



Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2024

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

(décret du 25 novembre 2016)

Présentée et soutenue publiquement
le 10 octobre 2024 à Poitiers
par **Monsieur Pierre Moreau**

Profil immunohistochimique des points de contrôle immunitaire dans le cancer col-
rectal avec instabilité des microsatellites : corrélations anatomocliniques.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Michel Goujon

Membres :

Madame le Professeur Lucie Karayan-Tapon

Madame le Docteur Camille Evrard

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur David Tougeron



Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2024

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE (décret du 25 novembre 2016)

Présentée et soutenue publiquement
le 10 octobre 2024 à Poitiers
par **Monsieur Pierre Moreau**

Profil immunohistochimique des points de contrôle immunitaire dans le cancer colorectal avec instabilité des microsatellites : corrélations anatomocliniques.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Michel Goujon

Membres :

Madame le Professeur Lucie Karayan-Tapon

Madame le Docteur Camille Evrard

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur David Tougeron



LISTE DES ENSEIGNANTS

Année universitaire 2023 – 2024

SECTION MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY Marion, santé publique – **Référente égalité-diversité**
- BINET Aurélien, chirurgie infantile
- BOISSON Matthieu, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- BOULETI Claire, cardiologie
- BOURMEYSTER Nicolas, biochimie et biologie moléculaire
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie-virologie
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- COUDROY Rémi, médecine intensive-réanimation – **Assesseur 2nd cycle**
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- DONATINI Gianluca, chirurgie viscérale et digestive
- DROUOT Xavier, physiologie – **Assesseur recherche**
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie – **Assesseur 2nd cycle, stages hospitaliers**
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GARCIA Rodrigue, cardiologie
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOJJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- ISAMBERT Nicolas, cancérologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (en disponibilité)
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie – **Assesseur 1^{er} cycle**
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHAIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, médecine d'urgence
- NASR Nathalie, neurologie
- NEAU Jean-Philippe, neurologie – **Assesseur pédagogique médecine**
- ORIOU Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie – **Doyen, Directeur de la section médecine**
- PELLERIN Luc, biologie cellulaire
- PERAULT-POCHAT Marie-Christine, pharmacologie clinique

- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire – **Assesseur L.A.S et 1^{er} cycle**
- PERRAUD CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- PUYADE Mathieu, médecine interne
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, gastro- entérologie, hépatologie – **Assesseur 3^e cycle**
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie – **Assesseur 1^{er} cycle**
- THILLE Arnaud, médecine intensive-réanimation – **assesseur 1^{er} cycle stages hospitaliers**
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALLAIN Géraldine, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (en mission 1 an à/c 01/11/2022)
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (en détachement)
- BILAN Frédéric, génétique
- BRUNET Kevin, parasitologie et mycologie
- CAYSSIALS Emilie, hématologie
- CREMNITER Julie, bactériologie-virologie
- DIAZ Véronique, physiologie – **Référente relations internationales**
- EGLOFF Matthieu, histologie, embryologie et cytogénétique
- EVRARD Camille, cancérologie
- GACHON Bertrand, gynécologie-obstétrique (en dispo 2 ans à/c du 31/07/2022)
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie (absente jusqu'au 29/12/2023)
- GUENEZAN Jérémy, médecine d'urgence
- HARIKA-GERMANEAU Ghina, psychiatrie d'adultes
- JVAUGUE Vincent, néphrologie
- JUTANT Etienne-Marie, pneumologie
- KERFORNE Thomas, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire (en mission 1 an à/c 01/11/2022)
- LAFAY-CHEBASSIER Claire, pharmacologie clinique
- LIUU Evelyne, gériatrie – **assesseur 1^{er} cycle stages hospitaliers**
- MARTIN Mickaël, médecine interne – **Assesseur 2nd cycle**
- MASSON REGNAULT Marie, dermato-vénérologie
- PALAZZO Paola, neurologie (en dispo 5 ans à/c du 01/07/2020)
- PICHON Maxime, bactériologie-virologie
- PIZZOFERRATO Anne-Cécile, gynécologie-obstétrique

- RANDRIAN Violaine, gastro-entérologie, hépatologie
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire
- VALLEE Maxime, urologie

Maitre de Conférences des universités de médecine générale

- MIGNOT Stéphanie

Professeur associé des universités des disciplines médicales

- FRAT Jean-Pierre, médecine intensive-réanimation

Professeur associé des universités des disciplines odontologiques

- FLORENTIN Franck, réhabilitation orale

Professeurs associés de médecine générale

- ARCHAMBAULT Pierrick
- AUDIER Pascal
- BIRAULT François
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Régis
- BONNET Christophe
- DU BREUILLAC Jean
- FORGEOT Raphaële
- JEDAT Vincent

Professeurs émérites

- BINDER Philippe, médecine générale (08/2028)
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie (08/2028)
- GIL Roger, neurologie (08/2026)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2026)
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale (08/2025)
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire (08/2028)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (08/2026)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2024)
- ROBERT René, médecine intensive-réanimation (30/11/2024)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2026)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ALLAL Joseph, thérapeutique (ex-émérite)
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CARRETIER Michel, chirurgie viscérale et digestive (ex-émérite)
- CASTEL Olivier, bactériologie-virologie ; hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)

- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- EUGENE Michel, physiologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GILBERT-DUSSARDIER Brigitte, génétique
- GOMES DA CUNHA José, médecine générale (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- HERPIN Daniel, cardiologie (ex-émérite)
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie viscérale et digestive
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (ex-émérite)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (ex-émérite)
- TOURANI Jean-Marc, cancérologie
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Michel Goujon :

Vous me faites l'honneur de présider ce travail. Je vous remercie pour votre accueil au sein de du service d'anatomie pathologique du CHU de Poitiers, pour votre soutien et votre enseignement. Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur David TOUGERON :

Tu m'as fait l'honneur de me proposer ce sujet de thèse. Je te remercie pour ta confiance et ton incroyable disponibilité. Merci pour ton encadrement dans le service de gastro-entérologie et pour l'intérêt que tu transmets pour la pathologie digestive.

A Madame le Professeur Lucie Karayan-Tapon :

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie pour votre accueil au sein du service de cancérologie biologique et votre enseignement.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect.

A Madame le Docteur Camille Evrard :

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A ceux qui ont participé à l'élaboration de cette thèse :

Evidemment, Lucie Lebeau, pour sa contribution et son soutien au cours de cette longue période de mise au point des anticorps.

Au Docteur Serge Milin, pour sa contribution à l'interprétation des résultats.

A toute l'équipe d'anatomie-pathologique du CHU de Poitiers

A toute l'équipe d'hépatogastro-entérologie du CHU de Poitiers

A toute l'équipe de cancérologie biologique du CHU de Poitiers

Aux Docteurs Agnès Pastré, Anne-Marie Keuk et Xavier Hérault

A toute l'équipe de médecine légale du CHU de Pointe à Pitre

A toute l'équipe d'anatomie pathologique du CHU de Pointe à Pitre

A toute l'équipe d'anatomie pathologique de Saint-Antoine

A toute l'équipe du laboratoire Xpath Atlantique

A mes amis

A ma belle famille

A mes parents

A mon frère

A mes grands parents

A Mathilde, Edouard et Constance :

Vous êtes la plus belle chose qui me soit arrivée.

SOMMAIRE

I/ <u>INTRODUCTION</u>	15
1 – Généralités	15
2 – Le cancer colorectal	15
a – Epidémiologie	15
b – Mortalité	16
c – Facteurs de risque	16
3 – Aspects anatomo-pathologiques et cliniques	17
a – Les cancers colorectaux associés au phénotype MSI.....	17
1 – L'adénocarcinome mucineux	18
2 – Le carcinome à cellules indépendantes en anneaux	19
3 – Le carcinome médullaire.....	20
b – Autres formes de cancers colorectaux non associés au phénotype MSI.....	21
1 – L'adénocarcinome festonné	21
2 – L'adénocarcinome micropapillaire	22
3 – L'adénocarcinome de type adénome.....	23
4 – Le carcinome adéno-squameux.....	24
5 – Le carcinome à composante sarcomatoïde	25
6 – Le carcinome indifférencié.....	25
4 – Biologie moléculaire des cancers colorectaux	25
a – L'instabilité chromosomique.....	26
b – L'instabilité épigénétique.....	28
c – Les cancers ultra-mutés	29
d – L'instabilité microsatellitaire	30

e – Classification moléculaire consensus des CCR.....	33
5 – Méthodes de détection du phénotype MSI	34
a – Étude en immunohistochimie.....	35
b – Étude en biologie moléculaire	38
6 – Impact pronostic et thérapeutique du statut MSI sur les cancers colorectaux	40
a – Impact pronostic	40
b – Réponse à la chimiothérapie	43
c – Réponse à l’immunothérapie.....	44
d – Résistance à l’immunothérapie	48
7 – Réponse immunitaire antitumorale et points de contrôle immunitaire	51
a – Mécanismes d’action	52
b – Points de contrôle immunitaire	54
1 - Structures et mécanismes d’action.....	55
a – PD1/PDL1	55
b – CTLA4	56
c – LAG3	58
d – TIM-3.....	60
e – TIGIT	63
2 - Expressions dans les cancers colorectaux	66
II/ MATERIEL ET METHODE	70
III/ RÉSULTATS	73
IV/ DISCUSSION	83

INDEX DES TABLEAUX, PHOTOS ET FIGURES

Photo 1 : CCR, aspect macroscopique. Dr Jinru Shia et David S. Klimstra au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York

Photo 2 : Adénocarcinomes bien différencié MSS à gauche et ADK peu différencié avec lymphocytes infiltrant la tumeur MSI à droite, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal et Wendy L Frankel

Photo 3 : Adénocarcinome mucineux, aspect macroscopique. Source : Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds.) Classification OMS des tumeurs du système digestif. CIRC Lyon 2010

Photo 4 : Adénocarcinome mucineux, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 5 : Carcinome à cellules indépendantes en anneaux, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 6 : Carcinome médullaire, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 7 : Adénocarcinome festonné, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 8 : Adénocarcinome micropapillaire, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 9 : Adénocarcinome de type adénome, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 10 : Carcinome adénoquameux, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal

Photo 11 : Un exemple d'immunomarquage dMMR (source photo : Wendy L Frankel) : MLH1 conservé (A), MSH2 perdu (B), MSH6 perdu (C) et PMS2 conservé (D), témoins internes positifs pour les quatre marqueurs

Photo 12 : Quatre exemples d'immunomarquages MMR particuliers (source photo : Wendy L Frankel)

Photo 13 : Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti-CTLA-4 (E2V1Z) sur un carcinome colique (photo CellSignaling)

Photo 14 : Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti-TIM-3 (D5D5R) sur un adénocarcinome colique (photo CellSignaling)

Photo 15 : Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti-TIGIT (ESY1W) sur un adénocarcinome colique (photo CellSignaling)

Photo 16 : Ganglion lymphatique à distance du foyer tumoral. Ici expression de l'anticorps anti-TIGIT non prise en compte (7.0x)

Photo 17 : Emboles lymphatiques, à ce niveau l'expression immunohistochimique n'est pas prise en compte (anticorps anti-TIM-3 5.0x à gauche et HES 5.0x à droite).

Photo 18 : Un exemple d'hétérogénéité tumorale. Hétérogénéité d'expression avec l'anticorps anti-PDL-1 (0.5x à gauche et 5.0x à droite).

Photo 19 : Expression de PDL-1 (0.5x à gauche et 3.6x à droite). Sur la lame de gauche, on repère un marquage essentiellement périphérique dans la partie basse associé à un marquage central dans la partie haute. Le score TPS était < 1 % et le score CPS était de 8 sur cette lame.

Photo 20 : Expression des ICP. A gauche HES (10.0x), en haut à gauche CTLA-4 (H-score 6, 20.0x), en haut à droite TIM-3 (H-score 90, 10.0x), en bas à gauche TIGIT (H-score 90, 13.0x) et en bas à droite LAG-3 (H-score 15, 14.0x)

Photo 21 : Ganglion envahi par continuité dans une tumeur avec contingent mucineux. A gauche expression périphérique de PDL-1 (score TPS < 1 % et score CPS à 3), en haut à droite expression plus diffuse de TIM-3 (H-score 30), en bas à droite coloration HES

Figure 1 : Etapes moléculaires de la carcinogenèse des cancers colorectaux sporadiques et des cancers colorectaux associés à la colite. Beaugerie et al NEJM, 2015

Figure 2 : Les séquences polypes festonnés/adénocarcinome. Sources photos : Rish K Pai, Christophe Rosty, Iris D. Nagtegaal. Who classification of tumours

Figure 3 : Séquence de la transformation des tumeurs MSI adénome/adénocarcinome. Sources photos : Iris D. Nagtegaal et Sigurd Lax. Who classification of tumours

Figure 4 : Mécanisme de réparation des mésappariements

Figure 5 : Classifications génomiques et transcriptomiques des cancers colorectaux. Tiré de Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Classification pathologique moléculaire du cancer colorectal. Arche de Virchow.

Figure 6 : Outil décisionnel pour l'interprétation des immunomarquages des protéines MMR dans les tumeurs, adapté d'après Sari et al., 2019

Figure 7 : Electrophorégramme présentant une tumeur instable sur les 5 marqueurs

Figure 8 : Indication de consultation oncogénétique dans les CCR en fonction des résultats des tests somatiques

Figure 9 : Survie après récurrence chez les patients atteints d'un cancer du côlon résectionné de stade III selon le statut mutationnel MMR et BRAF

Figure 10 : Courbe de survie globale en fonction des statuts MSI et BRAF

Figure 11 : Courbes de SSP (A) et de SG (B) chez les patients atteints de CCR MSI vs MSS (100)

Figure 12 : Courbes de SSP (PFS) et SG (OS) essai CheckMate-142(101)

Figure 13 : SSP chez les patients atteints d'un CCRm MSI/dMMR, KeyNote-177(102)

Figure 14 : Survie sans progression dans le groupe Avelumab vs chimiothérapie (120)

Figure 15 : SSP, Nivolumab+Ipilimumab versus chimiothérapie en L1 CCRm MSI, essai CheckMate 8HW

Figure 16 : Schémas de résistance primaire, adaptative et acquise à l'immunothérapie

Figure 17 : SSP chez les patients atteints du syndrome de Lynch versus et CRC MSI-H/dMMR sporadique

Figure 18 : Réponse immunitaire anti-tumorale (image M. Calvez)

Figure 19 : Inhibiteurs PD1/PDL1 dans le TME

Figure 20 : Fonction de CTLA-4 et conséquence du blocage

Figure 21 : Interactions de ligands et analogies structurelles de LAG3 et CD4

Figure 22 : Structure et fonction de TIM-3 et de ses ligands

Figure 23 : Structure et fonction de TIGIT et de ses ligands

Figure 24 : Corrélations entre l'expression de PDL-1 (score CPS) et CTLA-4, LAG-3, TIGIT et TIM-3 (H-score)

Tableau 1 : Gènes mutés de manière récurrente et altérations du nombre de copies somatiques (SCNA) du bras chromosomique dans le cancer colorectal ultramuté et hypermuté versus non hypermuté (CCR)

Tableau 2 : Résultats de la méta-analyse ACCENT

Tableau 3 : Caractéristiques des patients et des tumeurs au diagnostic de la maladie

Tableau 4 : Caractéristiques des patients et des tumeurs au début de l'immunothérapie

Tableau 5 : Expression de PDL-1, score TPS et CPS

Tableau 6 : Expression de CTLA-4, LAG-3, TIGIT et TIM-3, système H-score

Tableau 7 : Région tumorale d'expression des ICP

Tableau 8 : Corrélations anatomocliniques entre l'expression des ICP et les caractéristiques au diagnostic de la maladie

LISTE DES ABREVIATIONS

5FU : 5-Fluoro-Uracile

ADK : Adénocarcinome

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

APAF1 : Apoptotic Peptidase-activating Factor 1

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

ARID1A : *AT-rich interactive domaincontaining Protein 1A*

BAX : *BCL2-associated X*

BRAF : *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*

CASP5 : Caspase 5

CCR : Cancer colorectal

CD : Cellule dendritique

CDX2 : *Caudal-Type Homebox 2*

CEACAM : Molécule d'adhésion cellulaire antigène embryonnaire du cancer 1

CIMP : *CpG Island Methylator Phenotype*

CK20 : Cytokératine 20

CMMRD : *Constitutional mismatch repair deficiency* ou déficit consitutionnel du système MMR

CMS : *Consensus molecular subgroup*

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CPNPC : Carcinome pulmonaire non à petites cellules

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

DFS : *Disease free survival*

DNAM : *DNAX accessory molecule*

EGFR : *Epithelial growth factor receptor*

Gal-9 : Galectine-9

HES : Hématoxyline Eosine Safran.

HMGB-1 : Protéine de groupe à haute mobilité 1

HNPCC : *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*

HR : *Hazard ratio*

ICI : Inhibiteur de point de contrôle immunitaire

ICP : *immune Check Point*

IGFR2R : *Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*

IHC : Immunohistochimie

Il : Interleukine

INCa : Institut national du cancer

KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (h)*

LAG-3 : Gène d'activation des lymphocytes 3

LOH : *Loss of heterozygosity*

MGMT : Méthyl guanine Méthyl transférase

MLH : *(human)MutL Homolog*

MMR : *Mismatch repair* ou réparation des mésappariements

MS2-MS6 : Minisatellite 2 – Minisatellite 6

(h)MSH : *(human)MutS Homolog*

MSI : Microsatellite instability ou instabilité microsatellitaire

MSS : Microsatellite stable

MYH : *Myosin Heavy Chain*

NECL : Récepteurs de la nectine et des protéines de type nectine

NGS : *Next Generation Sequencing*

NK : Natural Killer

NOS : *Not otherwise specified*

PAF : Polypose adénomateuse familiale

pb : Paire de base

PCNA : *Poliferating cellular nuclear antigen*

PCR : *Polymerase chain reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne

PD-1 : *Programmed cell death-1*

PD-L1 : *Programmed cell death-1 ligand*

PI3K (PIK3CA) : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (catalytic subunit α)*

PMS2 : *Postmeiotic Segregation Increased 2*

Pol E : Polymérase répllicative avec activité correctrice

PPAP : *Polymerase proofreading associated polyposis syndrome*

PtdSer : Phosphatidylsérine

PVR : Récepteur du virus de la polio

SCNA : Altérations du nombre de copie somatique

SG : Survie globale

SL : Syndrome de Lynch

SSP : Survie sans progression

SSR : Survie sans récurrence

SWI/SNF : *SWItch/Sucrose Non-Fermenting*

TCR : *T cell receptor*

TGFBR2(3) : *Transforming growth factor beta receptor 2(3)*

TIF : Test immunochimique fécal

TIGIT : Immunorécepteur des lymphocytes T avec les domaines Ig et ITIM

TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

TIM-3 : Immunoglobuline des lymphocytes T et domaine mucine contenant-3

TMA : *Tissu micro array*

TME : *Tumor microenvironment*

I/ INTRODUCTION

1 – Généralités

Entre 1990 et 2023 en France métropolitaine, le nombre de nouveaux cas de cancers a doublé, avec une augmentation de 98 % des cancers chez l'homme et de 104 % chez la femme, toutes localisations confondues (1).

L'évolution démographique (augmentation et vieillissement de la population) explique 78 % de l'augmentation de l'incidence chez l'homme et 57 % chez la femme sur la période 1990-2023 (1).

Si le nombre de nouveaux cas « tous cancers » augmente, le taux d'incidence standardisé, quant à lui, a augmenté jusqu'en 2005 avant de diminuer, puis de se stabiliser depuis 2012 chez l'homme, alors qu'il a augmenté de manière continue chez la femme depuis 1990. Deux cancers en particulier montrent une augmentation préoccupante sur la période considérée : le cancer du poumon et le cancer du pancréas (1).

Indépendamment de ces variations, les cancers les plus fréquents restent les cancers du sein, de la prostate, du poumon et du côlon/rectum (1).

Néanmoins, la prise en charge des patients atteints de cancer s'est améliorée et on remarque une diminution globale de la mortalité, conséquence de résultats du dépistage, de diagnostics plus précoces et d'avancées thérapeutiques importantes augmentant les taux de rémissions complètes, notamment parmi les cancers les plus fréquents.

2 – Le cancer colorectal

a – Epidémiologie

Le cancer colorectal, ou cancer du côlon et du rectum (CCR), est l'un des plus fréquents en France.

En 2023, 47582 nouveaux cas ont été répertoriés. Il s'agit du troisième cancer le plus fréquent chez les hommes (après le cancer du poumon et le cancer de la prostate) et deuxième chez les femmes, (après le cancer du sein et avant le cancer du poumon) (2).

L'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et de 73 ans chez la femme (2).

Le taux d'incidence sur la période 2010-2023, a diminué chez l'homme (-0.5%) et augmenté chez la femme (+0,4%) (2).

b – Mortalité

Dans notre pays, en 2023, 17100 décès ont été répertoriés avec une prédominance masculine (53.8%).

Il s'agit de la 2^{ème} cause de décès par cancer chez les hommes et de la 3^{ème} chez les femmes.

Pour les deux sexes, on note une diminution de la mortalité par an de -1.8% chez l'homme et -1.6% chez la femme sur la période 2010-2018 (2).

Sur la période 2010-2015, les personnes diagnostiquées d'un cancer colorectal ont une survie nette standardisée à 1 an de 84 % et à 5 ans de 63 %, toujours légèrement plus élevée chez la femme que chez l'homme (3-4).

c – Facteurs de risque

Le risque de développer un CCR est défini par trois niveaux de risques : moyen, élevé et très élevé. Par conséquent, à chacun de ces niveaux de risques sont associées des recommandations de dépistage et de suivi spécifiques.

- Le risque moyen est représenté par les individus de plus de 50 ans sans histoire familiale ni antécédents personnels de cancer colorectal ou d'adénome et ne présentant pas de symptôme évocateur ni facteurs de risque particuliers. Pour ces personnes, un test immunologique fécal (TIF) est recommandé tous les deux ans (5). En cas de positivité une coloscopie est indiquée.
- Le risque élevé est représenté par les individus ayant un antécédent personnel de cancer colorectal ou d'un adénome, un antécédent familial de cancer colorectal ou d'adénome de plus de 1 cm au premier degré avant 65 ans, dont les deux parents ont été atteints d'un cancer colorectal quel que soit l'âge et les patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin étendue au moment du diagnostic ou évoluant depuis plus de 20 ans (6).
- Enfin, certaines altérations génétiques constitutionnelles peuvent favoriser la survenue d'un cancer. Ainsi le risque très élevé est représenté par les individus atteints de polypose adénomateuse familiale (PAF) caractérisée par la présence de nombreux adénomes dans le tube digestif et principalement lié à des mutations des gènes *APC* (*adenomatous polyposis coli*) ou *MUTYH* et le syndrome de Lynch (SL) lié à des mutations des gènes *MMR* (*MisMatch Repair*).

3 – Aspects anatomo-pathologiques et cliniques

Sur le plan macroscopique, les CCR sont de taille et d'aspect variables, endo ou exophytiques avec différents degrés de fibrose (7). Classiquement, ils se présentent sous la forme d'un ulcère central aux bords roulés circonférentiels (Photo 1).

