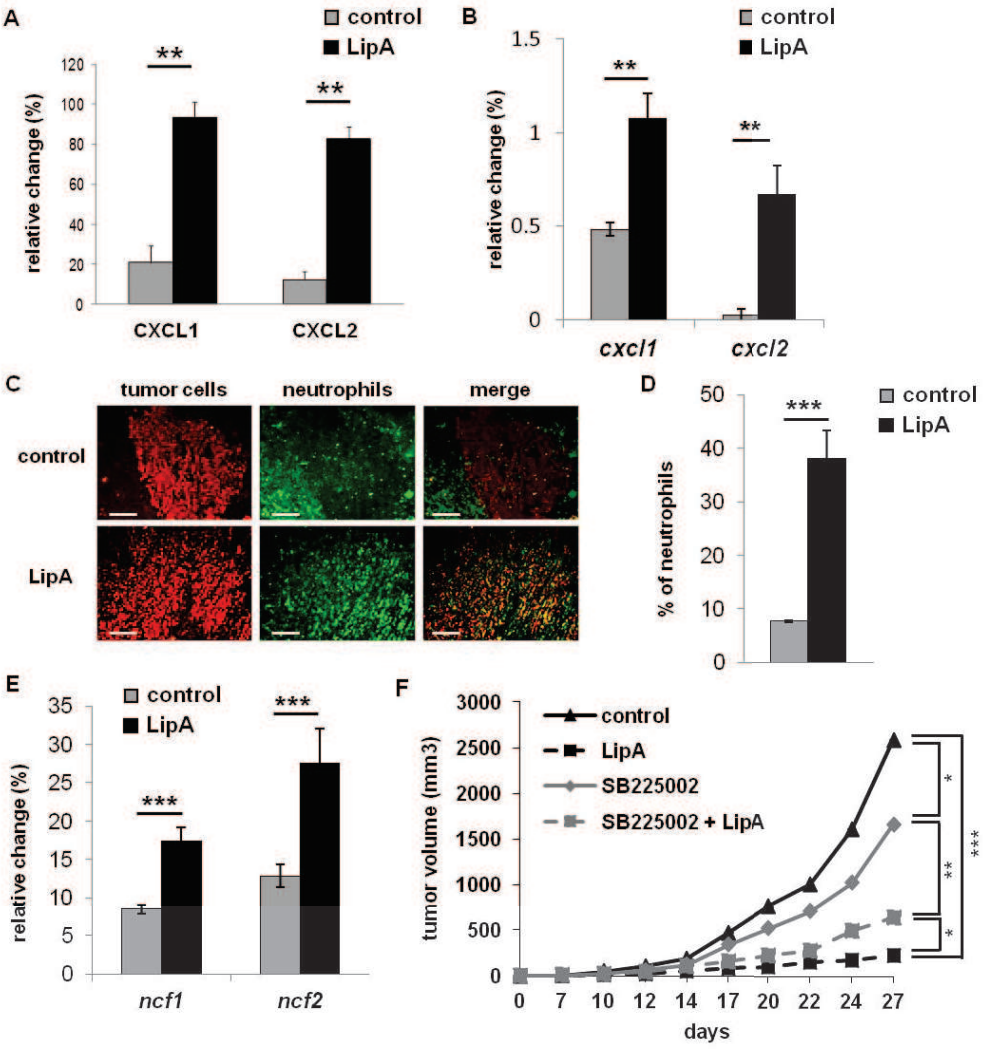
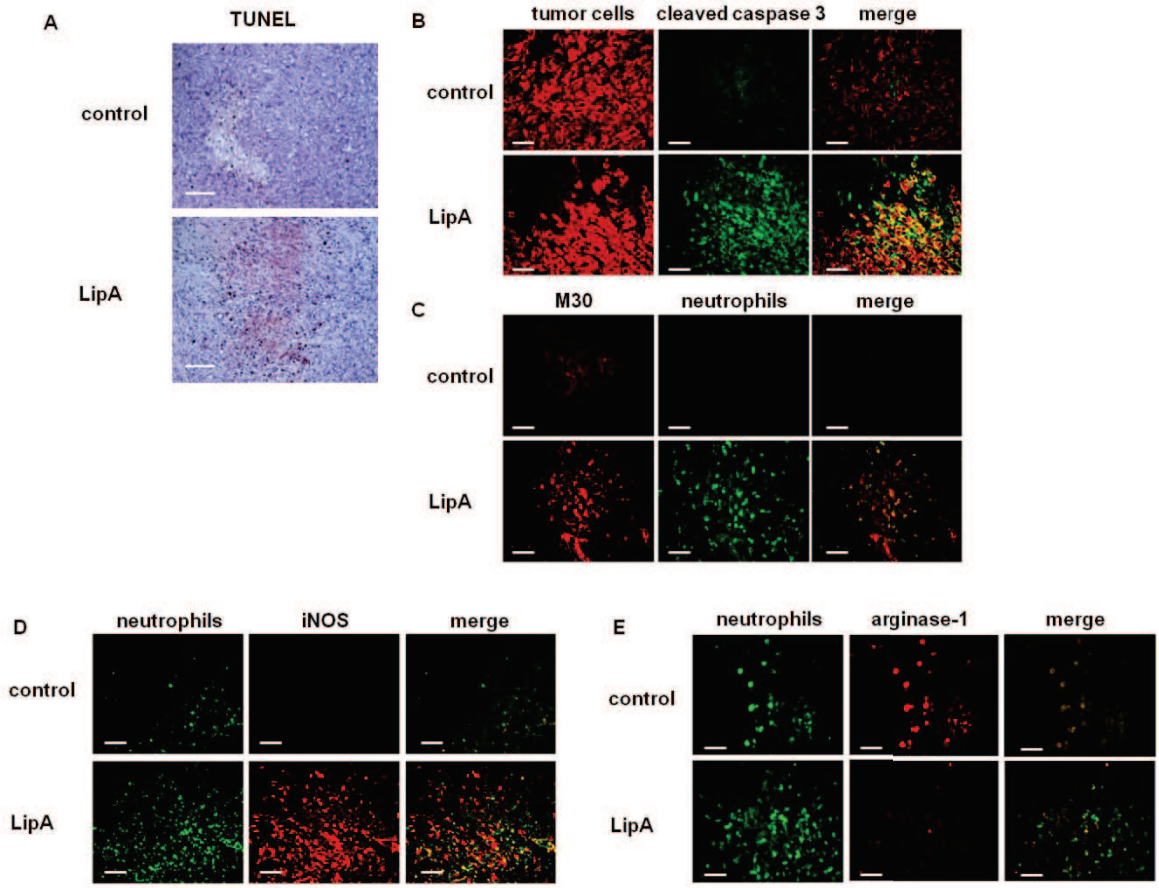