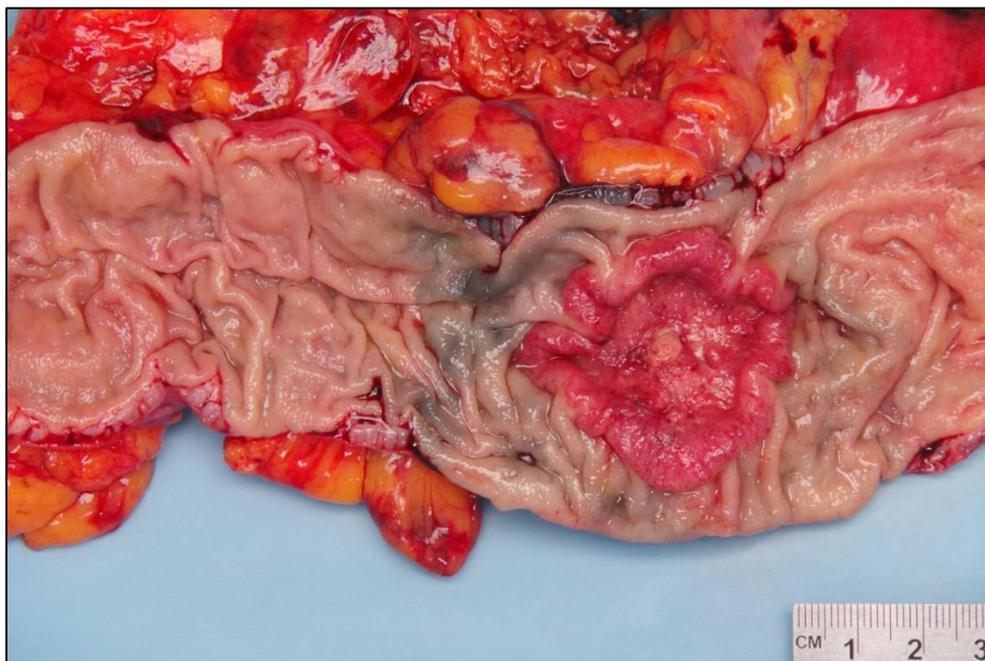


Photo 1 : CCR, aspect macroscopique. Dr Jinru Shia et David S. Klimstra au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York

D'un point de vue histopathologique, 90% des CCR sont des adénocarcinomes (ADK). Le caractère déterminant est l'invasion à partir de la muqueuse vers les autres tuniques pariétales. La classification des CCR est basée sur la formation des glandes. On distingue ainsi les tumeurs de bas grade (bien et moyennement différenciées) et de haut grade (peu différenciées).

Bien que la plupart des cas soient diagnostiqués comme des adénocarcinomes NOS (*Not Otherwise Specified*), plusieurs sous-types histopathologiques peuvent être distingués, avec des caractéristiques cliniques et moléculaires spécifiques.

a – Les cancers colorectaux associés au phénotype MSI

Les CCR avec instabilité microsatellitaire (MSI) présentent plutôt une différenciation mucineuse, à cellules indépendantes, ou de type carcinome médullaire. Un stroma tumoral riche en lymphocytes avec réaction lymphoïde Crohn-like peut également être associé. Nous allons détailler ci-dessous ces

différents sous types où la proportion de MSI est augmentée par rapport à l'adénocarcinome NOS et aux autres sous-types non associés aux MSI.

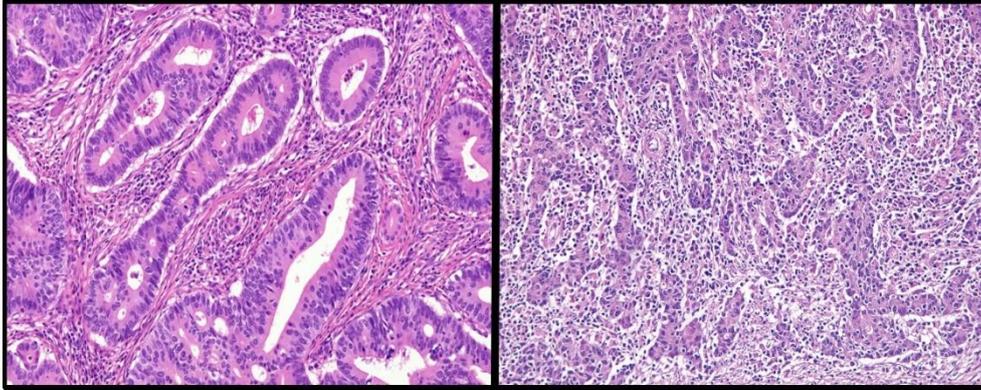


Photo 2 : ADK bien différencié MSS à gauche et ADK peu différencié MSI avec lymphocytes infiltrant la tumeur à droite, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal et Wendy L Frankel.

1 – L'adénocarcinome mucineux

Une tumeur est désignée comme adénocarcinome mucineux si > 50 % de la lésion est composée de pools de mucine extracellulaire contenant des cellules carcinomateuses sous forme d'amas, de couches ou de cellules tumorales individuelles, y compris des cellules en anneau (Photo 2 et 3). Il s'agit du sous-type le plus courant, avec une prévalence allant de 5 % à 20 % (8).

Il n'y a pas de différence pronostique par rapport à l'adénocarcinome NOS (9), bien qu'il y ait une réponse relativement faible au traitement systémique dans le contexte métastatique (10). La présence de MSI n'a pas de valeur pronostique indépendante (11) ; par conséquent, le classement doit être basé sur la formation glandulaire et la maturation épithéliale.

Les carcinomes avec des zones mucineuses < 50 % sont classés comme ayant une composante mucineuse.



Photo 3 : Adénocarcinome mucineux, aspect macroscopique. Source : Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds.) Classification OMS des tumeurs du système digestif. CIRC Lyon 2010.

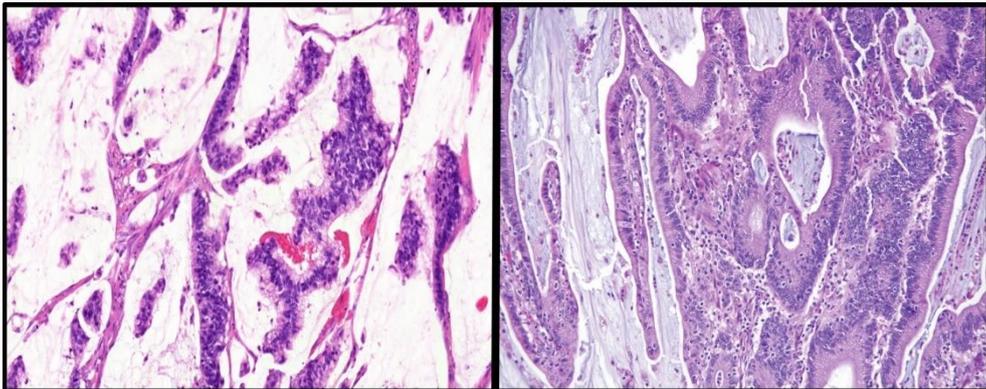


Photo 4 : Adénocarcinomes mucineux, aspect microscopique. A droite CCR MSI avec contingent mucineux et nombreux lymphocytes infiltrant la tumeur. Source photo : Iris D. Nagtegaal et Wendy L Frankel.

2 – Carcinome à cellules indépendantes en anneaux

Une tumeur est désignée comme carcinome à cellules en anneau si > 50 % des cellules tumorales présentent une mucine intracytoplasmique proéminente, généralement avec déplacement et moulage du noyau (Photo 4).

Ce sous-type a un faible taux de prévalence, environ 1 % (12) et une prédilection pour le côlon droit. Les tumeurs se présentent souvent à des stades avancés, mais le pronostic corrigé en fonction du stade est

plus mauvais que celui de l'adénocarcinome NOS et du carcinome mucineux (13). Les métastases se développent rapidement et à des emplacements multiples qui ne sont pas typiques du CCR NOS (14).

Les carcinomes avec des cellules en anneau à chevalière dans <50 % de la tumeur sont classés comme ayant une composante cellulaire en anneau à chevalière.

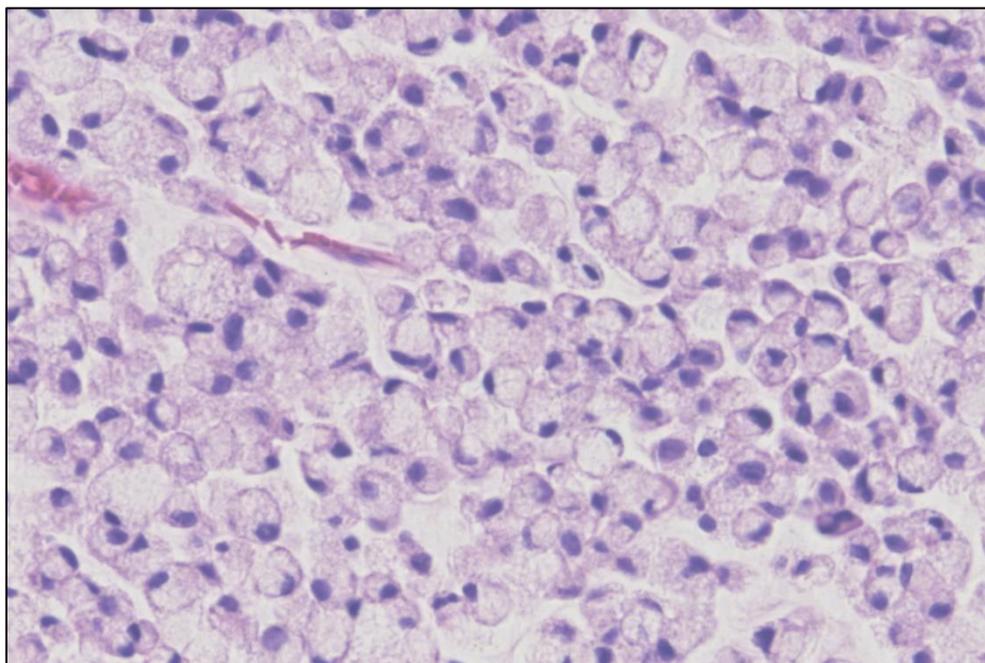


Photo 5 : Carcinome à cellules indépendantes en anneaux, aspect microscopique. A droite association d'un ADK bien différencié et cellules indépendantes. Source photo : Iris D. Nagtegaal et Wendy L Frankel.

3 – Le carcinome médullaire

Ce sous-type est caractérisé par des feuillettes de cellules malignes avec des noyaux vésiculaires, des nucléoles proéminents et un cytoplasme éosinophile abondant, présentant une infiltration importante de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles (Photo 5). Il est à noter que ce type de CRC présente un schéma immunohistochimique aberrant, avec perte de CDX2 et CK20 (15). Les marqueurs neuroendocriniens sont négatifs en immunohistochimie.

On estime sa prévalence à 4%. Il est fréquemment associé au phénotype MSI, le plus souvent en association avec des mutations BRAF (16), et il est associé à un mauvais pronostic (17).

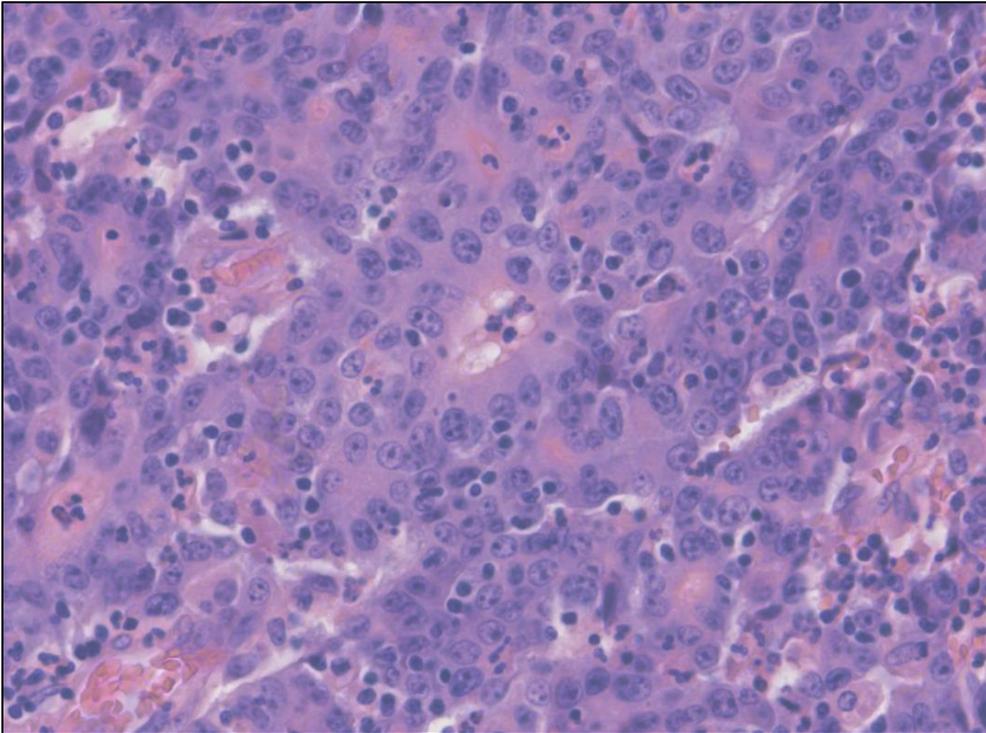


Photo 6 : Carcinome médullaire, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal.

b – Autres formes de cancers colorectaux non associés au phénotype MSI

1 - L'adénocarcinome festonné

Environ 10 à 15 % des CCR peuvent être classés comme adénocarcinome festonné (18). Ce sous-type présente des similitudes morphologiques avec les polypes festonnés et est caractérisé par un aspect festonné des glandes, un faible rapport nucléo-cytoplasmique et peut s'accompagner de zones mucineuses (Photo 6).

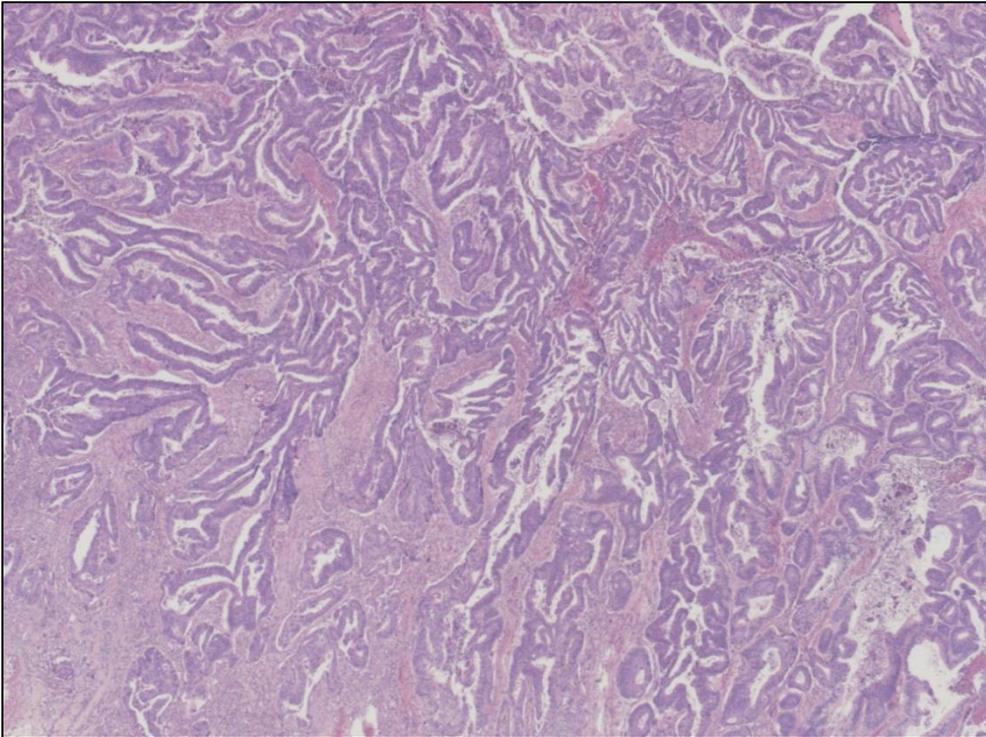


Photo 7 : Adénocarcinome festonné, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal.

2 - L'adénocarcinome micro papillaire

Ce sous-type est caractérisé par des petits amas de cellules tumorales dans des espaces de stroma imitant les vaisseaux (Photo 7). Pour définir ce sous-type, au moins 5 % de la tumeur doit présenter cet aspect. Son incidence varie de 5 à 20% selon les séries (19-20). Ce sous-type présente un risque élevé de métastases ganglionnaires, d'embolies lymphatiques et veineux extra-muraux et d'engainements péri-nerveux.

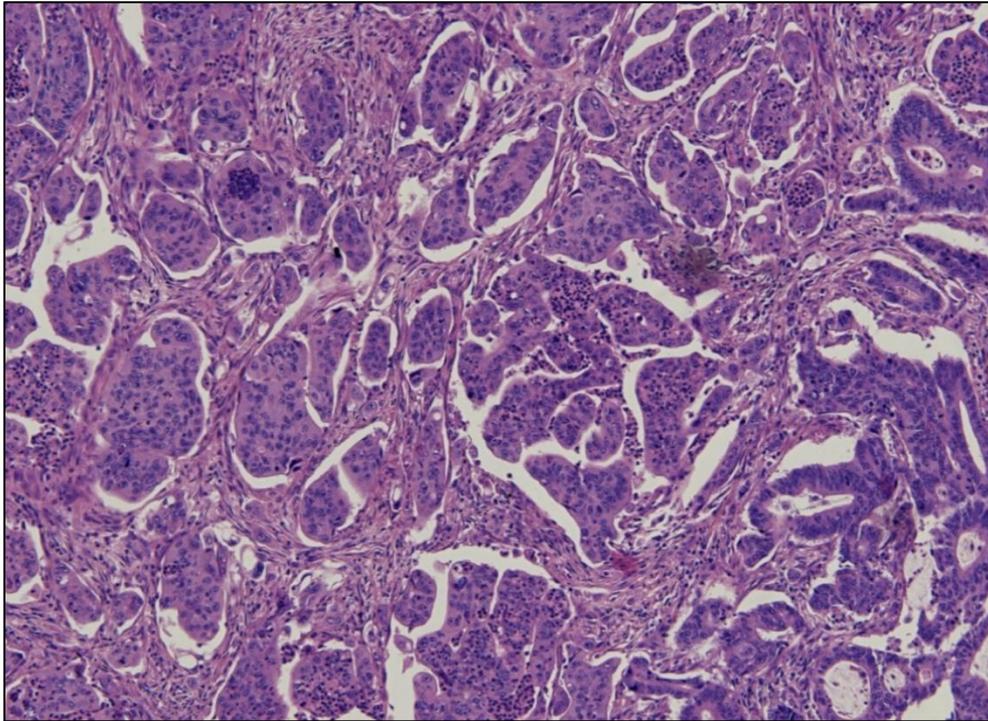


Photo 8 : Adénocarcinome micro papillaire, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal.

3 - L'adénocarcinome de type adénome

Décrit comme “adénocarcinome vilieux” et “adénocarcinome papillaire invasif” (21-22), ce sous-type se définit par un adénocarcinome invasif dans lequel au moins 50% des zones invasives ont un aspect similaire à un adénome d'architecture vilieux de bas grade (Photo 8). Son incidence varie de 3 à 9 %. Il peut être difficile à diagnostiquer notamment sur biopsies. Il est associé à un taux élevé de mutation KRAS et un pronostic favorable (23).

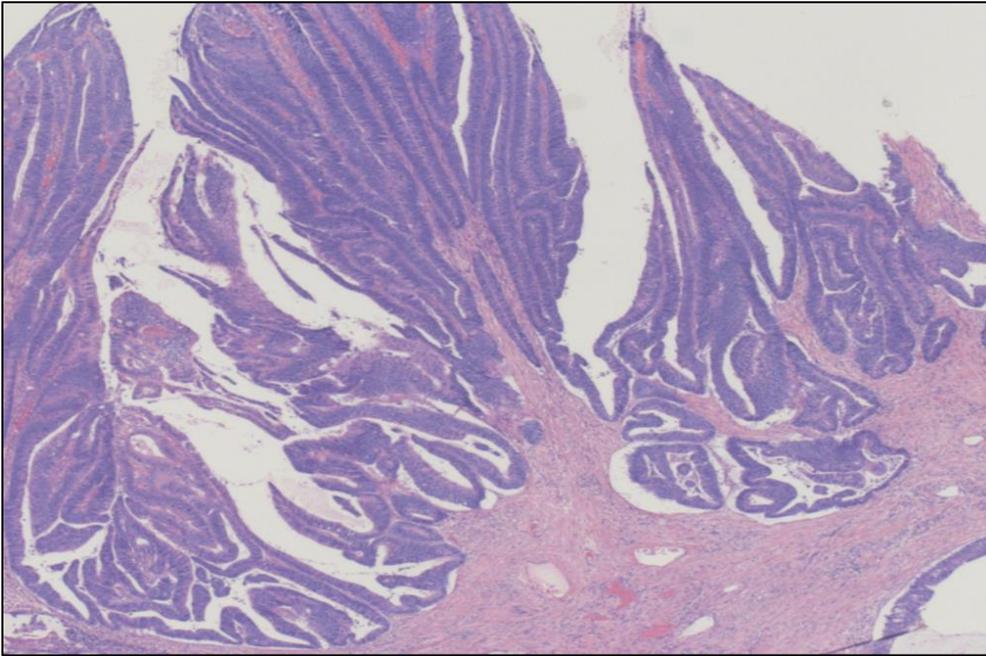


Photo 9 : Adénocarcinome de type adénome, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal.

4- Le carcinome adéno-squameux

Il s'agit d'un sous-type rare avec une incidence $< 0,1\%$ (24). Il associe les caractéristiques de l'adénocarcinome et du carcinome épidermoïde (Photo 9), similaires à celles observées ailleurs dans le tractus digestif notamment œsophagien et gastrique.

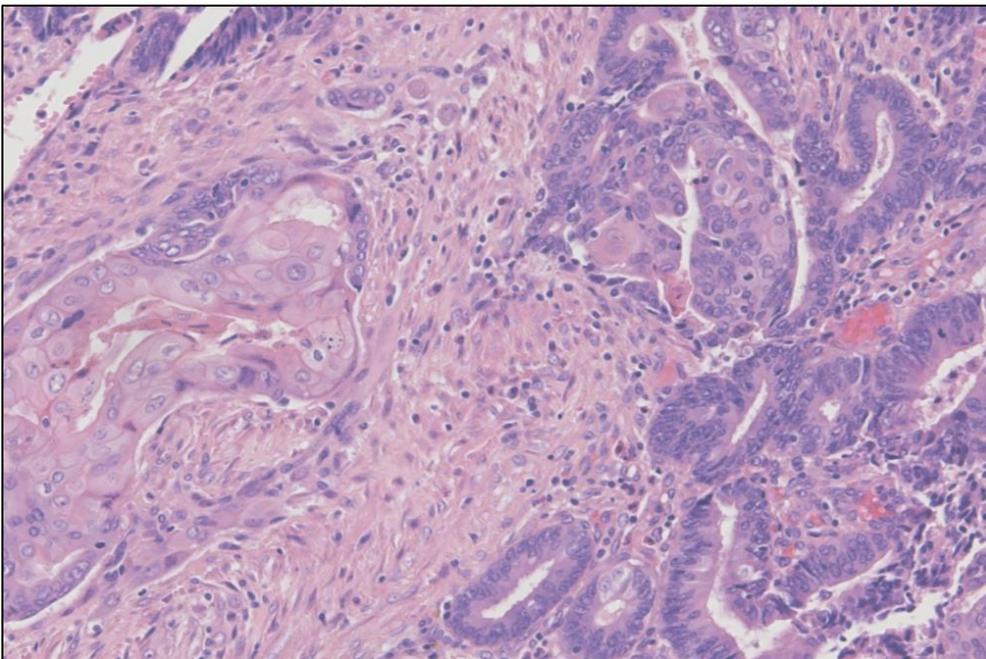


Photo 10 : Carcinome adénosquameux, aspect microscopique. Source photo : Iris D. Nagtegaal.

5 - Le carcinome à composantes sarcomatoïdes

Certains CCR sont caractérisés par une histologie partiellement indifférenciée et des aspects sarcomatoïdes tels que des cellules fusiformes ou des aspects rhabdoïdes. Ils sont associés à un mauvais pronostic avec des tumeurs généralement volumineuses, des cellules pléomorphes, discohésives et un stroma myxoïde. Ces secteurs indifférenciés se mêlent à des secteurs glandulaires mieux différenciés (25). D'un point de vue moléculaire, ces tumeurs semblent présenter une perte/coactivation des plusieurs membres de la famille de protéines SWI/SNF, notamment SMARCA4, SMARCA2, et/ou SMARCB1, et certaines présentent des anomalies ARID1A (26).

6 - Le carcinome indifférencié

Ces tumeurs sont caractérisées par une absence d'argument morphologique et immunohistochimique de différenciation épithéliale. Ils sont très rarement associés à un phénotype MSI.

4 – Biologie moléculaire des cancers colo-rectaux

Le CCR est un cancer avec une forte instabilité génétique dont on distingue trois types : l'instabilité chromosomique (CIN), le phénotype hyperméthylateur (CIMP) et l'instabilité microsatellitaire (MSI).

Il existe une autre façon de mesurer plus globalement l'instabilité génétique avec la charge mutationnelle. On distingue ainsi des profils non hyper-mutés correspondants au CIN, hyper-mutés correspondants au MSI et ultra-mutés correspondants au POLE muté.

	CCR ultra-muté et hyper-muté	CCR non hyper-muté
Gènes mutés de manière significative et récurrente	<p>ACVR2A (60 %) APC (50 %) TGFB2 (50 %) BRAF (45 %) MSH3 (40 %) MSH6 (40 %) MYO1B (30 %) TCF7L2 (30 %) CASP8 (30 %) CDC27 (30 %) FZD3 (30 %) MIER3 (30 %) TCERG1 (30 %) MAP7 (25 %), PTPN12 (25 %) et TP53 (20 %), ainsi que beaucoup d'autres à des fréquences plus basses</p>	<p>APC (80 %), TP53 (60 %), KRAS (45 %), TTN (30 %), PIK3CA (20 %), FBXW7 (10 %), SMAD4 (10 %), NRAS (10 %), TCF7L2 (10%), AMER1 (également connu sous les noms de FAM123B et WTX ; 7%), SMAD2 (5%), CTNNB1 (5%), ainsi que bien d'autres à des fréquences plus basses</p>
SCNA du bras chromosomique	<p>Les CRC hypermutés ont beaucoup moins d'ADN SCNA que les CRC non hypermutés, mais il n'y a aucune différence dans la configuration des bras chromosomiques affectés :</p> <p>Gains de 1q, 7p, 7q, 8p, 8q, 12q, 13q, 19q, 20p, 20q Suppressions de 1p, 4q, 5q, 8p, 14q, 15q, 17p (inclut TP53), 17q, 18p, 18q (inclut SMAD4), 20p, 22q</p>	

Tableau 1 : Gènes mutés de manière récurrente et altérations du nombre de copies somatiques (SCNA) du bras chromosomique dans le CCR ultramuté et hypermuté versus non hypermuté (CCR) (27).

a – L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est la plus fréquente des instabilités génétiques et est observée dans environ 70-80% des CCR. Elles sont classiquement retrouvées au niveau du côlon descendant et du rectum et associées à des tumeurs bien différenciées.

Ce type d'instabilité est retrouvé dans la très grande majorité des formes sporadiques, c'est-à-dire sans disposition génétique. On la retrouve néanmoins (1-2%) dans une forme héréditaire majeure : la PAF avec mutation du gène APC/MYH.

Tous types d'anomalies sont identifiées : aneuploïdie, pertes ou gains de chromosomes, délétions, pertes alléliques (LOH), mutations et amplifications. On estime que le taux moyen de pertes alléliques dans le cancer du côlon est de 25% et que le taux moyen de mutations est de l'ordre de 1-5/10⁶ bases correspondant à un profil non hyper-muté (27-28-29).

Ces altérations génétiques interviennent successivement lors des étapes de transformation cancéreuse. Les altérations d'APC sont pour la plupart des mutations inactivatrices, trouvées dans environ 80 % des adénomes et des carcinomes, qui surviennent très tôt dans la séquence et semblent initier la formation de l'adénome (27-30). Ces mutations conduisent généralement à une troncature de la protéine APC, avec une capacité réduite à diriger la dégradation de la β -caténine, entraînant son accumulation et provoquant une signalisation anormale via la voie WNT (31-32). Par la suite, seront retrouvées des altérations touchant les oncogènes tels que KRAS et PIK3CA ou des gènes suppresseurs de tumeur comme TP53.

Des mutations qui inactivent ou perturbent la fonction de TP53 sont trouvées dans environ 60 % des cancers, et cet événement mutationnel correspond souvent au stade tardif de la transition adénome-carcinome dans les cancers sporadiques, bien qu'il survienne plus tôt dans la carcinogenèse associée aux maladies inflammatoires de l'intestin (33) (Figure 1).

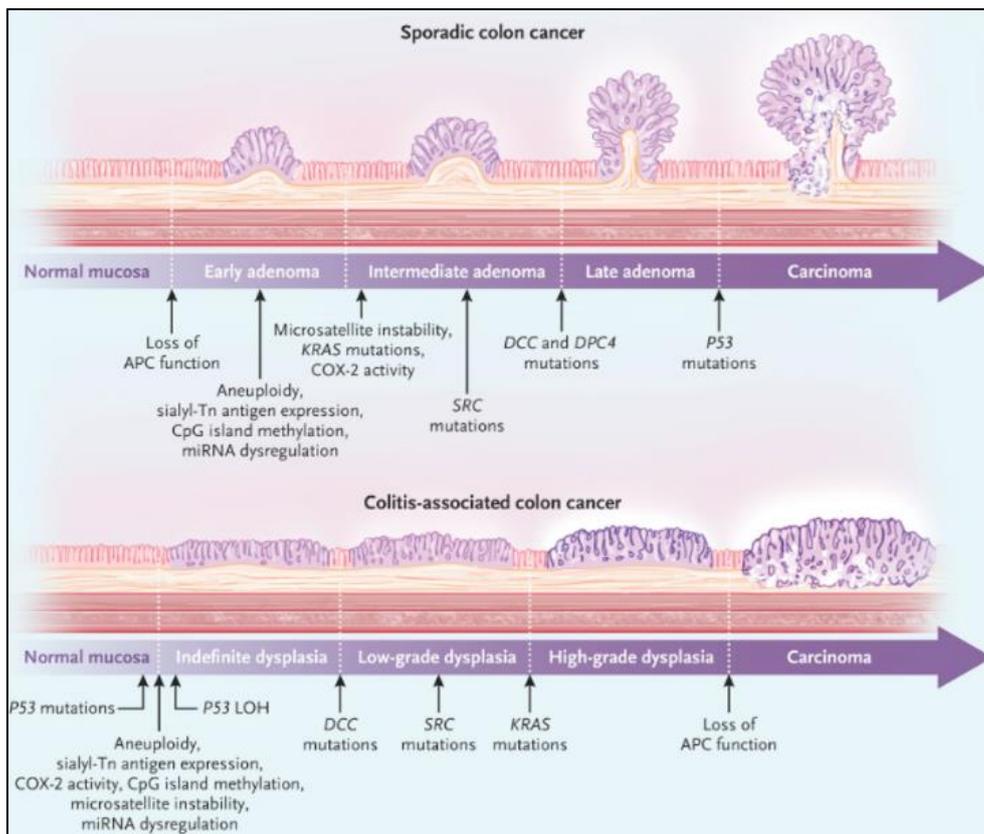


Figure 1 : Etapes moléculaires de la carcinogenèse des cancers colorectaux sporadiques et des cancers colorectaux associés à la colite. Beaugerie et al NEJM, 2015. La plupart des cancers colorectaux sporadiques résultent d'une lésion précurseur d'un adénome qui progresse à travers différents stades jusqu'à devenir un carcinome. La perte de la fonction de la polyposse adénomateuse coli (APC) est considérée comme la première étape qui ouvre la voie à d'autres altérations moléculaires, les mutations TP53 étant à l'origine des étapes ultérieures de la carcinogenèse. Dans le cancer associé à la colite, une lésion précurseur dysplasique apparaît dans la muqueuse colique et évolue vers différents grades de dysplasie. Bien que les mêmes altérations moléculaires se produisent dans le cancer associé à la colite, le moment et la séquence des événements diffèrent souvent. Par exemple, des mutations dans TP53 ou une perte de la fonction p53 sont observées précocement, alors que la perte de la fonction APC est un événement tardif et moins courant.

b – L'instabilité épigénétique

Le phénotype hyperméthylateur, CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*), s'observe dans environ 20% des CCR et est décrit classiquement dans le côlon droit, bien que possible également dans le côlon gauche (34). Cette voie de transformation génétique est caractérisée d'un point de vue anatomo-

pathologique, par les lésions festonnées. Elle s'observe essentiellement dans les cancers sporadiques liés au vieillissement et il n'a y a pas à ce jour été clairement identifié de forme héréditaire.

Les anomalies génétiques rencontrées à l'origine de l'initiation du phénomène de cancérogenèse sont une association de deux anomalies couplées. La première est une mutation d'un des gènes de la voie MAPK (BRAF ou KRAS) associée à un phénotype méthylateur de faible ou de haut degré (Figure 2).

Dans le côlon droit, la lésion précancéreuse est l'adénome festonné sessile et les anomalies génétiques qui initient ce processus de transformation sont l'association d'une mutation du gène BRAF et d'un phénotype méthylateur important observé dans 90%, atteignant des gènes suppresseurs de tumeurs tels que P16, TP53 et le promoteur du gène MLH1 conduisant à une instabilité microsatellitaire sporadique.

Dans le côlon gauche, la lésion précancéreuse est un adénome festonné traditionnel et la mutation du gène de la voie MAPK est le gène KRAS associé à un phénotype méthylateur dans une moindre proportion (50%) atteignant des gènes suppresseurs de tumeurs différents comme MGMT (35).

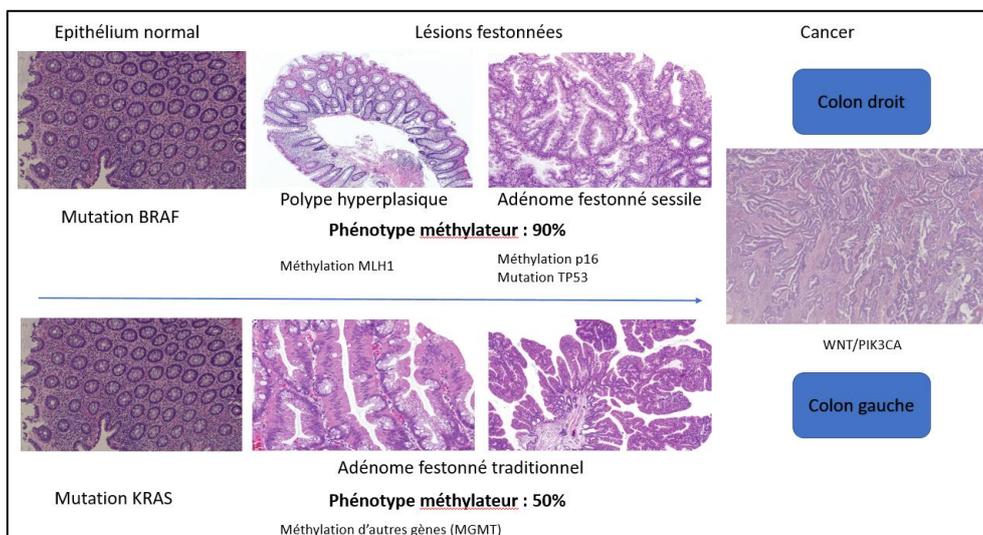


Figure 2 : Les séquences polypes festonnés/adénocarcinome. Sources photos : Rish K Pai, Christophe Rosty, Iris D. Nagtegaal. Who classification of tumours.

c – Les cancers ultra-mutés

Ces cancers présentent un nombre de mutations très importantes (>40/Mb). Il a récemment été identifié, une mutation du gène *PoIE* (Polymérase répliquative avec activité correctrice) à l'origine de cette charge mutationnelle très importante (36). Outre sa fonction de réplication de l'ADN, elle possède une fonction de correction immédiate des mutations survenant au cours de la réplication. Les cancers

ultra-mutés sont rares (1-2% des CCR) et sont associés à une sensibilité importante à l'immunothérapie. Ce profil est retrouvé dans des formes sporadiques et il a été identifié une forme héréditaire secondaire à une mutation constitutionnelle du gène *PolE*, la polypose associée aux polymérase correctrices (PPAP) (37). Il s'agit d'une maladie autosomique dominante rare, prédisposant aux polypes adénomateux, aux CCR, aux tumeurs de l'endomètre et à d'autres tumeurs malignes avec un taux de mutations accru.

d – L'instabilité microsatellitaire

L'instabilité microsatellitaire résulte de l'inactivation des gènes du système MMR, entraînant un taux de mutations très élevées (>10/10⁶ bases) et correspond donc à un profil tumoral hyper-muté. Les tumeurs MSI intéressent 15% des cancers colorectaux et sont classiquement localisées au côlon ascendant et associées à une histologie peu différenciée et une stroma réaction lymphocytaire du fait du caractère très antigénique de ces mutations. L'instabilité microsatellitaire s'observe essentiellement dans des formes sporadiques (15%) et dans une plus faible proportion des formes héréditaires, où il est le marqueur somatique du SL (2-3%).

Lors de la séquence de transformation des tumeurs MSI, l'événement génétique le plus précoce est une mutation sur un des gènes du système MMR, puis successivement interviendront d'autres altérations génétiques comme la mutation de la β -caténine, de la voie du TGF (Transforming Growth Factor) ou d'autres gènes sensiblement différents de ceux retrouvés dans la voie classique de transformation tumorale (Figure 3). Ces gènes interviennent en effet plus particulièrement dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et le cycle cellulaire.

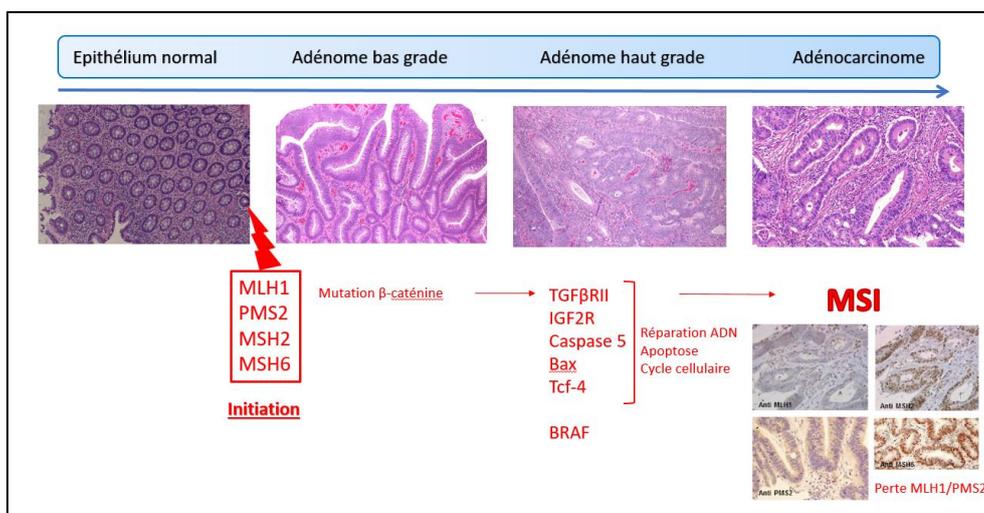


Figure 3 : Séquence de la transformation des tumeurs MSI adénome/adénocarcinome. Sources photos : Iris D. Nagtegaal et Sigurd Lax. Who classification of tumours.

Plus précisément les microsatellites, consistent en 1 à 6 séquences nucléotidiques répétées. Ces répétitions constituent environ 3 % du génome et peuvent être trouvées dans des régions codantes et non codantes (38-39). Les microsatellites sont particulièrement sujets aux erreurs de mésappariement en raison du glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication et de la réparation de l'ADN, entraînant l'insertion/délétion (indels) d'une ou plusieurs unités répétitives (40-41).

Lorsqu'une erreur est commise par l'ADN polymérase, un nucléotide incorrect est incorporé dans le brin d'ADN synthétisé, en face du brin de matrice. Cette erreur est alors responsable d'un mésappariement, c'est-à-dire la présence en vis-à-vis dans la double hélice de deux bases non complémentaires.

Le système MMR, chargé de corriger les erreurs de mésappariement lors de la réplication, implique les hétérodimères hMutS et hMutL. Le complexe hMutS comprend une protéine MSH2 et l'une des protéines secondaires, MSH6 ou MSH3, et assure la reconnaissance des nucléotides mal appariés et des petits indels. Ensuite, les hétérodimères hMutL constitués de la protéine MLH1 et de l'une des protéines secondaires PMS2, PMS1 ou MLH3 sont recrutés pour catalyser l'excision des mésappariements et la resynthèse de séquences d'ADN sans erreur (42-43) (Figure 4).

Le système MMR fonctionne en plusieurs étapes :

- Le complexe MutS reconnaît le mésappariement de paires de bases de petite taille (1 ou 2 nucléotides) et crée une pince coulissante autour de l'ADN.
- Ce complexe est ensuite lié avec le complexe MutL.
- MutL va interagir avec la protéine PCNA (*Proliferating Cellular Nuclear Antigen*) et une exonucléase-1 ; PCNA est une protéine en anneau, de la famille des clamps glissants, qui va faciliter le cheminement de l'exonucléase sur le brin d'ADN ; cette nucléase va exciser les nucléotides jusqu'au mésappariement.
- Le complexe d'élimination de la séquence pathologique va alors être détaché du brin d'ADN et une ADN-polymérase va reprendre la synthèse.
- Le nouveau fragment va être scellé au brin en cours de synthèse par l'ADN ligase-1.

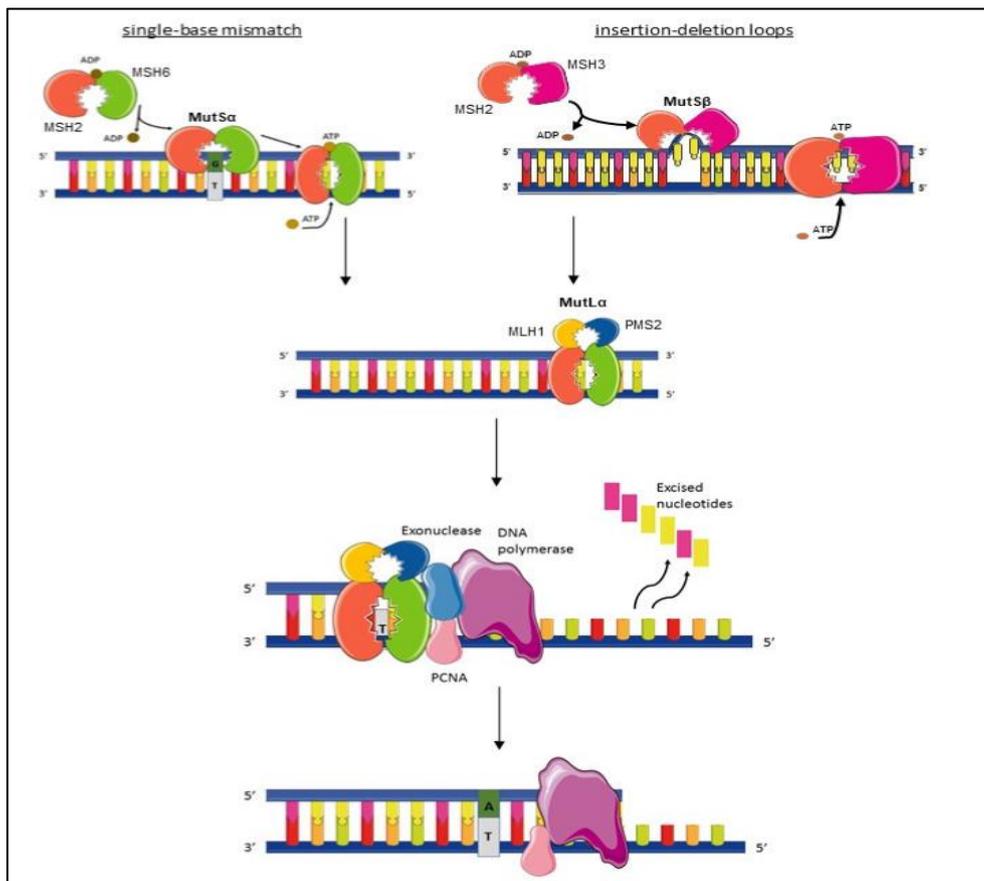


Figure 4 : Mécanisme de réparation des mésappariements (44).

Le manque de fonction des protéines MMR (principalement MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6), entraîne une possibilité accrue de mutations génétiques, de développement d'un phénotype MSI et de transformation maligne. En raison de la redondance fonctionnelle partielle des protéines secondaires, la perte isolée de ces protéines est associée à un risque plus faible de développement de tumeurs malignes et de phénotype MSI (45).

Outre les CCR, le phénotype MSI est une caractéristique de divers types de cancer, notamment endométrial (15-33%), gastrique (9-22%) et urothélial (46-47-48-49-50).

Nous l'avons vu plus haut, il existe un chevauchement entre MSI et CIMP. L'hyperméthylation du promoteur de MLH1 entraîne une perte d'expression de MLH1 et par conséquent une inactivation de la réparation des mésappariements de l'ADN. Ces tumeurs ont ainsi un phénotype méthylateur des îlots CpG avec des nombreux autres gènes inhibés par ce même mécanisme. Ce chevauchement s'observe essentiellement dans les cancers sporadiques.

En revanche dans le cadre du SL, il existe une mutation monoallélique germinale d'un des gènes du système MMR. Il s'agit donc d'une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante prédisposant aux tumeurs MSI. On parle également de syndrome HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). Les mutations de MLH1 et MSH2 représentent environ 90% des mutations alors que les mutations de MSH6 représentent 7 à 10% et les mutations de PMS2 moins de 5%. On distingue deux spectres dans le SL. Le spectre étroit avec les CCR, les tumeurs de l'endomètre, de l'intestin grêle et des voies urinaires. Le spectre large englobe en plus les cancers de l'ovaire, les glioblastomes, les tumeurs sébacées et les cholangiocarcinomes et les adénocarcinomes gastriques.

e – Classification moléculaire consensus des CCR

La classification moléculaire consensus des cancers colorectaux synthétise l'ensemble des classifications moléculaire et intègre la totalité des anomalies observées dans les CCR qu'elles soient d'origine génétique ou issues de données d'expression des gènes du transcriptome ou de dérégulation des principales voies d'oncogenèse (29).

On distingue 4 sous-groupes CMS (*Consensus Molecular Subgroup*) (51-52):

- Le CMS1 dit « immun » regroupe les tumeurs MSI, avec hyper mutabilité, hyperméthylation, mutation du gène *BRAF* et d'un point de vue transcriptomique est associé à une signature immune. Ces tumeurs sont associées à un bon pronostic en l'absence de récurrence mais il a été démontré que les tumeurs MSI étaient associées à un mauvais pronostic après rechute.
- Le CMS2 est le sous-groupe le plus fréquent, il est dit « canonique » puisque qu'on y retrouve les mutations classiques d'activation de la voie WNT, les mutations APC, KRAS... Il constitue le sous-groupe avec la meilleure survie globale.
- Le CMS3 dit « métabolique » dans lequel on retrouve les mutations KRAS, des tumeurs avec une forte instabilité chromosomique mais dont l'analyse d'expression des gènes a montré une forte dérégulation métabolique.
- Le CMS4, dit « mésenchymateux » dans lequel on retrouve l'activation de la voie TGF β , des processus d'angiogenèse, d'inflammation et de transition épithélio-mésenchymateuse. C'est le sous-groupe avec le plus mauvais pronostic avant et après rechute.