A
control
LipA
relative change (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
CXCL1
CXCL2
B
control
LipA
relative change (%)
1.5
1
0.5
0
**
**
cxcl1
cxcl2
C
tumor cells
neutrophils
merge
control
LipA
D
control
LipA
% of neutrophils
50
40
30
20
10
0
***
E
control
LipA
relative change (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
***
***
ncf1
ncf2
F
control
LipA
SB225002
SB225002 + LipA
tumor volume (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 7 10 12 14 17 20 22 24 27
days
*
**
***

**Figure 3**


A
TUNEL
control
LipA
B
tumor cells
cleaved caspase 3
merge
control
LipA
C
M30
neutrophils
merge
control
LipA
D
neutrophils
iNOS
merge
control
LipA
E
neutrophils
arginase-1
merge
control
LipA

## Figure 4

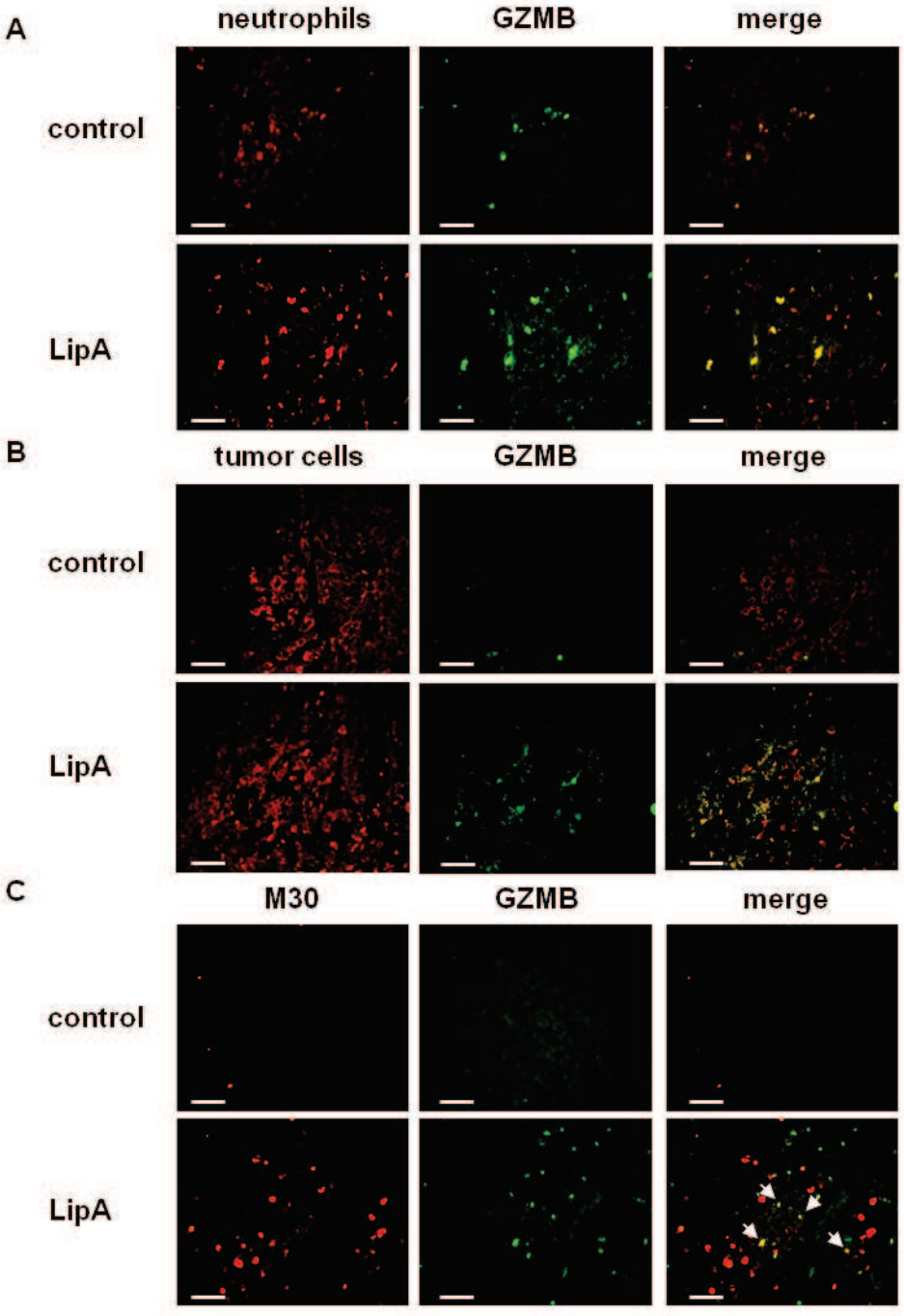

A
neutrophils
GZMB
merge
control
LipA
B
tumor cells
GZMB
merge
control
LipA
C
M30
GZMB
merge
control
LipA