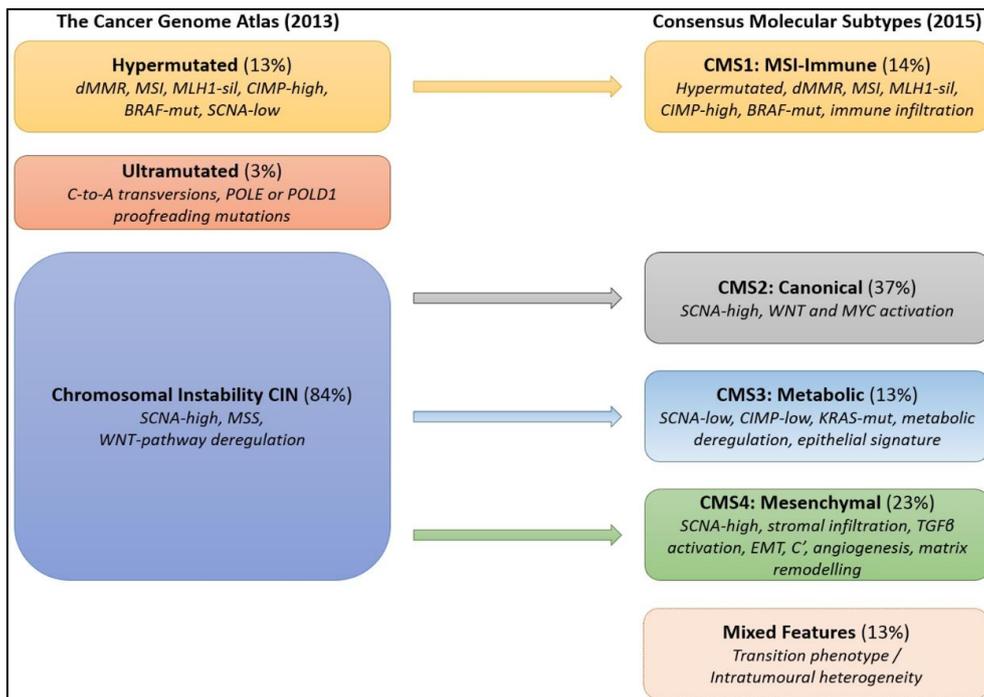


Figure 5 : Classifications génomiques et transcriptomiques des cancers colorectaux (53).

5 - Méthodes de détection du phénotype MSI

Des études récentes ont montré que la recherche du statut MMR était, outre l'orientation vers une consultation d'oncogénétique, un facteur prédictif de la réponse à certaines immunothérapies dans toutes les tumeurs solides (54). De plus, il a aussi été démontré qu'il a un impact sur le pronostic et la chimiosensibilité de certains cancers, pouvant donc influencer les choix thérapeutiques (55).

Dans le cadre du CCR, il est recommandé d'évaluer systématiquement de statut MMR tumoral, dès le diagnostic, quels que soient le stade, l'âge et le contexte personnel et familial du patient.

Les recommandations de la détermination du statut MMR tumoral au sein des tumeurs du spectre du SL (INCa, 2016) comprennent :

- L'étude de l'expression des protéines MMR en immunohistochimie (IHC)
- Et/ou l'examen de marqueurs microsatellitaires sur ADN tumoral en biologie moléculaire
- Voire la recherche d'une hyperméthylation du promoteur du gène MLH1 et la recherche de mutation BRAF pour différencier les formes sporadiques du syndrome de Lynch.

a – Etude immunohistochimique

L'étude de l'expression des protéines MMR en IHC est réalisée sur du matériel tissulaire fixé et inclus en paraffine. Il peut s'agir de biopsies ou de pièces opératoires en privilégiant dans tous les cas, si possible, l'échantillon offrant la meilleure cellularité et avant tout traitement néoadjuvant ou d'induction (56).

La détermination du statut MMR-IHC repose sur l'utilisation de quatre anticorps dirigés contre les quatre protéines MMR : MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6.

Il existe 4 profils d'expression possibles des protéines MMR, avec 6 combinaisons possibles de perte d'expression des protéines MMR et donc de tumeurs dMMR-IHC :

- Expression normale des 4 protéines (pMMR-IHC).
- Expression anormale de protéines MMR :
 - Perte d'expression conjointe de MLH1 et de PMS2.
 - Perte d'expression conjointe de MSH6 et de MSH2.
 - Perte d'expression isolée de PMS2.
 - Perte d'expression isolée de MSH6.
 - Perte d'expression clonale de protéines MMR.
 - Perte d'expression complexe (autres que celles décrites ci-dessus).
- Expression équivoque (indéterminée ou douteuse).
- Non interprétable.

On parle alors de phénotype dMMR (MMR déficient) en cas de perte d'une protéine MMR en IHC et de phénotype pMMR (MMR proficient) en cas d'expression normale des quatre protéines MMR.

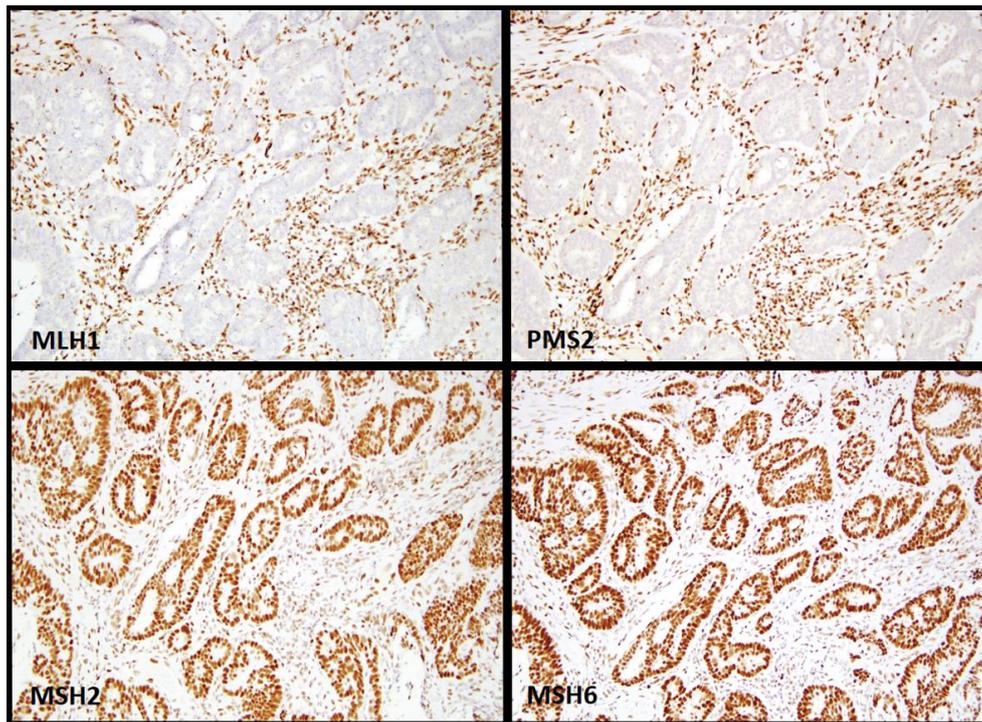


Photo 11 : Un exemple d'immunomarquage dMMR (source photo : Wendy L Frankel) : MLH1 conservé (marquage nucléaire) (A), MSH2 perdu (B), MSH6 perdu (C) et PMS2 conservé (marquage nucléaire) (D), témoins internes positifs pour les quatre marqueurs (57).

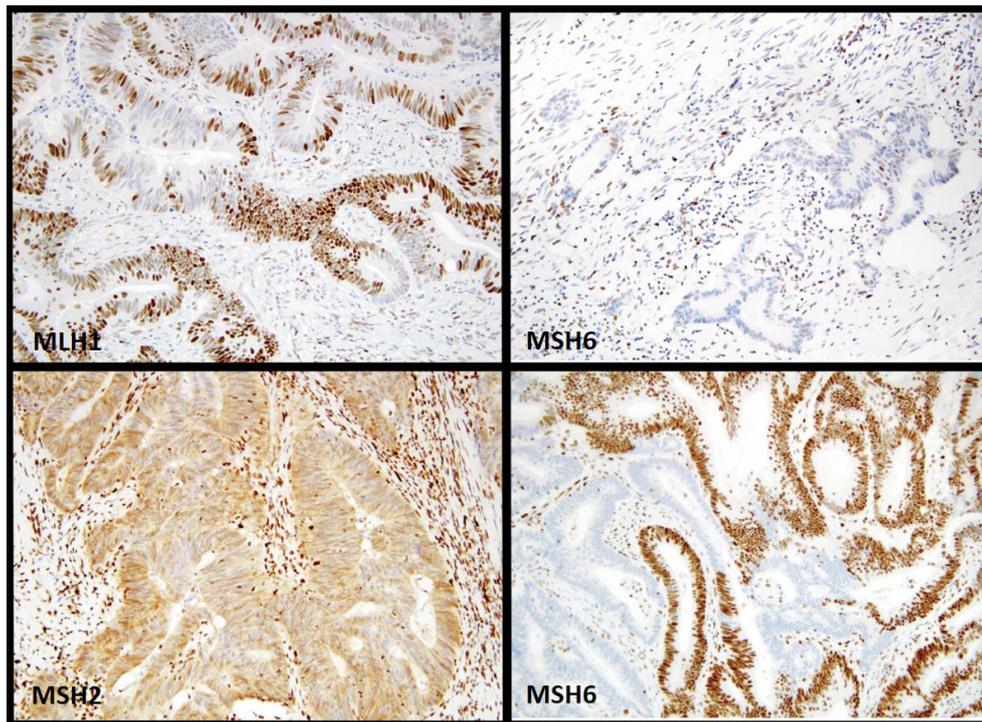


Photo 12 : Quatre exemples d'immunomarquages MMR particuliers (source photo : Wendy L Frankel). La coloration inégale de MLH1 doit être interprétée comme intacte dans ce cancer stable aux microsatellites. L'expression cytoplasmique de MSH2 sans coloration nucléaire doit être interprétée comme une perte d'expression. Une expression faible et inégale de MSH6 (en haut à droite) dans le cancer rectal après un traitement néoadjuvant doit être interprétée comme intacte ; aucune mutation germinale MSH6 identifiée. Un schéma hétérogène de coloration pour MSH6 (en bas à droite), présent dans une zone et perdu dans une autre, avec un excellent contrôle interne dans les deux, doit être interprété comme intact ; aucune mutation germinale MSH6 dans aucune des deux zones.

Il est indispensable de s'assurer de la présence de témoins internes positifs à savoir le stroma et les éléments lymphoïdes ; une absence de marquage traduit alors le plus souvent un défaut technique. Autre point, la comparaison de l'intensité d'expression entre les éléments tumoraux et sains intervient également dans l'interprétation. L'expression doit en effet être plus intense et diffuse sur les éléments tumoraux. Une diminution marquée dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines, traduit une expression équivoque et ne permet pas de conclure sans analyse en biologie moléculaire. Cependant une perte totale d'expression MMR dans le tissu tumoral et le tissu sain est possible dans de très rares cas de syndrome MMR déficient constitutionnel ou CMMRD (*constitutional mismatch repair deficiency syndrome*) avec mutation biallélique d'un gène MMR.

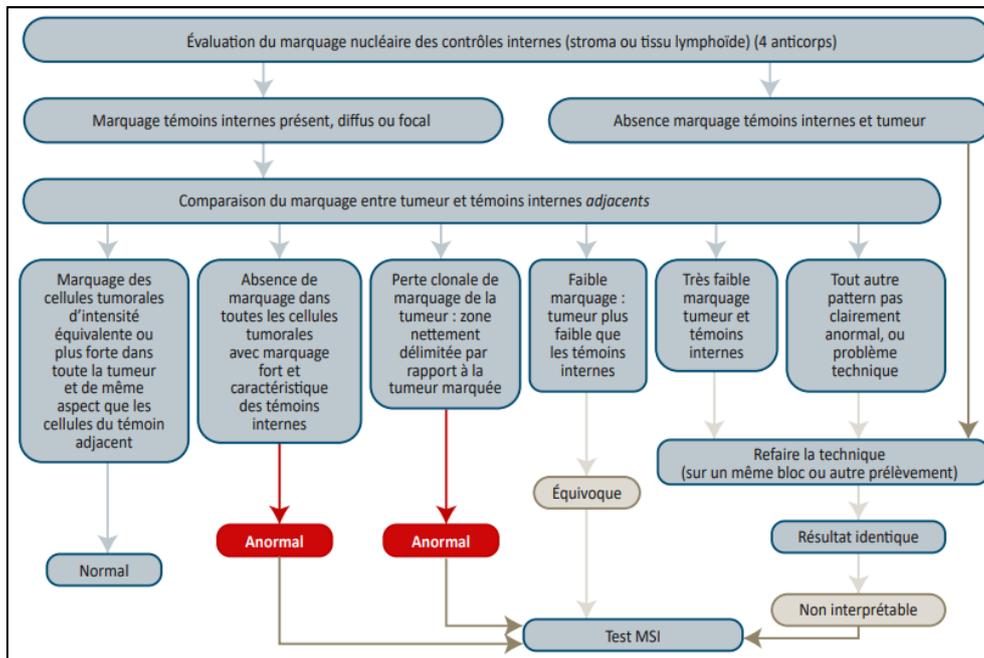


Figure 6 : Outil décisionnel pour l'interprétation des immunomarquages des protéines MMR dans les tumeurs (Sari et al., 2019).

Il est recommandé de confirmer toutes les pertes d'expression de protéines MMR, quel que soit le profil d'expression, ainsi que les immunomarquages complexes, équivoques (douteux) et non interprétables, par la recherche d'une instabilité microsatellitaire en biologie moléculaire, adaptée au type tumoral.

Une consultation d'oncogénétique est recommandée en cas de perte d'expression combinée de MSH2 et MSH6 ou de perte d'expression isolée de MSH6 ou de PMS2. En revanche, comme nous l'avons vu précédemment, la détection de la perte d'expression de MLH1 n'étant pas spécifique, il est recommandé de réaliser une analyse complémentaire en biologie moléculaire à la recherche notamment d'une hyperméthylation du promoteur de MLH1, ou d'une association avec une mutation BRAF, avant d'orienter le patient vers une consultation d'oncogénétique.

b – Etude en biologie moléculaire

La recherche MSI en biologie moléculaire est réalisée à partir d'un échantillon d'ADN extrait à partir de la tumeur, selon les recommandations, avec le panel NCI ou Pentaplex (BAT25, BAT26, NR21, NR22 ou NR27/Mono-27, NR24).

Le seuil de 2 marqueurs instables sur 5 pour définir une tumeur comme MSI permet d'obtenir avec le NCI-Pentaplex une sensibilité optimale. En cas de 2 marqueurs instables sur 5, il est recommandé de réaliser une analyse comparative avec de l'ADN de tissu sain pour déterminer s'il s'agit d'un profil d'instabilité microsatellitaire ou d'un profil lié à un polymorphisme. En l'absence de tissu sain pour analyse comparative, un résultat avec seulement 2 marqueurs instables n'est pas interprétable et nécessite une confrontation aux résultats d'immunohistochimie. Il est alors recommandé d'appliquer le seuil de 3 marqueurs instables sur 5 pour définir une tumeur comme MSI (Figure 7).

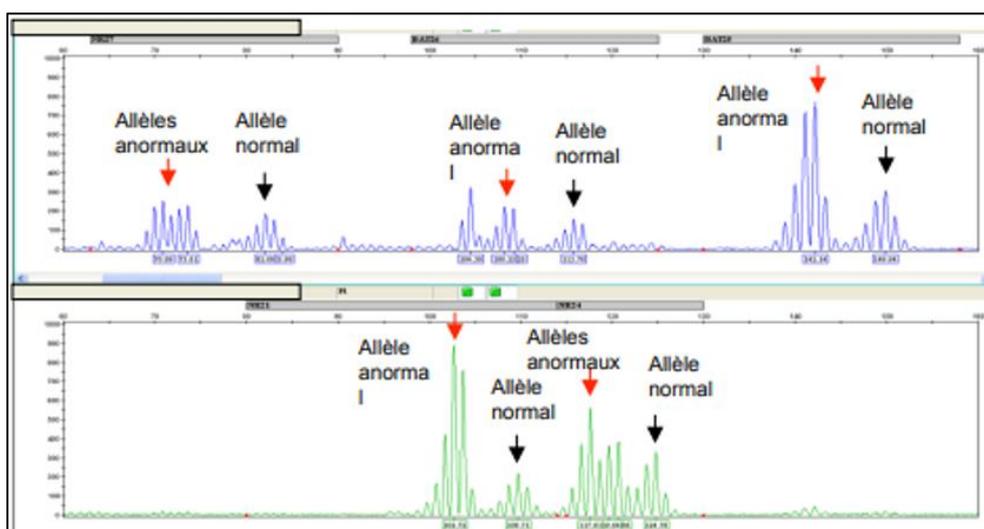


Figure 7 : Electrophorogramme présentant une tumeur instable sur les 5 marqueurs.

En cas de contexte clinique évocateur d'un SL, une absence d'instabilité microsatellitaire n'élimine pas complètement la possibilité d'un SL, même après comparaison avec un tissu sain et il conviendra alors de confronter ces résultats avec ceux de l'IHC.

Enfin comme évoqué plus haut, en cas de contexte évocateur d'un SL, il est actuellement recommandé de rechercher une hyperméthylation du promoteur de MLH1 ainsi qu'une mutation BRAF. Il ne faut pas oublier que ces deux aspects n'ont pas de spécificité absolue permettant d'exclure un SL.

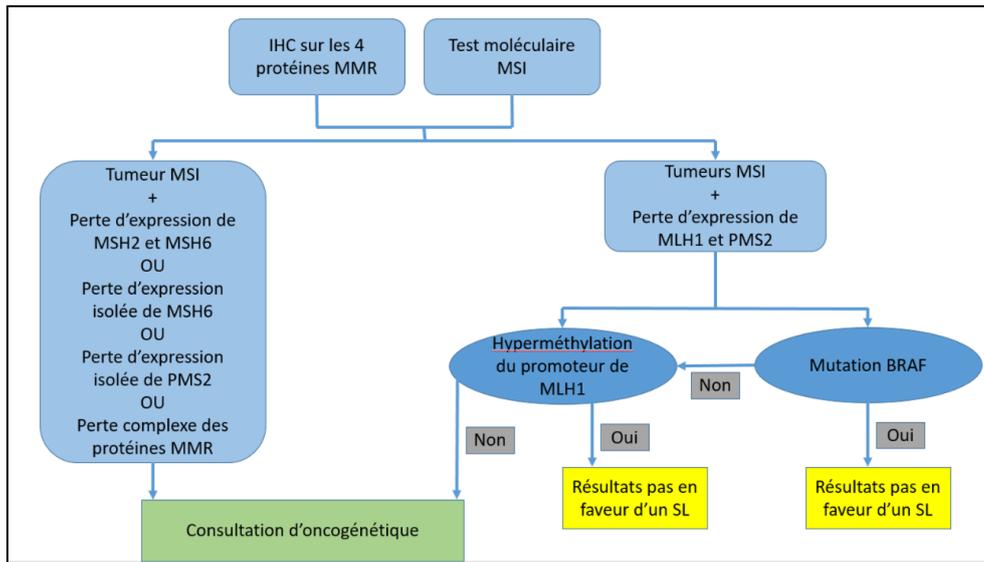


Figure 8 : Indication de consultation oncogénétique dans les CCR en fonction des résultats des tests somatiques. A noter que des résultats discordants doivent faire discuter la réalisation de nouveaux tests et faire l'objet d'une discussion en centre expert en cas de persistance.

6 – Impact pronostic et thérapeutique du statut MSI sur les cancers colorectaux

Comme nous l'avons vu précédemment, outre le diagnostic du SL et l'inscription de ces patients dans des programmes de dépistages spécifiques, la détermination du statut MSI est importante et obligatoire à tous les stades en raison de son impact pronostique et théranostique notamment depuis l'émergence des ICI (inhibiteurs des points de contrôle immunitaire).

a – Impact pronostic

L'impact pronostic diffère selon le stade du CCR notamment son caractère localisé ou métastatique. Dans les stades localisés les CCR MSI sont de meilleurs pronostics par rapport aux CCR MSS.

Le statut MSI est ainsi le seul facteur moléculaire à prendre en compte chez les patients atteints d'un CCR localisé de stade II réséqué, avant d'initier un traitement adjuvant. En effet, un taux de récurrence inférieur à 10 % à 10 ans rapporté chez ces patients dans une première publication en 2004 a été confirmé dans des séries plus larges d'essais randomisés, comme l'essai QUASAR (58-59).

Plusieurs publications ont remis en question le meilleur pronostic associé aux MSI chez les patients de stade III, et il est désormais clairement limité aux patients présentant un CCR de stade III à faible risque tel que défini par le consortium IDEA (T1–3 N1) (60). La méta-analyse du groupe ACCENT confirme que

les patients avec des tumeurs dMMR/MSI traités par chirurgie seule ont un avantage en SSR et en SG plus important pour les tumeurs de stades II que celles de stade III (61).

Treatment	TTR					OS				
	5-yr recurrence-free rate		HR	95% CI	p	5-yr survival rate		HR	95% CI	p
	dMMR	pMMR				dMMR	pMMR			
Stage II										
Surgery alone (n=307)	89%	74%	0.27	0.10 - 0.75	.012	90%	78%	0.27	0.10 - 0.74	.011
5FU-mrx (n=1155)	88%	83%	0.81	0.55 - 1.19	.285	88%	87%	0.87	0.61 - 1.26	.469
Stage III										
Surgery alone (n=264)	60%	47%	0.59	0.28 - 1.23	.162	59%	54%	0.69	0.35 - 1.36	.283
5FU-mrx (n=2723)	72%	64%	0.80	0.66 - 0.97	.025	77%	71%	0.79	0.65 - 0.97	.023

Tableau 2 : résultats de la méta-analyse ACCENT.

Chez les patients de stade III récidivants après une chimiothérapie adjuvante, le phénotype MSI/dMMR était associé à une meilleure survie après récurrence par rapport au MSS/pMMR. Dans ce contexte la mutation BRAF V600E était un facteur de mauvais pronostic pour les patients MSI/dMMR et MSS/pMMR (62).