**Figure 5**

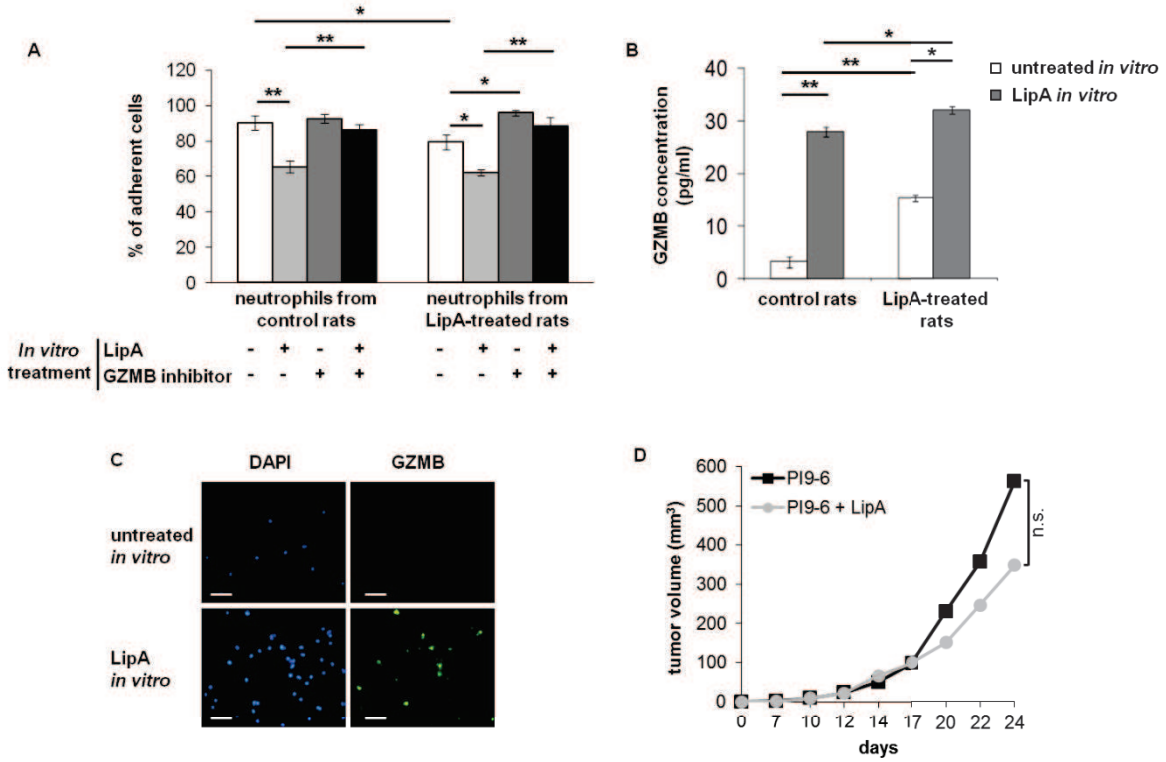

A
% of adherent cells
120
100
80
60
40
20
0
neutrophils from control rats
neutrophils from LipA-treated rats
In vitro treatment
LipA
GZMB inhibitor
B
GZMB concentration (pg/ml)
40
30
20
10
0
control rats
LipA-treated rats
untreated in vitro
LipA in vitro
C
DAPI
GZMB
untreated in vitro
LipA in vitro
D
tumor volume (mm³)
600
500
400
300
200
100
0
0 7 10 12 14 17 20 22 24
days
PI9-6
PI9-6 + LipA
n.s.