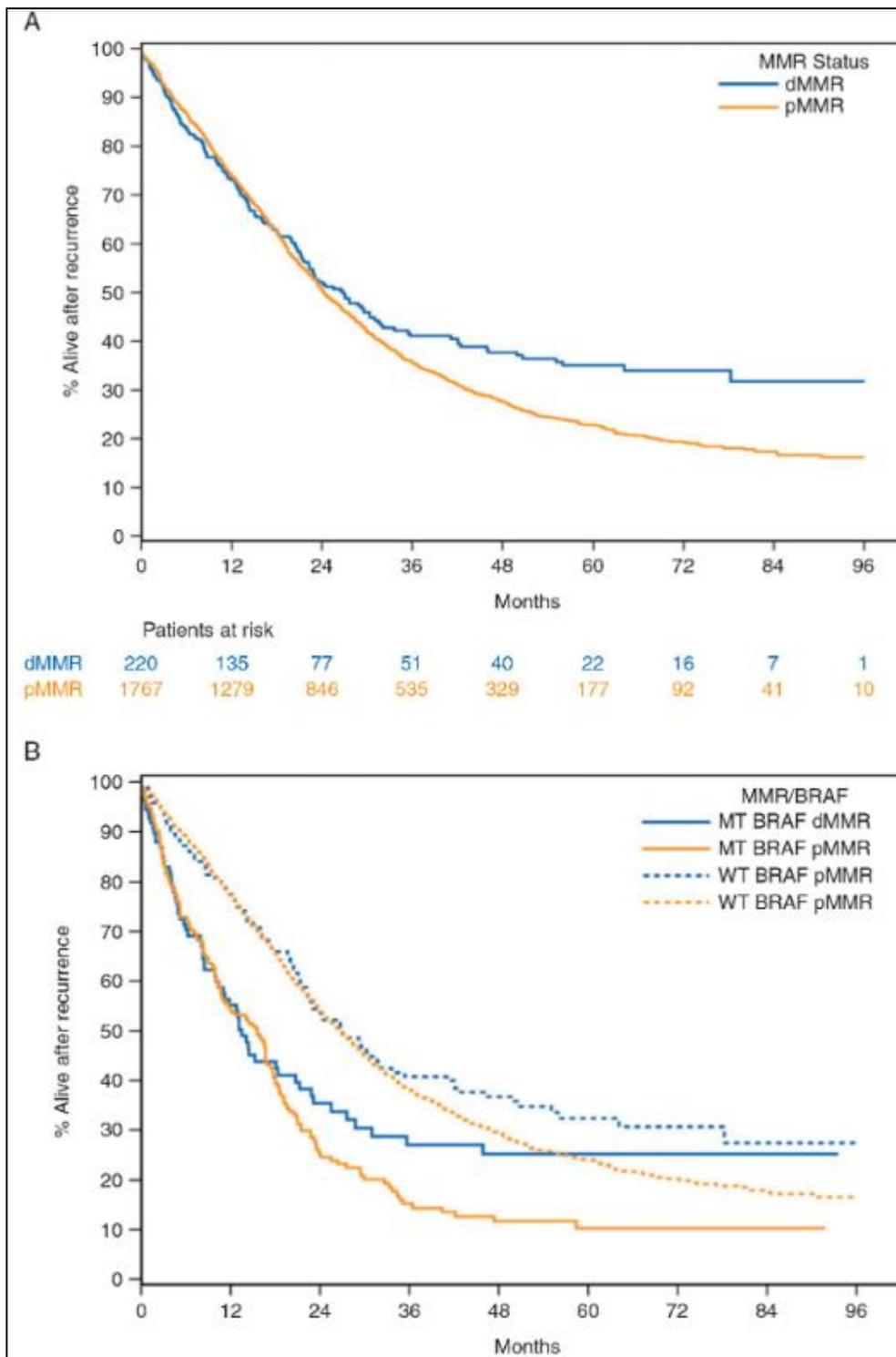


Figure 9 : Survie après récidence chez les patients atteints d'un cancer du côlon réséqué de stade III selon le statut mutationnel MMR et BRAF (62).

L'avantage que confère le statut dMMR/MSI diminue donc selon l'avancée de la maladie et semble même s'inverser au stade métastatique avec une diminution de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients présentant une tumeur dMMR/MSI, comparés aux tumeurs

pMMR/MSS (63). Ces résultats sont à mettre en relation avec le statut BRAF car les mutations de BRAF V600E sont de très mauvais pronostic au stade métastatique. Les tumeurs MSI présentent plus fréquemment la mutation BRAF V600E que les tumeurs MSS (respectivement 20 à 70 % et 5 à 10 %). Ainsi, le mauvais pronostic observé chez les patients atteints de CCR métastatique MSI est en partie lié à l'impact négatif de la mutation *BRAF* V600E.

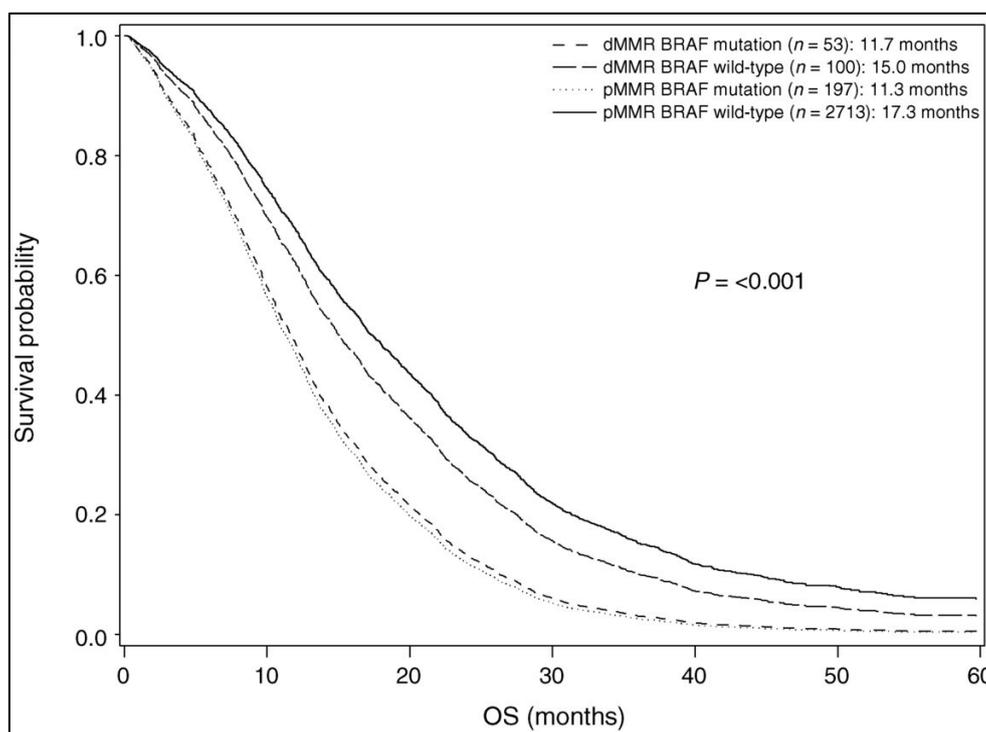


Figure 10 : Courbe de survie globale en fonction des statuts MSI et BRAF (63).

b – Réponse à la chimiothérapie

Il a été suggéré qu'un traitement adjuvant par 5-fluorouracile (5-FU) pourrait être inefficace voire délétère chez les patients atteints de CCR MSI de stade II (64). On retrouve cette absence d'efficacité de la chimiothérapie adjuvante par 5-FU seul dans les stades II, dans la méta-analyse du groupe ACCENT (60) qui n'était cependant pas délétère par rapport à la chirurgie seule. Cette chimiorésistance, s'ajoutant au bon pronostic des CCR dMMR/MSI de stade II, confirme l'absence d'indication à une chimiothérapie adjuvante par 5FU dans ce cas, exception faite des tumeurs infiltrant les organes de voisinage T4b ou comprenant des facteurs de mauvais pronostic histologique.

Dans le CRC MSI de stade III, l'étude rétrospective menée par Tougeron et al. a montré que l'ajout d'Oxaliplatine au 5FU pourrait restaurer l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante, avec un bénéfice sur la survie sans récurrence (64). La méta-analyse ACCENT a confirmé les résultats de l'essai MOSAIC

selon lesquels l'association d'Oxaliplatine au 5FU améliore la SSR et la SG dans les CCR MSI de stade III. Il est à noter qu'aucun effet néfaste significatif du traitement néoadjuvant par 5FU n'a été observé.

Le CCR MSI métastatique traité par chimiothérapie standard présente un pronostic plus péjoratif que celui du CCR MSS métastatique avec une survie sans progression plus courte (63). De plus aucune amélioration de la SSP n'a été constatée quel que soit la chimiothérapie (5-fluorouracile seul ou en association avec l'Irinotécan ou l'Oxaliplatine), ou les thérapies anti-angiogéniques ou ciblant l'EGFR pouvant être en lien, là aussi, avec un statut BRAF qui majore la chimiorésistance (66).

c – Réponse à l'immunothérapie

Comme nous l'avons vu précédemment, les tumeurs MSI accumulent de nombreuses mutations entraînant la synthèse de multiples néoantigènes aberrants, conséquence du décalage du cadre de lecture. Ces néoantigènes retrouvés à la surface des cellules tumorales sont responsables du caractère immunogène des CCR MSI par rapport aux CCR MSS, avec une potentielle réaction immunitaire antitumorale. Ce point est à l'origine des particularités anatomopathologiques de certains CCR MSI renfermant un dense infiltrat inflammatoire lymphocytaire. Physiologiquement l'activité de ces lymphocytes est régulée par des phénomènes d'immuno-modulation via les « *immune CheckPoint* » ou points de contrôle immunitaire (ICP) provoquant un épuisement de la réponse immunitaire, avec une diminution de la prolifération lymphocytaire et de leur activité cytotoxique. Ce sont ces propriétés dont vont se doter certaines cellules tumorales afin de contrecarrer l'activité immunitaire antitumorale.

Ces dernières années, le traitement des cancers par immunothérapie s'est largement étendu en oncologie. Ces thérapies permettent d'agir sur les interactions négatives entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses qui existent dans la plupart des cancers via l'expression des ICP de costimulation négative. Différents traitements et mécanismes d'action ont prouvé leur efficacité dans la prise en charge de plusieurs types de tumeurs solides.

Le pembrolizumab et le Nivolumab sont des anticorps monoclonaux qui ciblent le récepteur PD1 (*programmed cell death protein-1*) des lymphocytes T (LT) activés et empêchent son interaction avec la molécule PDL1 (*programmed death-ligand 1*) à la surface des cellules tumorales. L'Ipilimumab est un anticorps monoclonal développé pour cibler CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). Il empêche la liaison de CTLA-4 à B7 et restaure ainsi la fonction de ces lymphocytes cytotoxiques dirigés contre les cellules tumorales (67).

De nombreuses études avec des résultats souvent positifs ont été menées :

Dans le cadre du mélanome métastatique une première étude pivot publiée en 2010, comparait l'Ipilimumab seul versus Ipilimumab + vaccination (GP100) versus vaccination seule. La médiane de survie était de 10,1 mois et 10 mois dans les deux premiers groupes et de 6,4 mois pour le dernier groupe traité par vaccination seule (68). Par la suite les anti-PD-1 comme le Nivolumab et le Pembrolizumab ont également montré des résultats spectaculaires en termes d'amélioration de la survie globale et ces deux anticorps ont actuellement l'AMM en France pour les patients atteints de mélanome métastatique, quel que soit le statut mutationnel de BRAF.

Les ICI ont également révolutionné le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) avec des essais montrant une amélioration significative de la SPP et de la SG chez des patients métastatiques (69).

Concernant le CCR, les premiers résultats des essais étudiant les ICI, ont montré des réponses plus modestes que celles observées dans d'autres types de cancer comme le mélanome et le CPNPC que nous venons de voir.

La première étude menée est un essai de phase II (NICHE). Elle mettait en évidence que le statut MSI prédisait l'efficacité de l'immunothérapie dans le CCR MSI en contexte métastatique, en montrant que les CRC MSI étaient sensibles au pembrolizumab par rapport au MSS CRC (Figure 16) (70).

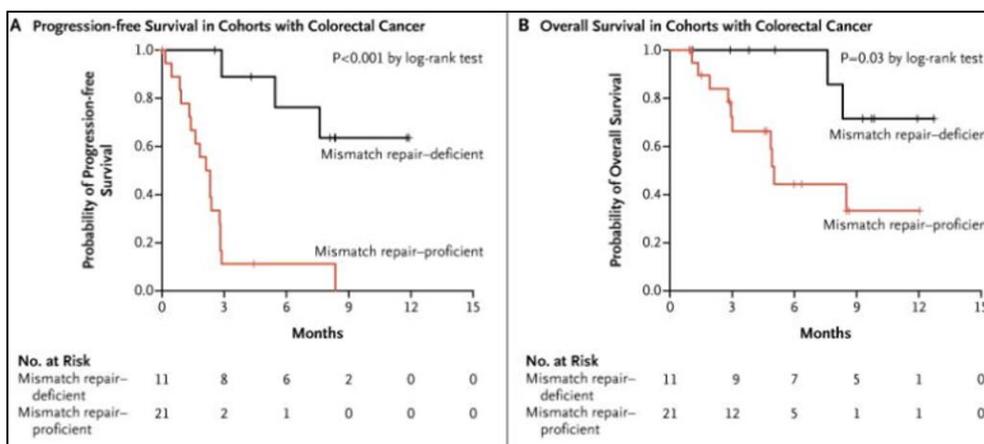


Figure 11 : Courbes de SSP (A) et de SG (B) chez les patients atteints de CCR MSI vs MSS (70).

On peut également citer l'étude de phase II CheckMate-142, montrant l'efficacité du NIVOLUMAB associé à l'IPILIMUMAB chez les patients atteints d'un CCR dMMR/MSI métastatique préalablement traité avec un contrôle de la maladie chez 80% des patients avec un taux de réponse complète de 13%. La durée médiane de réponse n'a pas été atteinte ; 74 % des patients répondeurs avaient des réponses

toujours en cours à la date d'analyse des données. La survie médiane sans progression et la survie globale médiane n'ont pas été atteintes avec un suivi minimum de 24,2 mois (taux à 24 mois de 74 % et 79 %, respectivement) (Figure 16)(71).

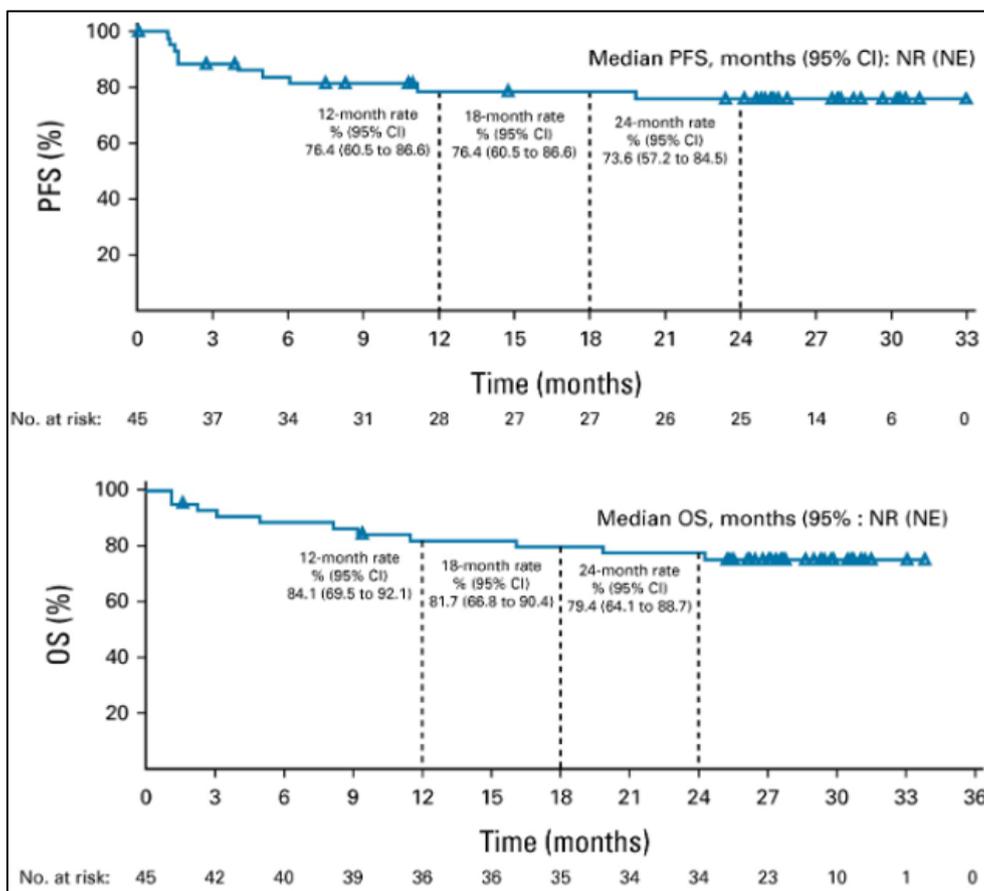


Figure 12 : Courbes de SSP (PFS) et SG (OS) essai CheckMate-142 (71).

L'étude KeyNote-177 démontre l'efficacité du Pembrolizumab par rapport à une chimiothérapie standard, en traitement de première ligne métastatique. Cette étude a atteint l'un de ses co-critères principaux avec une SSP médiane dans le groupe pembrolizumab qui était deux fois plus longue que dans le groupe chimiothérapie standard (16,5 mois avec le pembrolizumab et 8,2 mois avec la chimiothérapie). Les pourcentages estimés de patients vivants et sans progression à 12 mois et à 24 mois étaient respectivement de 55,3 % et 48,3 % dans le groupe pembrolizumab et 37,3 % et 18,6 %, respectivement, dans le groupe chimiothérapie (Figure 17). Ces résultats ont conduit à une autorisation de mise sur le marché (AMM) du pembrolizumab en traitement de première intention (72).

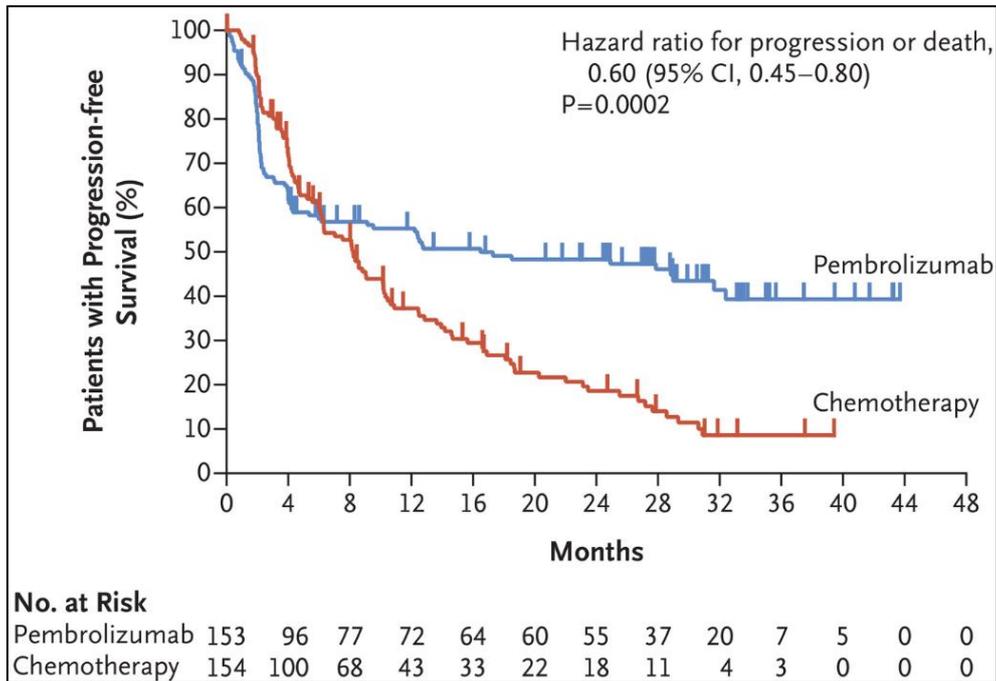


Figure 13 : SPP chez les patients atteints d'un CCRm MSI/dMMR, KeyNote-177 (72).

L'essai randomisé de phase II PRODIGE 54-SAMCO évalue, chez les patients atteints de CCRm MSI/dMMR le bénéfice de l'Avelumab (un anti-PDL-1), après échec d'un traitement standard en première intention, par rapport aux traitements standards de deuxième intention. Les pourcentages estimés de patients en vie et sans progression étaient de 31,2 % (IC à 95 % : 20,1 % - 42,9 %) à 12 mois et de 27,4 % (IC à 95 % : 16,8 % - 39,0 %) à 18 mois dans le groupe Avelumab ; les pourcentages estimés étaient de 19,4 % (IC à 95 %, 10,6 %-30,2 %) à 12 mois et de 9,1 % (IC à 95 %, 3,2 %-18,8 %) à 18 mois dans le groupe chimiothérapie (Figure 18). La durée de survie moyenne était également en faveur de l'Avelumab, 12,3 mois (IC à 95 %, 8,7-15,8) dans le groupe Avelumab vs 8,1 mois (IC à 95 %, 6,2-10,0) dans le groupe chimiothérapie après 36 mois de suivi (73).

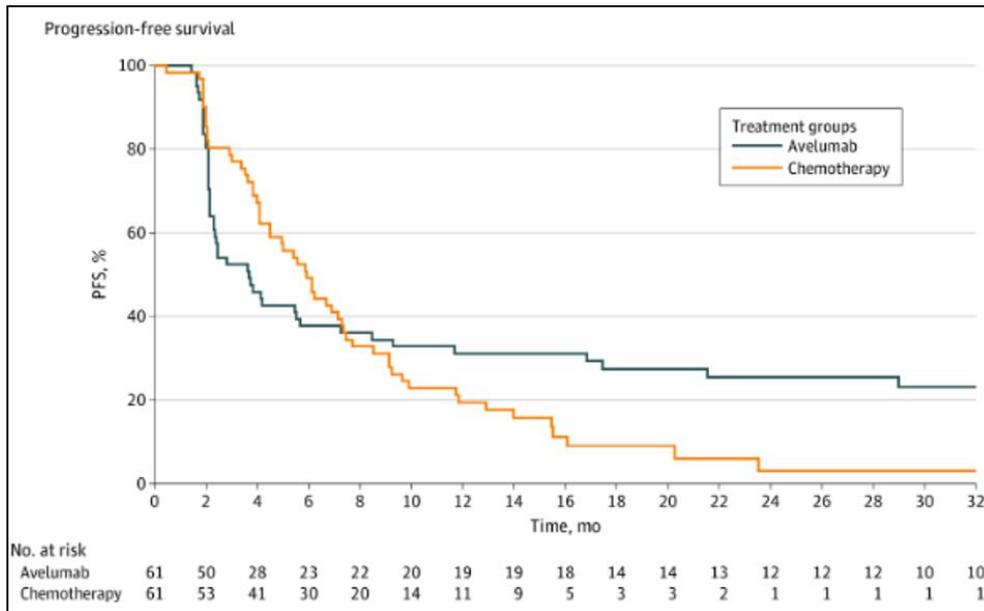


Figure 14 : Survie sans progression dans le groupe Avelumab vs chimiothérapie (73).

Enfin les premiers résultats de l'essai de phase III CheckMate H8W comparant l'efficacité de l'association de Nivolumab et Ipilimumab versus chimiothérapie standard en première ligne du CCRm MSI/dMMR, ont montré une amélioration significative de la SSP avec une réduction de 79% du risque de progression ou de décès (Figure 20) (74).

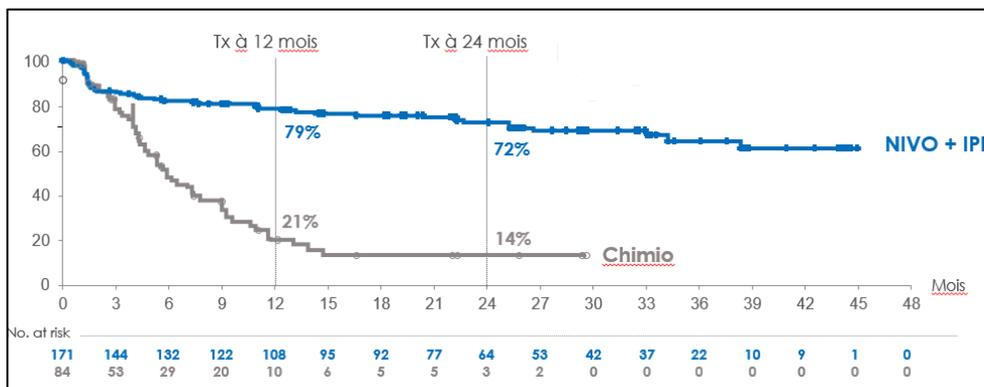


Figure 15 : SSP, Nivolumab et Ipilimumab versus chimiothérapie en L1 CCRm MSI, essai CheckMate 8HW (74).

d – Résistance à l'immunothérapie

Ces résultats favorables sont nuancés par des phénomènes de résistances primaires ou acquises aux ICI. Ainsi, entre 12 % et 30 % des tumeurs MSI présentent une résistance primaire aux ICI (70-71) et environ 5 à 10 % des patients présentent une maladie hyper progressive, définie comme une progression RECIST lors de la première évaluation et comme une augmentation ≥ 2 fois du taux de

croissance tumorale (75). Chez d'autres patients, les lésions cibles augmentent en taille, ou d'autres lésions peuvent même apparaître, avant de diminuer ultérieurement en taille. Cette réponse atypique rare est appelée pseudo-progression (estimée à environ 4 %).