**Figure 6**

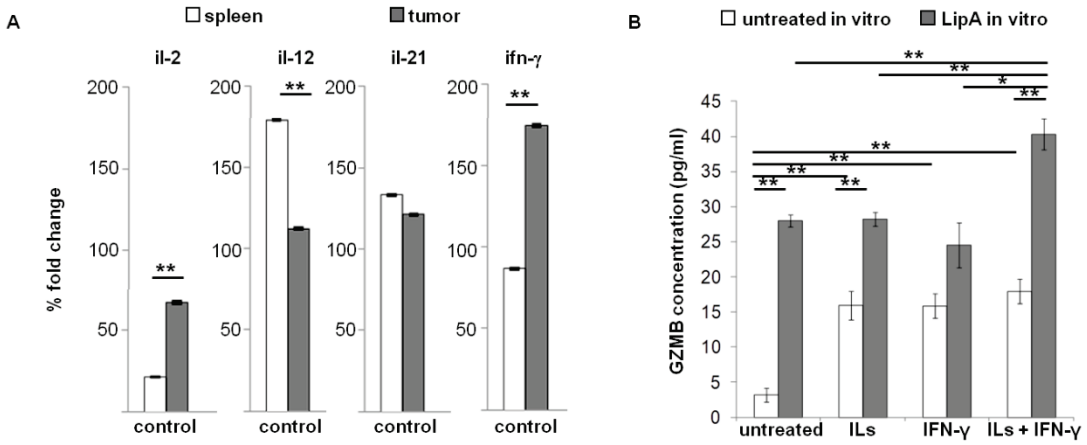



**Figure 7**

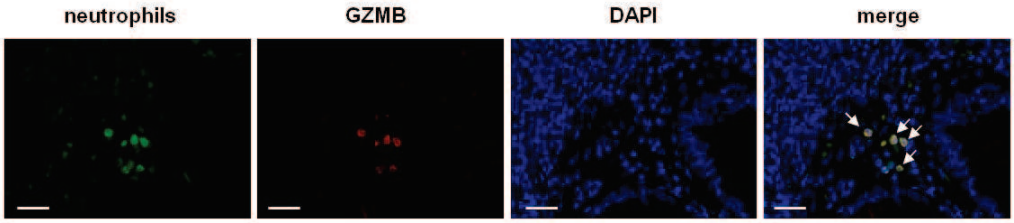


**Figure legends**

**Figure 1.**

**LipA cured tumor-bearing rats.** (**A**) The lifespan of tumor-bearing rats was improved by LipA treatment. Fourteen days after i.p. injection of PROb cells, rats were treated i.v. with LipA (grey) or physiological solution (control, black) 3 times per week for 5 weeks. Results are representative of at least 3 independent experiments with 10 animals per group. (**B**) Hematoxylin-eosin staining of tumors from LipA treated or control rats (scale bars = 200 μm). (**C**) Enlargement of regions outlined in figure B (scale bars = 50 μm). The tumor core and surrounding ring of cells can be distinguished. (**D**) Tumor regression was analyzed by immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red), one day after the first (day 15) and the fourth injection (day 22) of LipA or physiological solution (scale bars = 50 μm). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group.

**Figure 2.**

**Anti-tumor effect of LipA was dependent of neutrophil infiltration.** (**A**) Twenty four hours after the second injection of LipA, the chemokine content of tumors from control or LipA treated rats were analyzed using antibody arrays. The relative abundance of CXCL1 and CXCL2 was determined using Image J software and expressed as a percentage compared to an internal control (100%). (**B**) Six hours after the first injection of LipA or physiological solution (control), expression levels of cxcl1 and cxcl2 mRNA in tumors were evaluated relative to housekeeping gene gapdh by RT-PCR. (**C**) Tumors were collected at day 17 from LipA treated or control rats. After fixation, 5-μm sections were cut and stained for tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) (scale bars = 50 μm). The yellow staining in the merge panels represents tumor cells very close to neutrophils. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group. (**D**) The levels of neutrophils present in tumors were determined by counting of these cells in 3 independent slides per animals, 4 animals per group. Shown are the mean % of neutrophils ± SEM. (**E)** At day 17, expression levels of ncf1 and ncf2 mRNA were evaluated relative to housekeeping gene gapdh by RT-PCR. (**F**) CT26-bearing mice were treated with physiological solution (control, black line), LipA (black hatched line), SB225002 (grey line) or SB225002 + LipA (grey hatched line). Three days after cell injection, LipA was administered i.v. every 5 days for 5 times. SB225002 was injected i.p. 24 h before and at the same time than LipA. Results are representative of at least 2 independent

experiments with 10 animals per group. (**A**, **B, D, E and F**) Significant difference in Mann-Whitney U test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005.

**Figure 3.**

**LipA treatment induced tumor cell death in the vicinity of infiltrated anti-tumorigenic neutrophils.** Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17, fixed and cut into 5-µm cryosections. (**A**) Apoptotic cells were present in the core of tumors from LipA treated rats but not in tumors from control rats (TUNEL, red). (**B**) Immunostaining of tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red) and cleaved caspase 3 (anti-cleaved caspase 3 Ab, green). (**C**) Immunotaining of apoptotic tumor cells (M30 Ab, red) and neutrophils (anti-HIS48 antibody, green). (**D and E**) Staining for neutrophils (anti-HIS48 Ab, green) and (**D**) iNOS (anti-iNOS Ab, red) or (**E**) arginase-1 (anti-arginase-1 Ab, red). Yellow fluorescence in merge panels is where red and green fluorescences coincide. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 µm).

**Figure 4.**

**Granzyme B was present in neutrophils and apoptotic tumor cells in LipA treated rats.** Tumors were removed at day 17 and 5-µm cryosections were stained for neutrophils (anti-HIS48 Ab, red (**A**)), tumor cells (anti-cytokeratin Ab, red (**B**)), or apoptotic tumor cells (anti-M30 Ab, red (**C**)) and GZMB (anti-GZMB Ab, green (**A, B** and **C**)). Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 µm).