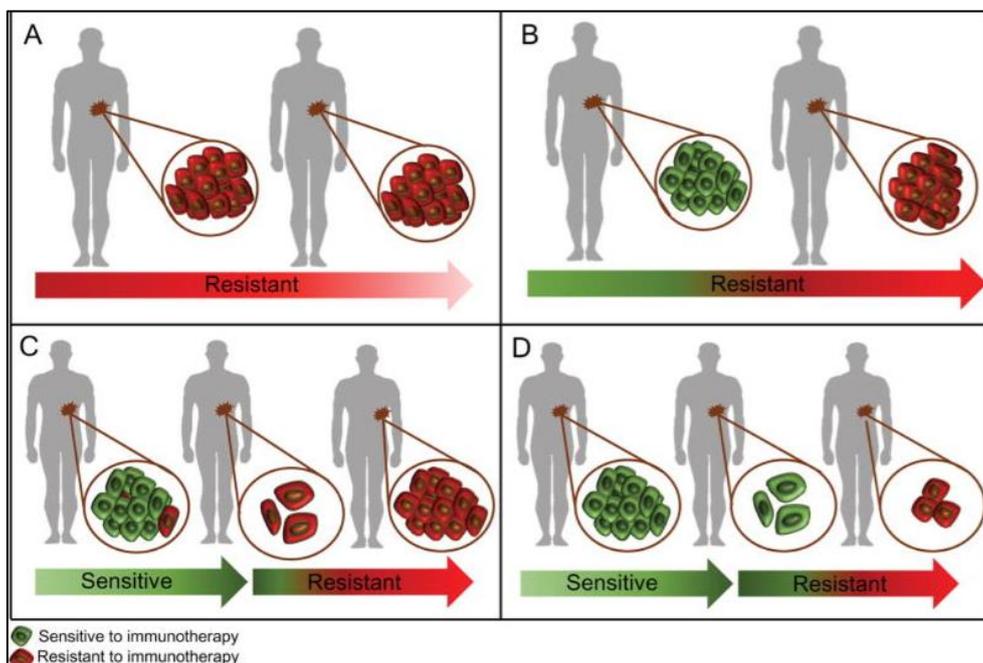


Figure 16 : Schémas de résistance primaire, adaptative et acquise à l'immunothérapie. (A) résistance primaire. (B) Réponse initialement active puis désactivée par des mécanismes de résistance adaptative. C Réponse initialement active puis nouvelle progression par sélection de clones résistants. (D) Réponse initialement active puis résistance acquise. (76).

Dans les cas de résistance primaire, une explication peut être une erreur initiale dans la détermination du statut MSI en biologie moléculaire et/ou MMR en IHC, puisqu'on estime que près de 10% des CCRm détectés comme MSI/dMMR sont des faux positifs (77).

Dans le cancer gastro-intestinal métastatique MSI, une étude AGEO a analysé rétrospectivement l'efficacité et l'innocuité des ICI (majoritairement par anti-PD-1) et identifié les variables cliniques associées aux résistances primaires. 25,5% des patients ont présenté une résistance primaire. En analyse multivariée, elle était associée à un ECOG-PS ≥ 2 , des métastases hépatiques, des métastases péritonéales, ≥ 1 ligne de traitement antérieure et un âge ≤ 50 ans (78).

Certains patients peuvent présenter d'authentiques résistances secondaires aux ICI (Figure 20) (79), après contrôle initial de la maladie. Également connue sous le nom d'échappement immunitaire, cette résistance se produit lorsque les cellules cancéreuses développent des mécanismes pour éviter ou contourner les effets des traitements. Un des mécanismes développés par les cellules cancéreuses

que nous détaillerons par la suite est l'expression accrue des ICP tels que LAG3, TIM3 ou TIGIT, entraînant une inactivation des lymphocytes T et contournant ainsi les effets des immunothérapies ciblant les ICP. Les cellules cancéreuses peuvent également recruter des cellules immunosuppressives, tels que les LTregs par l'intermédiaire de cytokines ou de facteurs de croissance, supprimant ainsi l'activité des LT et leur activité anti-tumorale. Un autre mécanisme intervient au niveau des voies de signalisation intracellulaire des LT avec des altérations génétiques ou épigénétiques occasionnées par les cellules tumorales. Enfin l'hétérogénéité tumorale génétique et épigénétique, avec différentes sous-populations de cellules tumorales pouvant avoir des sensibilités différentes aux immunothérapies, avec une possible effet de sélection au fil du temps.

Dans le mélanome avancé, 25 à 35 % des premiers répondeurs au Pembrolizumab ont rechuté dans les 2 à 3 ans au cours du suivi (80). Dans le CPNPC, 34 à 37 % des premiers répondeurs au Nivolumab ont rechuté au cours des 2 ans de suivi (81). Par ailleurs, il a été démontré que 30 à 50% des patients en rechute qui ont arrêté le traitement après une réponse clinique initiale ont de nouveau répondu au traitement lors de la réintroduction (82).

Dans les CCRm MSI traités par ICI, plusieurs études se sont intéressées aux valeurs pronostiques (liées aux notamment à la présence des mutations RAS/BRAF ou associées au SL), à la prédiction de la réponse et de l'efficacité au blocage des ICP. Une étude a ainsi démontré que les mutations RAS et BRAF n'ont pas d'impact sur le pronostic des patients traités par ICI. Le CCR associé au syndrome de Lynch pourrait avoir une meilleure survie que le CCR sporadique (Figure 21) (83).

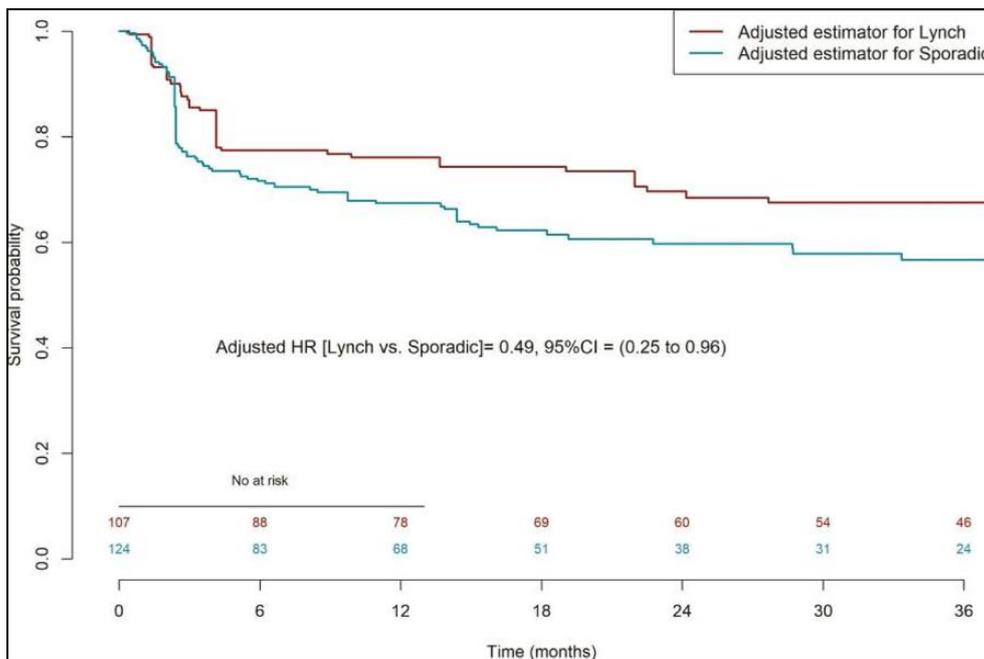


Figure 17 : SSP chez les patients atteints du syndrome de Lynch versus et CRC MSI-H/dMMR sporadique (83).

D'un point de vue transcriptomique, le séquençage de l'ARN tumorale/TME a été réalisé dans deux cohortes de patients atteints d'un CCRm MSI traité par ICI. Trois groupes ont été identifiés avec différentes compositions de cellules et capacités prolifératives associés à différents pronostics (84). Dans le même cadre, une autre étude a démontré que la SSP pouvait être prédite en analysant simplement l'état mutationnel des gènes contenant des microsatellites d'ADN dans les cellules tumorales ainsi que des marqueurs d'ARN du stroma fibreux desmoplasique liés au TGFB (85).

7 – Réponse immunitaire anti-tumorale et points de contrôle immunitaire

Comme nous l'avons dit plus haut, les cancers MSI accumulent de nombreuses mutations, conduisant à la synthèse de peptides anormaux avec des néo antigènes potentiels à la surface des cellules cancéreuses, ce qui peut déclencher une réaction immunitaire locale, avec des lymphocytes T (LT) CD4 et cytotoxiques, comme en témoigne le nombre élevé de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) trouvés dans les tumeurs MSI (86). Ces lymphocytes intra tumoraux et une réaction de type Crohn sont d'ailleurs associés à un meilleur pronostic (87) et sont caractéristiques des tumeurs MSI (88). Un examen standardisé de la présence de lymphocytes sur le front invasif de la tumeur, utilisant l'immunohistochimie avec des marqueurs T comme CD3 et CD8, a montré que cette caractéristique avait un impact pronostique important (89).

a – Mécanismes d'action

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans la défense antitumorale.

Il fait intervenir :

- L'immunité innée représentée par un ensemble d'éléments inflammatoires constitué par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), les cellules dendritiques (CD), les lymphocytes Natural Killer (NK), les monocytes, les macrophages, les polynucléaires et les mastocytes.
- L'immunité adaptative : à médiation cellulaire (Lymphocytes B (LB)) et humorale (LT CD4+, LT CD8+, LTreg).

Trois phases séquentielles ont été décrites (90) :

- Phase d'élimination : elle correspond à l'immunosurveillance où il existe une activation du système immunitaire conduisant à une destruction des cellules tumorales.
- Phase d'équilibre : le système immunitaire sélectionne, entraîne la génération de nouveaux variants de cellules tumorales moins immunogènes, capables de survivre aux attaques du système immunitaire. Cependant, il permet encore un contrôle de la croissance tumorale.
- Phase d'évasion : la tumeur est alors capable de croître sans restriction, ayant acquis des mécanismes d'échappement.

La réponse immunitaire est ainsi possible grâce à une succession d'événements (Figure 8) :

- Première étape : libération des antigènes capturés par les CD en périphérie.
- Deuxième étape : présentation des antigènes après migration vers les organes lymphoïdes secondaires. Les CPA expriment à leur surface des molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I et II qui lient les peptides antigéniques.
- Troisième étape : activation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. Les LT naïfs s'activent grâce à 3 signaux donnés par une CPA, essentiels à leur différenciation, leur fonction et leur survie :
- Premier signal d'activation : le récepteur des LT spécifiques de l'antigène (TCR) lie les complexes antigènes peptidiques-CMH étrangers. La reconnaissance de l'antigène par les cellules T CD8+ est restreinte aux molécules HLA-I tandis que les lymphocytes T CD4+ sont activés par les peptides couplés aux molécules HLA-II. Une synapse immunologique se forme entre le LT et la

CPA, ce qui permet d'induire les voies de signalisations nécessaires à l'activation, la différenciation et la maturation du LT naïf en LT effecteur. Le contact entre le LT et la CPA est stabilisé par des molécules d'adhésion.

- Deuxième signal : signal de costimulation appelé aussi signal danger, indépendante de l'antigène : le récepteur CD28 présent à la surface du LT se lie aux molécules co stimulatrices B7 (CD80 (B7-1) /CD86 (B7-2)) exprimées à la surface des CPA. En effet, ces ligands sont associés au stress cellulaire leur permettant de différencier le « soi normal et le soi altéré ».
- Troisième signal : signal cytokinique permettant la polarisation des LT : ces cytokines vont participer à la différenciation des LT CD4 naïfs, en LT auxiliaires (T helper ou Th). Elle sera différente suivant les cytokines produites par la CPA qui l'active :
- IL-2, IFN- γ et TNF- β permettant une différenciation Th1 qui produisent à leur tour IL-2, IFN- γ et TNF- β .
- IL-4 permettant une différenciation Th2 qui produisent IL-4, IL-10 et IL-13
- IL-2 et TGF : LTregs exercent des fonctions immunosuppressives en sécrétant de l'IL-10 et du TGF.

Ces signaux vont permettre l'activation des LT CD4+ qui vont eux-mêmes stimuler des LT CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux. Ces lymphocytes CD8+ vont sécréter de l'INF- γ cytostatique et détruire directement les cellules tumorales.

- Quatrième étape : migration des lymphocytes : les LT migrent dans les vaisseaux vers la périphérie de la tumeur.
- Cinquième étape : infiltration des lymphocytes dans la tumeur.
- Sixième étape : fixation aux cellules de la tumeur.
- Septième étape : destruction des cellules cancéreuses.

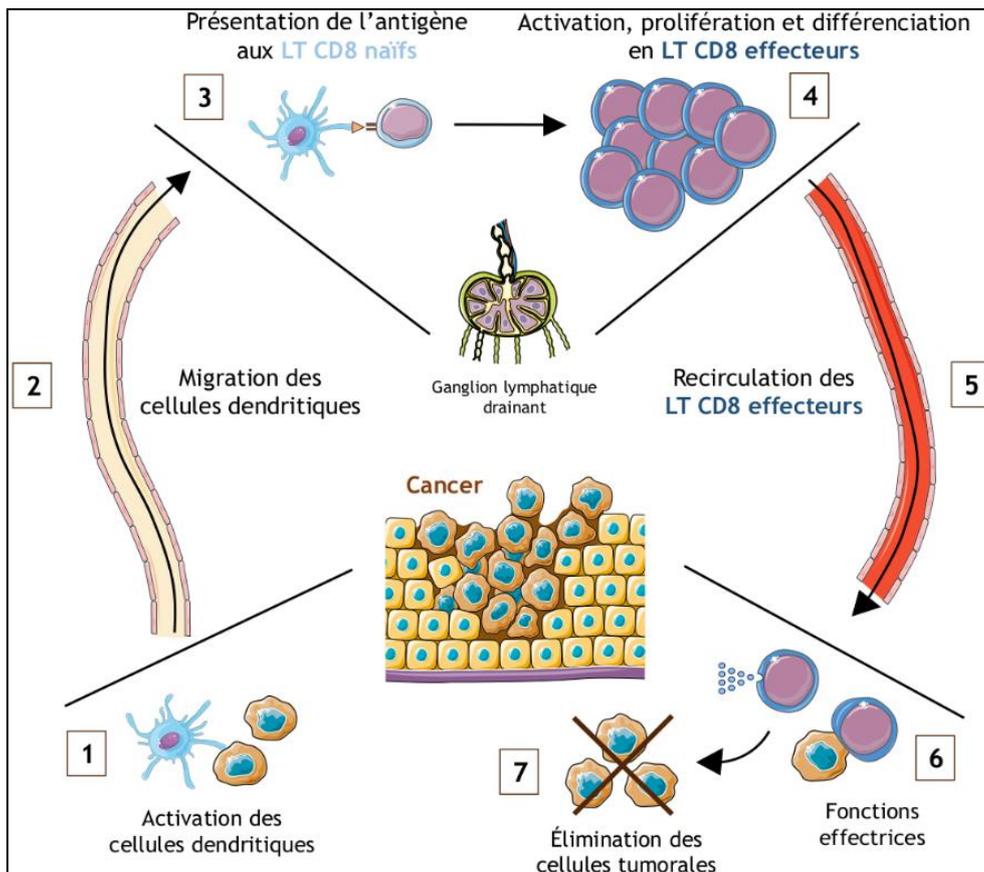


Figure 18 : Réponse immunitaire antitumorale (image M. Calvez).

b – Points de contrôle immunitaire

Les ICP sont des mécanismes physiologiques qui régulent l'activation des cellules immunitaires, en particulier les LT, afin d'éviter une réponse immunitaire excessive pouvant aboutir à des lymphoproliférations ou maladies auto-immunes.

En effet, certains récepteurs de surface des cellules immunitaires, appelés récepteurs de point de contrôle immunitaire, peuvent inhiber l'activité des lymphocytes pro-inflammatoires, après liaison avec des ligands spécifiques.

Les ICP font intervenir des molécules de costimulations qui peuvent être activatrices (stimulant la réponse immunitaire) ou inhibitrices (supprimant la réponse immunitaire).

Les cellules tumorales peuvent exploiter ces mécanismes pour échapper à la surveillance du système immunitaire en exprimant, par exemple, des niveaux élevés de molécules de costimulations inhibitrices, tels PDL-1 qui se lie au récepteur PD-1 sur les LT, inhibant ainsi leur activité antitumorale. Ce processus crée un environnement immunosuppresseur qui favorise ainsi la croissance tumorale.

Ainsi, les ICI tels que les anticorps anti-PD-1, ont montré une efficacité significative notamment dans les CCR MSI avancés ou métastatiques. Ces médicaments réactivent les LT renforçant la réponse immunitaire antitumorale.

Cependant, tous les patients atteints de CCR MSI ne répondent pas de la même manière à l'immunothérapie et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de résistance et d'identifier les biomarqueurs prédictifs de réponse.

1 - Structures et mécanismes d'action.

a – PD1/PDL1

La protéine de mort programmée 1 (PD1 ou CD279), est une protéine de point de contrôle de la famille CD28 décrite pour la première fois au début des années 1990 (91).

Il s'agit d'un groupe de récepteurs exprimés par les LT suppresseurs (CD4+ et CD8+) régulés positivement par la stimulation des antigènes et des cytokines, également exprimé par les LB, les monocytes et les CD (92).

PDL1 (ou CD274) est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de la famille des ligands B7. Il joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction des LT dans les CD et autres cellules présentatrices d'antigènes. Comme vu plus haut, PD-1 est exprimé par les LT activés et se lie à son ligand, PDL-1, exprimé par les cellules tumorales. Cette interaction inhibe l'activation des LT, entraînant une absence d'immunoréaction et même l'apoptose des LT (93).

Il inhibe également les cellules T infiltrant les tumeurs (TIL CD4+/CD8+) et entraîne une diminution des cytokines, notamment le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IFN- γ et l'Interleukine-2 (IL-2) (94).

La thérapie anti-PD1/PDL1 empêche la combinaison entre PD1 et PDL1, réactive efficacement les cellules immunitaires et déclenche une réponse immunitaire antitumorale.

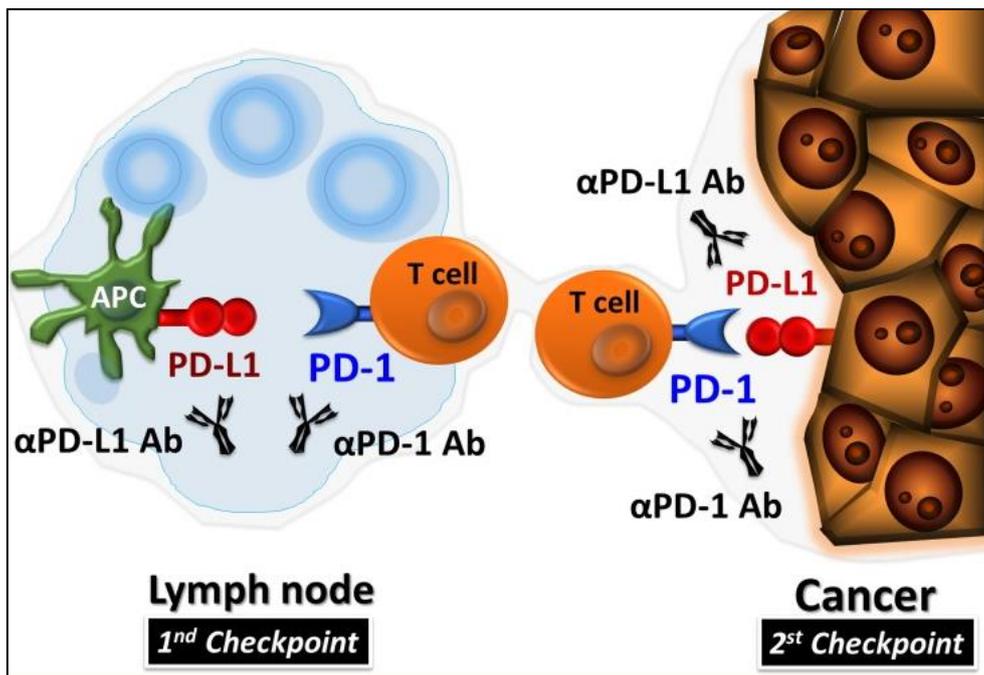


Figure 19 : Inhibiteurs PD1/PDL1 dans le microenvironnement tissulaire (TME) (95).

b – CTLA4

CTLA-4 (ou CD152) est le principal atténuateur des réponses immunitaires adaptatives et la molécule la plus importante et la plus étudiée dans ce domaine. Elle a été la première molécule ciblée avec succès pour la thérapie par point de contrôle immunitaire (96).

CTLA-4 appartient à la famille des immunoglobulines et son fonctionnement est étroitement lié au récepteur co-stimulateur CD28 dont l'expression constitutive englobe la grande majorité des cellules T (97). En raison de cette homologie, CTLA-4 se lie aux mêmes ligands que CD28, à savoir CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimés par les CPA mais avec une affinité plus élevée (98). L'interaction de CD28 avec CD80/CD86 fournit un signal activateur essentiel pour l'activation et la prolifération des LT. En entrant en compétition, CTLA-4 exerce une régulation négative.

Il est exprimé au niveau des LT cytotoxiques CD8+, des LT auxiliaires CD4+ mais également des LTregs. Plus précisément, les LT CD4 + humains présentent une expression de surface CTLA-4 plus élevée et prolongée que leurs homologues CD8 + (99).

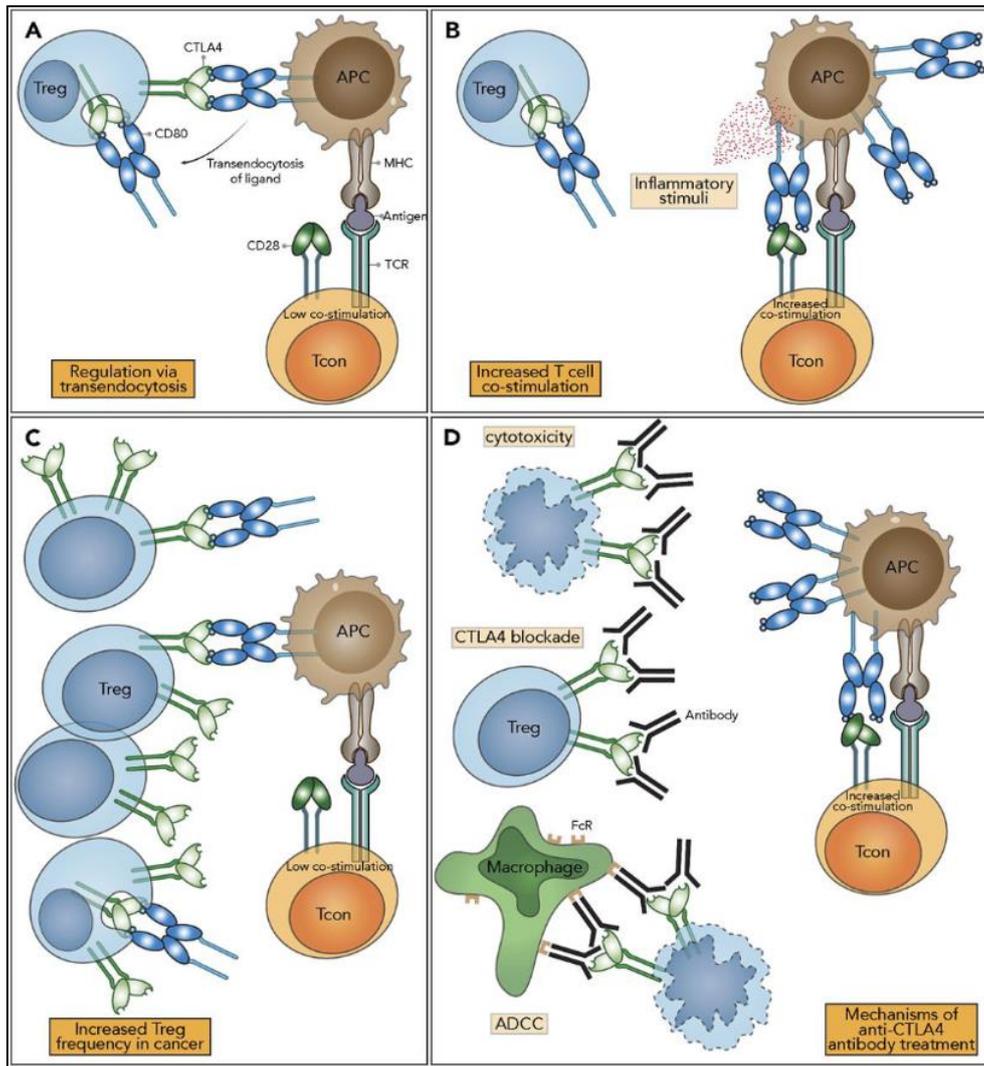


Figure 20 : Fonction de CTLA-4 et conséquence du blocage. (A) de manière physiologique les LTregs expriment CTLA-4 qui se lie au CD80 et au CD86 sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA avec une affinité plus forte que le CD28. Les ligand CD80/CD86 sont éliminés par transendocytose empêchant ainsi la stimulation des LT via le CD28. (B) Lorsque le système immunitaire est stimulé, les CPA régulent positivement l'expression de CD80/CD86 et surmontent ainsi le contrôle par les LTregs et permettant la prolifération des LT. (C) L'abondance des Tregs dans le TME conduit à la suppression des réponses immunitaires. (D) Les anticorps anti-CTLA-4 entraînent une déplétion ou un blocage des LTregs conduisant à une activation augmentée des LT et des réponses immunitaires antitumorales (100).

Alors que CTLA-4 est exprimé de manière constitutive à la surface des LTregs, il ne devient détectable à la surface des cellules T conventionnelles qu'après leur activation (101). Les molécules de CTLA-4 sont

à ce niveau présentent à l'intérieur des vésicules intracellulaires et ne sont transportées à la surface que lors de la reconnaissance de l'antigène spécifique par le TCR.

Lorsque les CPA migrent vers les ganglions lymphatiques, elles présentent ces antigènes aux lymphocytes T. Cette interaction déclenche des signaux qui inhibent l'activation et la prolifération des LT. Cette modulation de la costimulation négative de CTLA-4 dans les ganglions lymphatiques peut être exploitée pour renforcer la réponse immunitaire antitumorale.

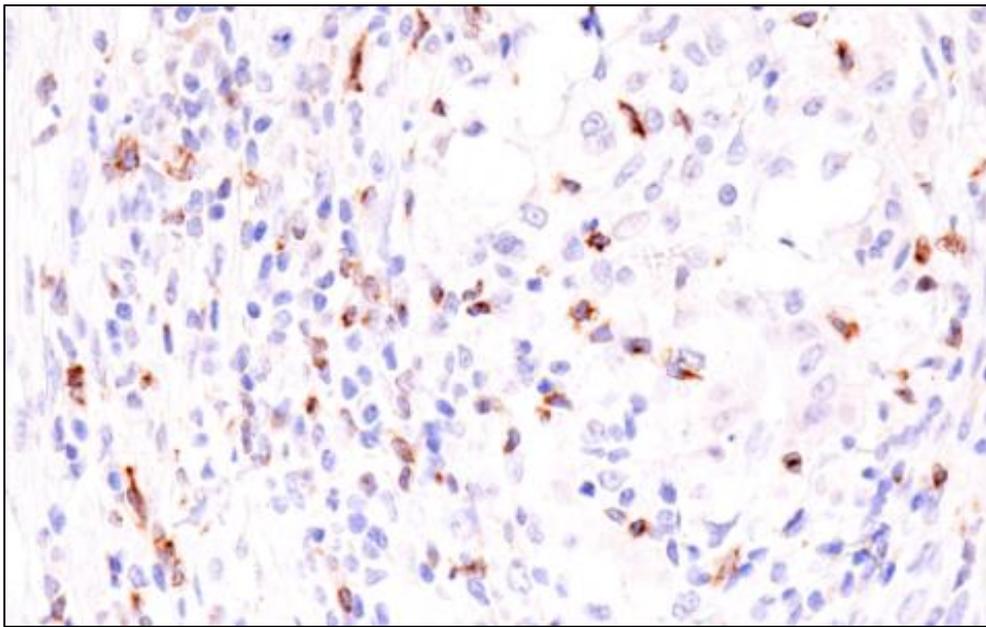


Photo 13 : étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-CTLA-4 (E2V1Z) sur un carcinome colique (photo CellSignaling).

c – LAG3

De manière comparable à PD-1 et CTLA-4, LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) joue un rôle régulateur dans le système immunitaire entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire, de la fonction immunitaire, de la sécrétion de cytokines et de l'homéostasie (102).

LAG-3 est exprimé par différents sous-ensembles de LT tels que les LT CD4 T helper (Th) activés, les LT CD8 cytotoxiques (CTL) (103). LAG-3 a également été décrit comme étant exprimé par des sous-ensembles cellules NK.

L'expression de LAG-3 dans les cellules T est généralement considérée comme un marqueur de progression agressive dans un large spectre de tumeurs humaines notamment le cancer colorectal (104).

Son expression est induite par la stimulation du TCR en association avec le complexe TCR:CD3 au niveau de la membrane des cellules T et régule négativement la transduction du signal TCR, qui à son tour met fin à la prolifération cellulaire et à la sécrétion de cytokines (102). En tant qu'homologue de CD4, LAG3 partage seulement 20% de similarité en termes d'acides aminés (AA) (105). Il se compose de 4 domaines extracellulaires, nommés D1, D2, D3 et D4. D4 étant situé plus près de la surface cellulaire et D1 étant le plus distal. Les domaines D1 et D2 sont tous deux nécessaires et suffisants pour la liaison de LAG3 au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (106). Une boucle supplémentaire de 30 AA au niveau de D1 pourrait être impliquée dans la liaison puisque des mutations ponctuelles dans cette région peuvent l'améliorer ou la réduire, tandis que sa suppression bloque la liaison. Lors de la liaison du ligand, LAG3 inhibe les premières étapes de la voie du TCR de manière dépendante du domaine cytoplasmique avec un motif "KIEELE" de LAG3 empêchant l'activation des facteurs de transcription (notamment NFAT) ainsi que la production de cytokines. La manière dont ce signal se transmet reste largement inconnue (Figure 12).

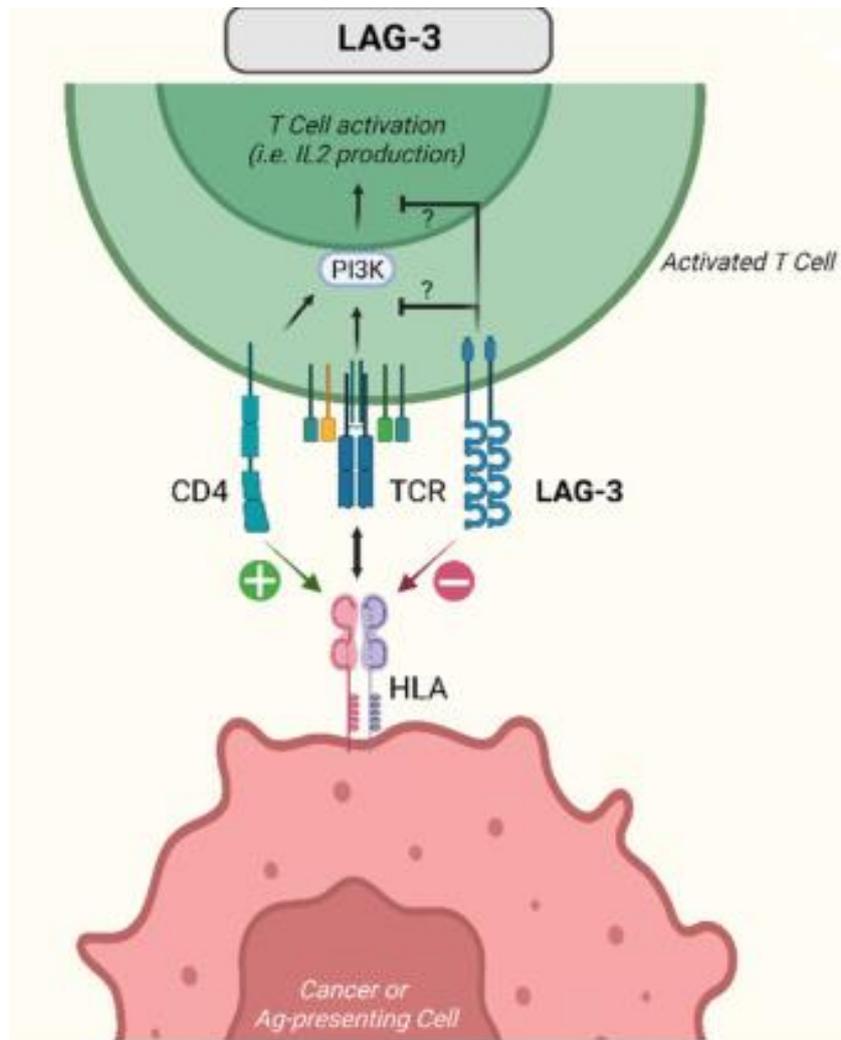


Figure 21 : Interactions de ligands et analogies structurales de LAG3 et CD4.

Le blocage de LAG3 a démontré la capacité d'améliorer l'efficacité du blocage de PD-1 dans de nombreux modèles (107). Il a en effet été démontré dans différents modèles expérimentaux que LAG-3 et PD-1 sont coexprimés dans les TIL provenant de tumeurs en progression et que leur co-blocage a des effets synergiques contre l'inactivation de la réponse immunitaire, une réponse antitumorale accrue et prolifération accrue des LT (108).

d – TIM-3

La protéine TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) est une protéine transmembranaire découverte au début des années 2000 (109).

TIM-3 joue un rôle clé dans l'immunorégulation et est retrouvé à la surface des LT helper de type 1 (Th1), puis des lymphocytes cytotoxiques, des monocytes, des macrophages, des cellules NK et des CD (110).

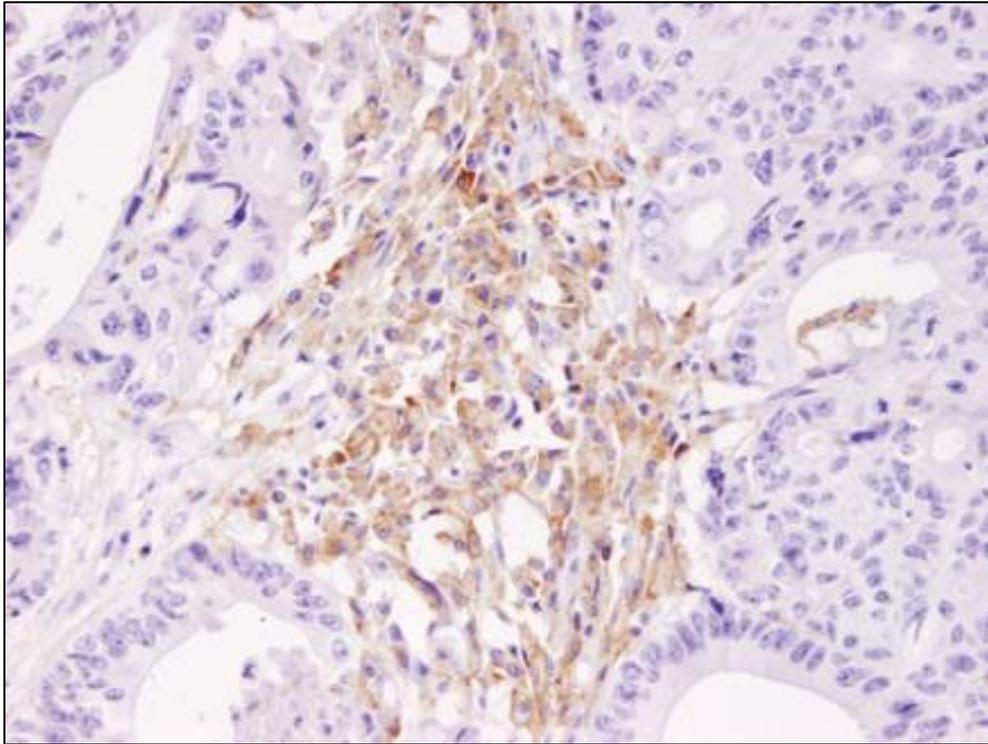


Photo 14 : Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti-TIM-3 (D5D5R) sur un adénocarcinome colique (photo CellSignaling).

Les membres de la famille TIM sont des glycoprotéines de surface de type I qui partagent des structures moléculaires similaires contenant un domaine mucine, un domaine variable d'immunoglobuline amino-terminal (V domain) avec cinq cystéines non canoniques, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (111). Une caractéristique clé est sa capacité à se lier à des ligands spécifiques, qui activent des voies biochimiques. Ceux-ci incluent la galectine-9 (Gal-9), la molécule d'adhésion cellulaire antigène embryonnaire du cancer 1 (CEACAM1), la phosphatidylsérine (PtdSer), la protéine de groupe à haute mobilité 1 (HMGB-1) (112).

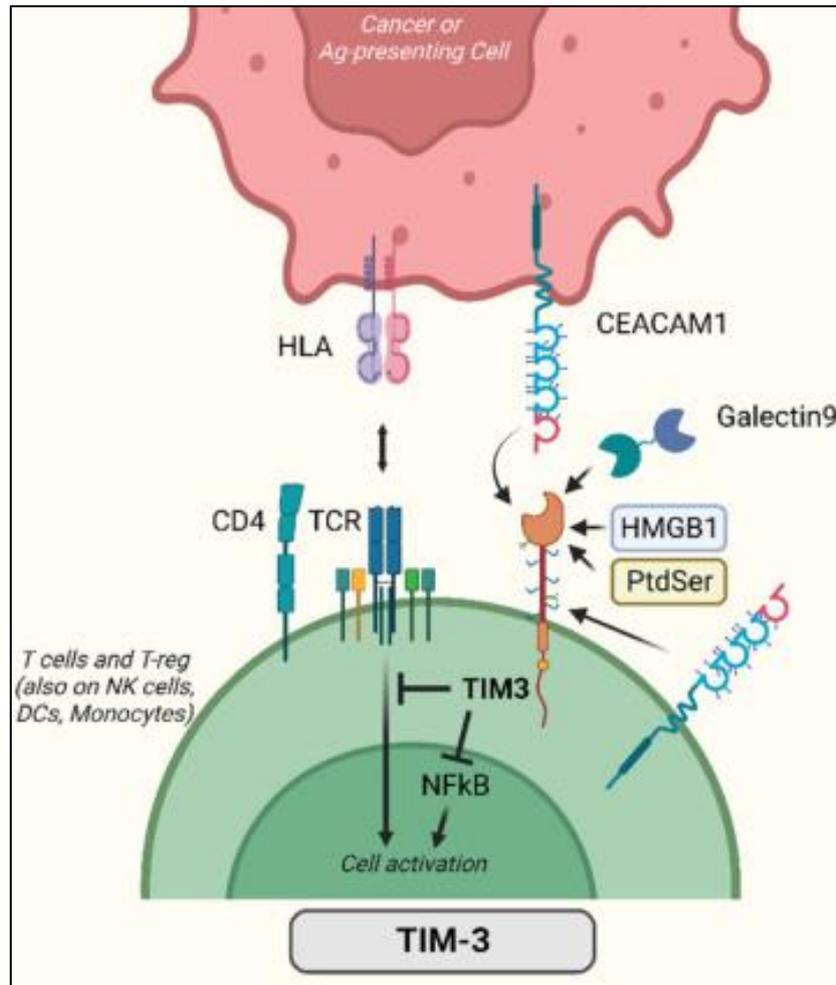


Figure 22 : Structure et fonction de TIM-3 et de ses ligands.

Les LT CD8⁺ migrent vers les sites tumoraux pour éliminer les cellules tumorales. A mesure que les LT CD8⁺ augmentent dans la tumeur on constate une augmentation de l'expression de TIM-3 dans le microenvironnement tumoral. Comme déjà évoqué, la présence de LT intra-tumoraux est en corrélation avec une survie prolongée (113-114-115). Cependant, l'induction des ICI au cours de la réponse des LT CD8⁺ aux cellules tumorales entraîne un épuisement des LT CD8⁺ contribuant à la progression de la tumeur (116-117-118). Les LT CD8⁺ infiltrant la tumeur expriment des molécules co-inhibitrices telles que TIM-3, souvent coexprimé avec PD-1. TIM-3 et PD-1 sont désormais fortement considérés comme des marqueurs d'épuisement des LT CD8⁺ dans les tumeurs (119).

Chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif localement avancé, l'expression de TIM3 au niveau des TIL était associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (120).

Des études précliniques n'ont montré aucune amélioration de la survie chez des souris porteuses d'un cancer de l'ovaire après traitement anti-TIM3 (121).

Un essai de phase 1b, a évalué l'innocuité et l'activité antitumorale d'un anti-PDL-1 en monothérapie ou en association avec un anti-TIM3, chez des patients atteints de tumeurs solides MSI à un stade avancé (essentiellement cancers colorectaux et endométriaux). Les patients présentant des tumeurs résistantes ou réfractaires aux anti-PD-1/PDL-1 ont reçu l'association, les autres patients sans traitement préalable ont reçu soit l'association soit la monothérapie. Les deux schémas ont montré des réponses prometteuses contre les tumeurs naïves anti-PD1/PDL-1 mais des bénéfices limités chez les patients atteints de tumeurs préalablement résistantes (122).

Une autre étude a révélé une expression accrue de TIM3 dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et que son expression était corrélée aux métastases ganglionnaires et à la récurrence du cancer sans corrélation à la survie globale (123).

D'autres études ont indiqué que TIM3 était positivement corrélé à la survie globale notamment dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (124) et qu'un niveau d'expression plus élevé de TIM3 était associé à un pronostic péjoratif dans le carcinome rénal (125).

Dans les néoplasmes neuroendocrines gastro-intestinaux, l'expression de TIM-3 était de 4,9% (4 patients sur 83) et il a été identifié une corrélation avec l'expression de PDL-1 (126).

e – TIGIT

TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) découvert en 2009, appartient à une famille en constante expansion de protéines de type PVR (récepteur du virus de la polio) (127).

TIGIT est exprimé sur les cellules NK et les cellules T, y compris les cellules T CD4 +, les cellules T CD8 + et les Tregs (127-128).

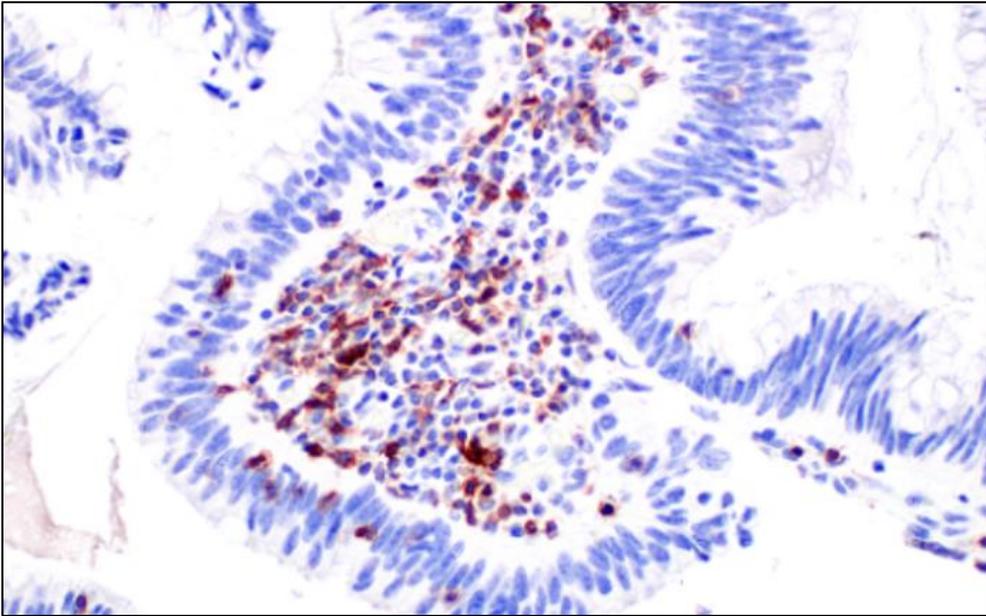


Photo 15 : Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti-TIGIT (ESY1W) sur un adénocarcinome colique (photo CellSignaling).

Il se compose d'un domaine variable d'immunoglobuline extracellulaire, d'un domaine transmembranaire de type I et d'un court domaine intracellulaire avec un motif inhibiteur à base de tyrosine d'immunorécepteur (ITIM) et un motif de type queue de tyrosine d'immunoglobuline (ITT) (127-128).

TIGIT possède trois ligands, CD155, CD112 et CD113 (ces deux derniers avec une moindre affinité), qui appartiennent tous à une famille de molécules NECL (récepteurs de la nectine et des protéines de type nectine). Cette famille regroupe des molécules de surface cellulaire qui interviennent dans l'adhésion cellulaire, la polarisation cellulaire et l'organisation des tissus, et plusieurs membres fonctionnent également comme récepteurs de l'herpès et du poliovirus.

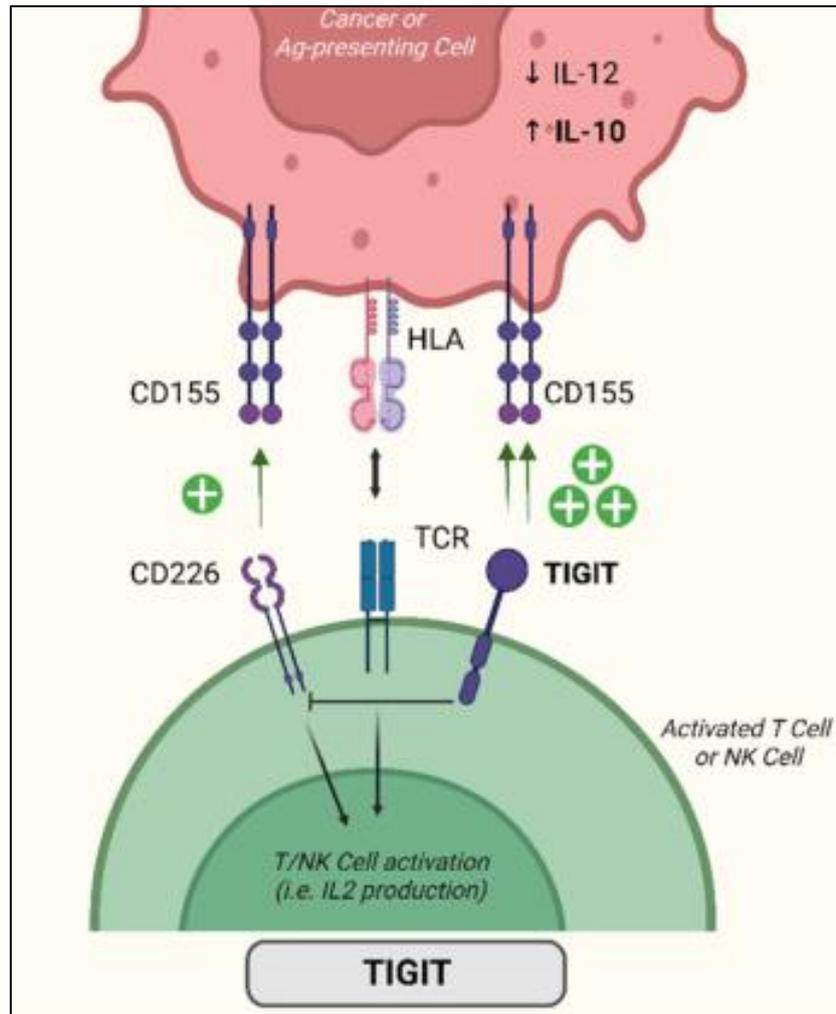


Figure 23 : Structure et fonction de TIGIT et de ses ligands (67).