**Figure 5.**

**LipA induced neutrophil-mediated cytotoxicity via granzyme B production.** (**A, B, C**) Spleen neutrophils from LipA treated or control rats were purified and treated in vitro with or without 10 µg/ml LipA for 24 h (see Material and methods) (A)The toxic effect of conditioned media on tumor target cells cultured in the presence or in the absence of GZMB inhibitor was evaluated using a methylene blue assay. The mean numbers of adherent cells are shown as percentages of the untreated cells (100%). (**B**) The concentration of GZMB in conditioned media was measured by ELISA. Shown are means ± SEM. (**C**) Neutrophils were incubated or not with LipA (24h) and stained for granzyme B (green) or DAPI (blue). 3 independent experiments. (**D**)

Three days after s.c. injection of PI9-6 cells, mice were treated i.v. with LipA (grey) or physiological solution (control, black) every 5 days for 5 times. Results are representative of at least 2 independent experiments with 10 animals per group. (**A, B** and **D**) Significant difference in Mann-Whitney *U* test, *p<0.05, **p<0.01, n.s. not significant.

**Figure 6.**

**Tumor cytokines and LipA together induced strong expression of granzyme B in spleen neutrophils**. (**A**) Spleens and tumors from control rats were removed at day 17. Expression levels of *il-2*, *il-12*, *il-21* and *ifn-γ* mRNA were evaluated by RT-PCR and expressed as the mean of percentage of change compared to the level of *gapdh* expression. (**B**) Neutrophils from spleen were purified as in Figure 5 and incubated for 24 h *in vitro* without or with a cytokine mix (ILs, IL-2 + IL-12 + IL-21) alone, IFN-γ alone or a combination of both (ILs + IFN-γ), with or without of 10 μg/ml LipA for 6 h. Concentration of granzyme B (GZMB) in conditioned media was measured by ELISA. Shown are means ± SEM. 3 independent experiments. (**A** and **B**) Significant difference in Mann-Whitney *U* test, *p<0.05, **p<0.01.

**Figure 7.**

**Granzyme B was also expressed in human tumor neutrophils.** Human colon cancer samples were collected and stained for neutrophils (anti-CD66b, green), GZMB (anti-GZMB Ab, red) and for nuclei (DAPI, blue). GZMB was present in neutrophils (yellow signal shown by white arrows in merged panel). Micrographs are representative of at least 20 different samples (scale bar = 50 μm).

**Supplementary Material and Methods**

**Cell culture.** Colon cancer PROb cells were obtained from a colon carcinoma induced in BD-IX rat [1]. Mouse colon cancer CT26 cells were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were maintained at 37°C respectively in HAM's F10 (Lonza) and RPMI (Lonza) supplemented with 10% FBS (Lonza). CT26 cells were stably transfected by calcium phosphate method [2] with the pCMV6-Kan:Neo expression plasmid containing the full-length SerpinB9 cDNA (OriGene).

**Antibodies and reagents.** Mouse antibody (Ab) HIS48 (Santa Cruz) was used to characterize tumor-infiltrating and purified neutrophils. Mouse anti-TCR α/β Ab (AbD Serotec), goat anti-NKp46 Ab (R&D Systems) and mouse anti-TCR γ/δ Ab (AbD Serotec) were used to detect T lymphocytes, NK cells and γ/δ T lymphocytes respectively in tumors. Tumor cells were characterized using a mouse anti cytokeratin antibody (DakoCytomation). The following Abs were also used: a mouse anti-arginase 1 Ab and a rabbit anti-iNOS Ab (BD Transduction Laboratories), a rabbit anti-cleaved caspase-3 Ab (Cell Signaling), a mouse anti-M30 fragment (Roche) and a rabbit anti-granzyme B Ab (Thermo Scientific). Secondary Abs used were anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 568 or 488 conjugates from Molecular Probes (Invitrogen). GZMB inhibitor 1 (z-AAd-CMK) was purchased from Merck. The following cytokines were added to neutrophil cultures: recombinant rat IL-2 (Biolegend), recombinant mouse IL-21 (eBioscience), IL-12 and IFN-γ (R&D Systems).

**Primer list.** CXLC-1(s), 5'-GAGAAAGAAGATAGATTGCACCGATG-3'; CXCL-1(as), 5'-TTCTTCCCGCTCAACACCTTC-3'; CXCL-2(s), 5'-GTGACACTGAAGAGTTACGATGTCAG-3'; CXCL-2(as), 5'-CCTGAGGCTCCATAAATGAAAGA-3'; IL-2(s), 5'-AAGCAGGCCACAGAATTGAAAC-3'; Il-2(as), 5'-CAGATGGCTATCCATCTCCTCAG-3'; IL-12(s), 5'-CACTCACATCTGCTGCTCCAC-3'; IL-12(as), 5'-CTGGCACGCCACTGAGTACTTC-3'; Il-21(s), 5'-CAGCTCCACAAGATGTAAAGGGGC-3'; IL-21(as), 5'-CCATGTGCCTCTGTTTATTTCCTGTCC-3'; IFNγ(s), 5'-CTCTTGGATATCTGGAGGAACTGG-3'; and IFNγ(as), 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCT-3'; Ncf1 (s), 5'-CACCGAGATCTACGAGTTCC-3'; and Ncf1 (as) 5'-TCCCATGAGGCTGTTGAAGTAC-3'; Ncf2 (s)

5’-GAAAGCATGAAGGATGCCTGG-3’; and Ncf2 (as)5’-ATAGCACCAAGATCACATCTCCTTCC-3'. To standardize the cDNA samples, expression of the housekeeping gene *gapdh* was tested with primer pair (s) 5’-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3’ and (as) 5’-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3’. All primers were synthesized by Invitrogen. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis (1.5% agarose) and stained with ethidium bromide (Invitrogen). The amplified cDNA length was evaluated using the 100-bp DNA ladder (Promega). All densitometric analyses were performed with ImageJ software.

References


1. Martin F, Caignard A, Jeannin JF*, et al.* Selection by trypsin of two sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer* 1983; **32**: 623-627.
2. Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Immunol* 2001; **Chapter 10**: Unit 10.13.

**Figure S1**

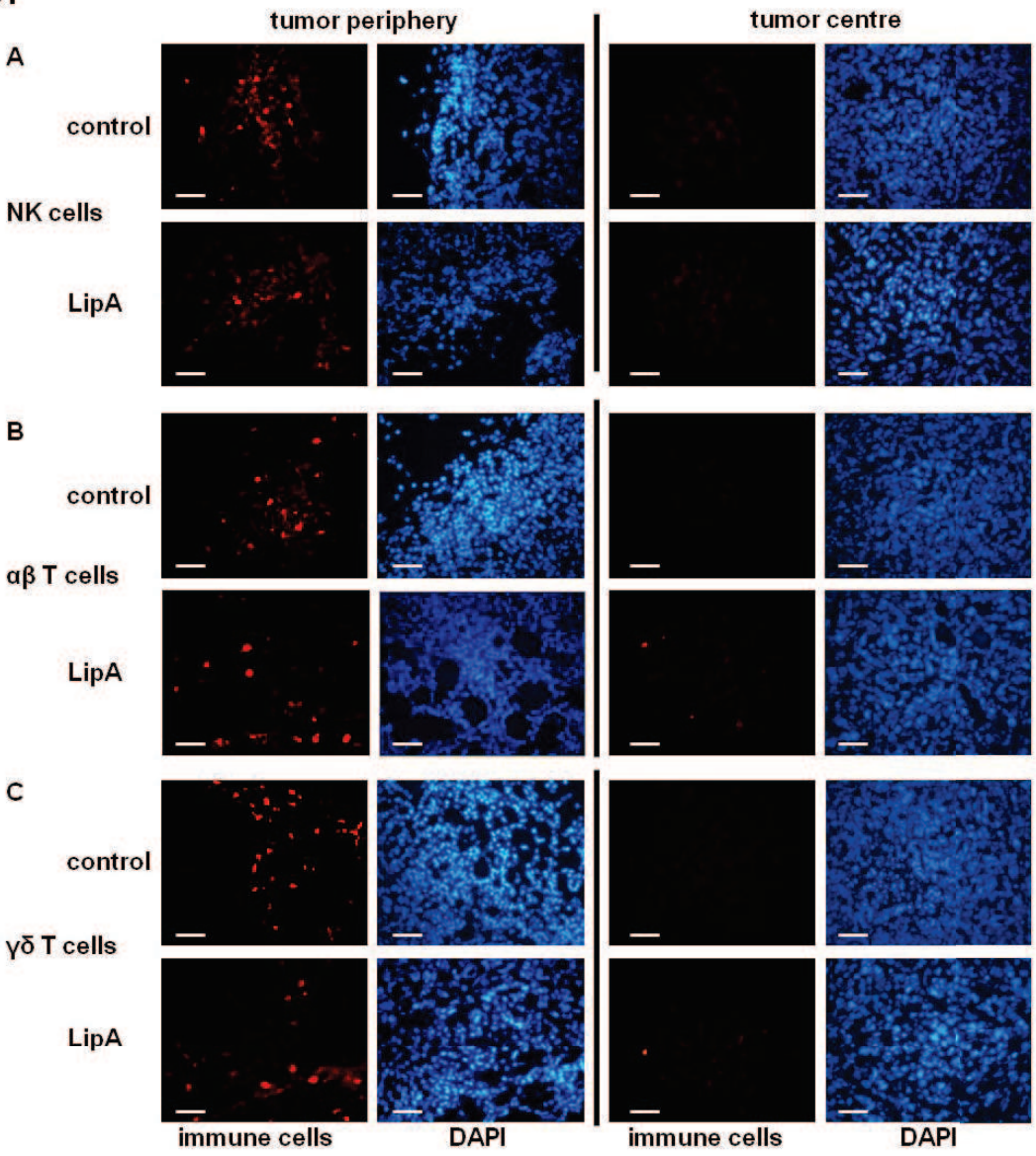



**Figure S1. NK cells, αβT or γδT lymphocytes remained at the periphery of tumors in LipA treated rats.** Tumors from LipA treated or control rats were removed at day 17 and then 5-µm cryosections were prepared and stained (red) for (**A**) NK cells (anti-NKp46 Ab), (**B**) α/β T lymphocytes (anti-TCRα/β Ab) or (**C**) γδT lymphocytes (anti-TCRγ/δ Ab), and for nuclei (DAPI, blue). Left panels show tumor edges, right panels show tumor cores. Micrographs are representative of at least 3 independent experiments, 4 animals per group (scale bars = 50 µm).

**Etude des mécanismes d'action d'une immunothérapie par un triacyl lipide A chez l'homme.**

L'immunothérapie en agissant au niveau de la tumeur primitive et en empêchant le développement des métastases constitue une des stratégies du traitement des patients atteints de cancer. Afin d'améliorer l'efficacité de celle-ci, il est nécessaire de comprendre comment est induit la mort des cellules tumorales. Dans le laboratoire, il a été observé la guérison de rats BDIX porteurs de tumeurs PROb par un triacyl lipide A. Il a été montré que cet effet impliquait le système immunitaire en mettant en jeu des interactions avec les TLR présents sur de nombreuses cellules tumorales et de l'immunité innée comme les neutrophiles.
Dans ce travail, nous avons étudié l'implication éventuelle des neutrophiles dans l'activité anti tumorale du triacyl lipide A chez l'homme.
Dans une étude de phase 1 chez des patients porteurs de tumeurs solides réfractaires, nous avons montré que le triacyl lipide A était bien toléré et qu'il induisait la sécrétion de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire et notamment dans le recrutement des neutrophiles. Nous avons ensuite, dans un second temps démontré l'implication éventuelle des neutrophiles dans cette réponse immunitaire en vérifiant leur présence dans des tumeurs coliques humaines et en analysant leur proximité avec les cellules tumorales, ces deux facteurs déterminant leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales. Nous avons ensuite fait une analyse comparative par rapport au tissu sain pour rechercher si ces neutrophiles étaient activés et comparer l'expression de chimio attractants.

Immunotherapy acting at the primary tumor site and preventing the development of metastases is one of the strategies for treatment of patients with cancer. To improve the efficiency of the latter, it is necessary to understand how it induces tumor cell death. In the laboratory, it was observed the cure of PROb tumors in rats BDIX by the triacyl lipid A. It has been shown that this effect involved the immune system involving interactions with TLRs present in many tumor cells and innate immunity cells such as neutrophils.
In this work, we investigated the possible involvement of neutrophils in the antitumor activity of triacyl lipid A in humans.
In a Phase 1 study in patients with refractory solid tumors, we showed that the triacyl lipid A was well tolerated and induced the secretion of cytokines involved in the immune response, particularly in the recruitment of neutrophils. Then, in a second part, we demonstrated the prospective involvement of neutrophils in the immune response by checking their presence in human colon cancers and analyzing their proximity to tumor cells, these two factors determining their cytotoxicity to cells tumor. Then we made a comparative analysis with healthy tissue to research whether these neutrophils were activated and compare the expression of chemo attractors.