Dans un premier temps, TIGIT peut inhiber la fonction des cellules NK et donc la destruction des cellules tumorales. En l'absence d'inhibition, les cellules NK tuent les cellules tumorales et favorisent ainsi la libération d'antigènes tumoraux qui sont captés par les CD pour être présentés aux cellules T. À l'étape 2, TIGIT peut supprimer les fonctions des CD en interagissant avec le CD155 exprimé sur les CD, entraînant une altération de l'amorçage des LT. À l'étape 3, TIGIT peut inhiber directement les fonctions effectrices des cellules T CD8 + spécifiques de la tumeur par le biais d'un mécanisme intrinsèque aux cellules. Cela empêche la destruction des cellules tumorales, la libération de l'antigène tumoral et l'absorption de l'antigène tumoral par les CD. De plus, les LTregs exprimant TIGIT sont hautement suppressifs et peuvent supprimer la fonction des LT, des cellules NK et des DC à chaque étape du cycle (129).

Des études chez la souris et chez l'homme ont rapporté une expression accrue de TIGIT sur les TIL. Une régulation positive du TIGIT a été observée dans diverses tumeurs malignes, notamment le mélanome,

le cancer du sein, le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), l'adénocarcinome du côlon, le cancer gastrique, la leucémie myéloïde aiguë (LAM) et le myélome multiple (MM) (130-131-132-133-134-135-136-137). il a été démontré qu'un rapport TIGIT/DNAM-1 élevé sur les Tregs infiltrant la tumeur était en corrélation avec de mauvais résultats cliniques après ICI ciblant PD-1 et/ou CTLA-4 (138). Dans l'adénocarcinome pulmonaire, la surexpression de TIGIT est apparue comme un facteur pronostic défavorable (139).

Dans les cancers solides chez les patients d'Asie de l'est, une expression élevée de TIGIT était associée à un pronostic plus péjoratif, corrélée aux scores d'infiltration immunitaire et à l'infiltration de LT CD8 dans tous les cancers inclus. La charge mutationnelle tumorale et le statut MSI étaient également associés à une expression du TIGIT dans divers cancers (140).

Actuellement, les anticorps anti-TIGIT ont montré peu d'efficacité en monothérapie dans les tumeurs solides avancées. Cependant leur association avec d'autres ICI comme des anti-PD-1 a amélioré les résultats. Dans l'essai CITYSCAPE de phase II, l'association du Tiragolumab avec Atezolizumab a amélioré la SSP dans les CPNPC avancés versus Atezolizumab seul en première ligne (141).

2 - Expressions des ICP dans les CCR.

Une étude pilote s'intéressant à l'expression immunohistochimique de PD-L1 et PD-1 sur les cellules du carcinome colorectal et leurs TIL a montré que 5 % des carcinomes colorectaux présentaient une expression tumorale élevée de PD-L1 et que 19 % présentaient un nombre élevé de lymphocytes infiltrant la tumeur, positifs à PD-1. Les niveaux de PD-L1 étaient corrélés aux niveaux de PD-1 ($P < 0,001$), et les tumeurs dMMR/MSI présentaient des taux significativement plus élevés d'expression de PD-L1 et de PD-1 par rapport aux tumeurs pMMR/MSS (18 % contre 2 % et 50 % contre 13 %, respectivement ; $P < 0,001$ pour les deux). L'intensité de la coloration était également plus forte pour les deux marqueurs dans les tumeurs dMMR/MSI. De plus, il a été observé que parmi les patients atteints d'un CCR dMMR/MSI, l'expression de PD-1/PD-L1 stratifiait la survie sans récurrence de manière interdépendante : une association entre un nombre élevé de lymphocytes positifs à PD-1 infiltrant la tumeur et une meilleure survie sans récurrence ($P = 0,041$) n'était maintenue que lorsque les tumeurs avaient une faible expression de PD-L1 ($P = 0,006$) ; les patients dont les tumeurs avaient à la fois des lymphocytes infiltrant la tumeur positifs à PD-1 élevés et une expression élevée de PD-L1 avaient une survie sans récurrence significativement moins bonne ($P < 0,001$) (142).

Dans une autre étude, la positivité de PDL-1 dans les CCR MSI a été observée dans 12.5 % des tumeurs au niveau des cellules tumorales et 29.8 % des tumeurs au niveau des TIL. Ces tumeurs exprimant PDL-1 étaient significativement associées à un âge avancé, au sexe féminin, à une faible différenciation de

type non mucineux, à une croissance infiltrante, au bourgeonnement tumoral, à un stade avancé, à un phénotype méthylateur d'îlot CpG élevé, à la méthylation du promoteur *MLH1* et aux mutations *BRAF V600E*. Elles étaient également caractérisées par une infiltration de cellules immunitaires au sein de la tumeur à haute densité, y compris des lymphocytes T et des macrophages, et des réactions lymphoïdes péri tumorales intenses (144). Il a été également rapporté que des taux plus élevés de PD-L1, CTLA-4 et LAG-3 et de plus grande proportion de PD-1 produisant de l'INF γ , au niveau des TIL dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS (144). En revanche, une autre étude a montré qu'il n'y avait aucune différence dans l'expression de LAG-3 entre les CCRm MSI et MSS (145).

Une étude s'intéressant au type d'expression de PD-1, PDL-1, TIM-3 et LAG-3, menée sur 83 patients atteints de CCR avec 40 patients MSS et 43 patients MSI a révélé que PD-L1 était plus fréquemment exprimé au centre de la tumeur chez les patients MSI que chez les patients atteints de MSS (18 [41,9 %] contre 3 [7,5 %], respectivement ; $p < 0,001$), et la même tendance a été observée pour l'expression de TIM-3 (30 [69,8 %] contre 19 [47,5 %], respectivement ; $p = 0,047$). L'expression concomitante de deux ou plusieurs ICP était plus fréquemment observée que l'absence d'expression ou l'expression d'une seule molécule dans les groupes MSS et MSI. Ainsi, 79,7 % des patients MSI et 7,5 % des patients MSS ont montré une expression d'ICP au centre de la tumeur, tandis que 79,7 % des patients MSI et 55 % des patients MSS ont montré une expression à la périphérie de la tumeur. Les patients présentant les caractéristiques génétiques du cancer MSI ont montré des niveaux d'expression d'ICP plus élevés que ceux des patients atteints d'un cancer MSS (146).

Une étude sud-coréenne menée sur 89 patients atteints de CCR MSI les expressions de PDL-1 et LAG3 ont été observées chez 68,6 % et 13,5 % des patients respectivement, au niveau des TIL. En parallèle l'expression de PDL-1 et CTLA-4 étaient exprimées dans les cellules tumorales de 24,7 % et 4,5 % des patients respectivement. Après une médiane de suivi de 39 mois, 14 patients (15,7 %) ont connu une récurrence de la maladie. Les expressions de PDL-1 et LAG3 dans les cellules immunitaires étaient significativement associées à une meilleure survie sans maladie et la co-expression de PDL-1 et LAG3 était associée à une meilleure survie sans récurrence (147).

Concernant LAG3, une revue systématique portant sur 43 études et incluant 7118 patients a montré que l'expression de LAG3 était associée à l'infiltration des cellules immunitaires et aux gènes des points de contrôles immunitaires dans tous les cancers solides et au statut MSI. Une expression plus élevée de LAG3 était associée à une survie globale plus faible (HR = 1,10, IC à 95 % 1,01-1,19, $P = 0,023$) mais sans impact significatif sur la survie sans maladie (HR = 1,41, IC à 95 % 0,96-2,07, $P = 0,078$), la survie sans progression (HR = 1,12, IC à 95 % 0,90-1,39, $P = 0,317$) ou la survie sans récurrence (HR = 0,98, IC à

95 % 0,81-1,19, P = 0,871) (148). Une étude portant sur l'expression de LAG3 dans les CCR a montré que LAG3 était exprimé par les TIL dans 20,7 % des cas et que son expression était associée aux métastases ganglionnaires, au stade TNM et au statut MSI. Il n'a cependant pas été retrouvé d'association avec le sexe, l'âge, la localisation tumorale, la profondeur d'invasion et la différenciation. Sur le plan de la survie, l'expression de LAG3 était associée à une survie globale plus longue (149).

Dans le cancer colorectal, TIGIT est significativement surexprimé et associé au phénotype MSI, à une activité cytolytique immunitaire accrue et à une charge mutationnelle élevée (150). Une étude réalisée en 2018, a montré que chez des patients atteints de CCR, l'expression de TIGIT était plus importante sur les cellules NK dans les régions intra-tumorales par rapport aux régions adjacentes et que les lymphocytes CD8 au centre de la tumeur présentaient des quantités moindres de TIGIT que ceux situés au front d'invasion (151). Grâce à une analyse en cytométrie en flux une autre étude a montré que TIGIT était surexprimé dans le tissu tumoral par rapport aux tissus normaux adjacents. Dans les CCR MSS, il a été démontré qu'une expression élevée de TIGIT était associée au stade TNM et à une SSP moindre (152). Actuellement, les anticorps anti-TIGIT ont montré peu d'efficacité en monothérapie dans les tumeurs solides avancées. Cependant leur association avec d'autres ICPI comme des anti-PD-1 a démontré une amélioration de la survie dans certaines tumeurs mais n'a pas été encore étudié dans les tumeurs MSI (141).

Concernant TIM-3 son expression est significativement plus élevée dans le CCR mucineux de statut MSI (153). Certaines études ont montré que les LT TIM-3+ PD-1+ CD8+ sont présents dans le tissu tumoral et le sang périphérique des patients atteints de CCR et que ces cellules seraient faiblement productrices de cytokines pro-inflammatoires sans que le statut microsatellitaire ne soit rapporté (154-155). Dans une cohorte de CCR MSS, l'examen des cellules TIM-3+ et PD-1+ a montré la présence de sous-ensemble de tumeurs (nommé MSS-ImmExlow et MSS-ImmExhi) qui diffèrent par l'étendue de l'épuisement des LT CD8+ avec des caractéristiques anatomo-pathologiques, spatiales et évolutives distinctes. Des analyses morphométriques et en IHC ont montré que TIM-3 était trouvé à la fois sur les lymphocytes et les cellules myéloïdes, mais pas sur les cellules tumorales avec une expression plus élevée au niveau du front d'invasion tumorale. D'un point de vue spatial, les cellules TIM-3+ étaient plus élevées dans le centre de la tumeur dans le sous-ensemble MSS-ImmExhi. Ce dernier sous-ensemble présentait une évolution plus favorable et présentait des proportions élevées de TIM-3+ PD-1+ CD8+ TIL (156).

Toutes ces études présentent de nombreuses limites avec de faibles effectifs, peu de tumeurs dMMR/MSI et des résultats parfois discordants. Il n'y a pas de larges études s'intéressant à une analyse combinée des ICP chez des patients atteints de CCR MSI traités par immunothérapie.

Comme nous l'avons vu précédemment, les tumeurs dMMR/MSI accumulent de nombreuses mutations entraînant la synthèse de multiples néoantigènes aberrants, conséquence du décalage du cadre de lecture. Ces néoantigènes retrouvés à la surface des cellules tumorales sont responsables du caractère immunogène des CCR MSI par rapport aux CCR MSS, avec en général une forte réaction immunitaire antitumorale. Ce point est à l'origine des particularités anatomopathologiques de certains CCR MSI renfermant un dense infiltrat inflammatoire lymphocytaire. Physiologiquement l'activité de ces lymphocytes est régulée par des phénomènes d'immuno-modulation via les ICP provoquant un épuisement de la réponse immunitaire, avec une diminution de la prolifération lymphocytaire et de leur activité cytotoxique. Ce sont ces propriétés dont vont se doter certaines cellules tumorales afin de contrecarrer l'activité immunitaire antitumorale, expliquant le mauvais pronostic de ces tumeurs au stade métastatique contrairement aux stades précoces qui sont de bon pronostic.

La grande majorité des tumeurs dMMR/MSI sont très sensibles aux ICI. Pourtant, certains patients atteints de CCR dMMR/MSI présentent des résistances primaires (20%) ou secondaires (30%) et plusieurs hypothèses ont déjà été étudiées comme une insuffisance de TIL avec épuisement lymphocytaire, une faible charge mutationnelle, ou un faible niveau d'expression de PDL-1 ou l'expression d'autres ICP immunomodulateur négatif. L'étude de l'expression des ICP pourrait permettre de comprendre les résistances des CCR dMMR/MSI aux ICI et d'en améliorer l'efficacité thérapeutique en adaptant les traitements aux différents profils d'expression (combinaison d'ICI).

L'objectif de notre étude est de caractériser et décrire les schémas d'expression en immunohistochimie des ICP (PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 et TIGIT) chez des patients atteints de CCR dMMR/MSI. Avec ces schémas d'expression en immunohistochimie, nous évaluerons s'il existe des associations cliniques, pronostiques et histologiques.

II/ MATERIELS ET METHODES

Patients

Nous avons inclus 24 patients diagnostiqués avec un cancer colorectal avec instabilité microsatellitaire, suivis dans la région Nouvelle-Aquitaine. Les tumeurs étaient considérées comme dMMR si elles avaient une perte expression nucléaire d'au moins une des protéines MMR (MLH1, PMS2, MSH2 et/ou MSH6). Des tests moléculaires MSI ont été effectués à l'aide du panel Pentaplex avec cinq répétitions de nucléotides consensuelles (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27). Le MSI était défini par la présence d'une instabilité affectant au moins trois marqueurs sur l'ADN tumoral. Les patients avec un statut MSI et une IHC MMR discordants étaient exclus de l'étude.

Les informations cliniques des patients ; notamment l'âge, le sexe, la localisation de la tumeur, la différenciation tumorale, le stade pathologique ont été obtenues à partir des dossiers médicaux. Les données de traitements reçus (chimiothérapie, chirurgie, immunothérapie) étaient également disponibles. L'efficacité des traitements et la survie des patients ont été collectées.

Analyse histologique et immunohistochimique

Les échantillons fixés au formol 4% et inclus dans la paraffine des 24 cas de CCR MSI ont été collectés dans le service d'anatomie pathologique du CHU de Poitiers. Ils intéressaient 23 pièces opératoires et un prélèvement biopsique. Des coupes séquentielles de 3.5 µm des blocs de paraffine ont été coupées et colorées par HES ou utilisées pour l'immunohistochimie.

L'immunohistochimie a été réalisée à l'aide d'un système de coloration automatisé BenchMark XT (Ventana Medical System®, Tucson, AZ). Brièvement, les lames ont été déparaffinées et réhydratées à l'automate Leica Biosystem® Bond avant l'étape de récupération antigénique réalisée à l'aide de la solution de conditionnement cellulaire CC1 (Ventana Medical System, Tucson, AZ). Les lames ont été incubées pendant 32 minutes avec l'anticorps anti-PDL1 (clone QR1, Diagnostics®, prêt à l'emploi) et révélées à l'aide du kit de détection DAB Optiview® (Ventana®, Tucson, AZ). Pour les anticorps anti-TIM-3 (clone D5D5R, Cell Signaling®, dilué au 1/50e) ; anti-LAG-3 (clone D2G40, Cell Signaling®, dilué au 1/50e) ; anti-TIGIT (clone E5Y1W, Cell Signaling®, dilué au 1/50e) et anti-CTLA-4 (clone E2V1Z, Cell Signaling®, dilué au 1/50e) les lames sont incubées pendant 1h et révélées à l'aide du kit de détection DAB Ultraview® (Ventana®, Tucson, AZ) et le kit d'amplification (Ventana®, Tucson, AZ). Les lames ont ensuite été contre-colorées à l'hématoxyline, déshydratées puis les lamelles ont été montées. Du tissu amygdalien réactionnel a été utilisé comme témoins externes positifs pour chaque anticorps.

L'expression immunohistochimique a été analysée manuellement. Le niveau d'expression de PD-L1 a été évalué à l'aide du score de proportion tumorale ($TPS = \frac{\text{Nombre de cellules tumorales PD-L1+}}{\text{Nombre total de cellules tumorales viables}} \times 100$) et le score positif combiné ($CPS = \frac{\text{Nombre de cellules tumorales PD-L1+} + \text{Nombre de cellules immunes PD-L1+}}{\text{Nombre total de cellules tumorales viables}} \times 100$). Seul un marquage membranaire linéaire, complet ou incomplet, des cellules invasives, convaincant quelle que soit l'intensité et un marquage membranaire ou cytoplasmique des cellules immunitaires, quelle que soit l'intensité, sans prendre en compte les plasmocytes, fibroblastes, macrophages dans la lumière des glandes tumorales, jusqu'à une distance maximum de 0,5 mm des dernières cellules tumorales ont été pris en compte. Ont été exclues des zones à évaluer, la nécrose, les artéfacts d'écrasement, l'ulcération, les embolies. Le niveau d'expression de TIM-3, TIGIT, LAG3 et CTLA-4 a été évalué à l'aide du système HScore ($HScore = \text{intensité de la coloration} \times \text{pourcentage de cellules positives}$). L'intensité de la coloration a été divisée en 4 catégories : aucune coloration = 0, coloration faible = 1, coloration modérée = 2 et coloration forte = 3 et le pourcentage de cellules colorées a été jugé en même temps.

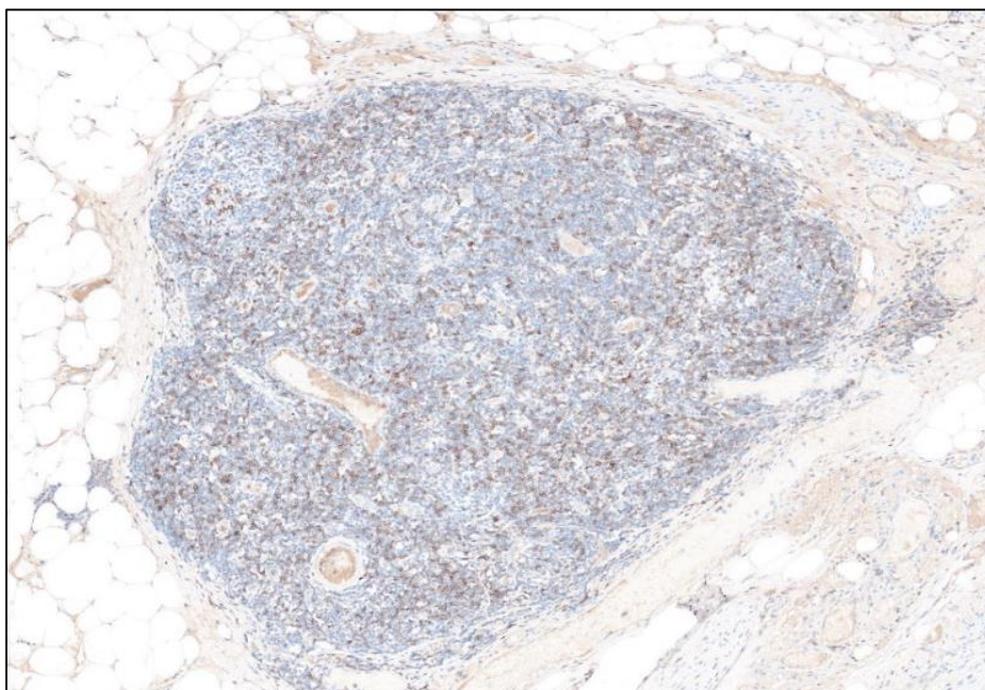


Photo 16 : Ganglion lymphatique à distance du foyer tumoral, ici expression de l'anticorps anti-TIGIT non prise en compte (7.0x).

Les résultats de la coloration IHC ont été évalués indépendamment par deux pathologistes. Les divergences entre les résultats des pathologistes ont été résolues par accord mutuel. La qualité des

prélèvements a été évaluée sur le plan qualitatif (nécrose, phénomènes d'écrasement cellulaire, carcinome in situ, dysplasie de haut grade, embolies...) et quantitative (> 100 cellules tumorales).

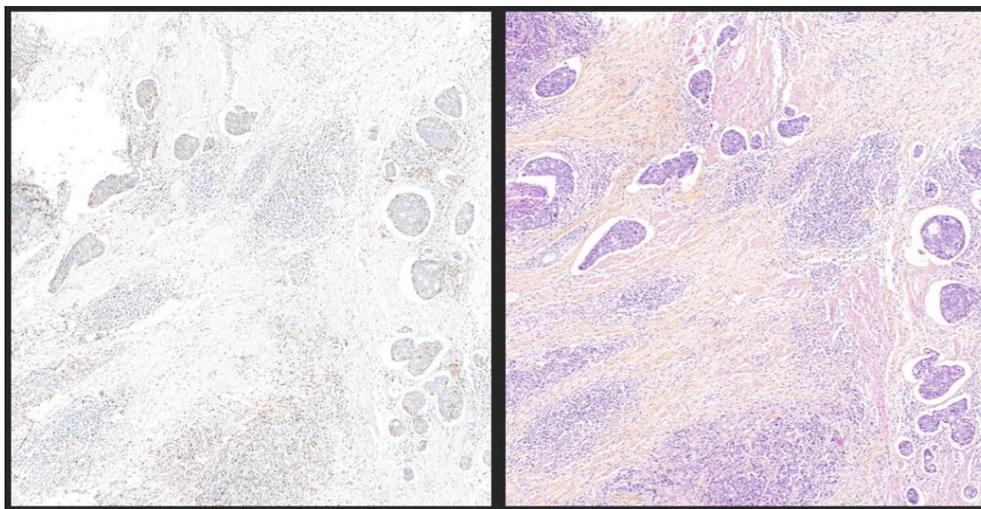


Photo 17 : Embolies lymphatiques, à ce niveau l'expression immunohistochimique n'est pas prise en compte (anticorps anti-TIM-3 5.0x à gauche et HES 5.0x à droite).

Analyse statistique

Les variables continues étaient décrites selon leurs moyennes, médianes, minimum, maximum et écart types. Les variables qualitatives étaient décrites selon leurs pourcentages.

Les variables qualitatives étaient comparées selon le test de Mann Withney et les variables quantitatives selon le test du Chi deux.

La survie sans progression (SSP) correspondait au temps entre le début du traitement et la progression ou le décès du patient. La survie globale est définie comme le temps entre le début du traitement et le décès du patient, quelle que soit la cause. Les patients encore vivants à la fin du suivi étaient censurés. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour calculer les courbes de survie globale et de survie sans progression. Nous avons étudié en analyse univariée les facteurs pronostics par le test du Log Rank, puis en analyse multivariée par un modèle Cox.

On a considéré les variables avec un $p < 0,05$ comme significatives. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel Statview.

III/ RÉSULTATS

Dans un premier temps, notre étude consistait à réaliser les études immunohistochimiques sur des TMA (*tissu micro array*) réalisés à partir de blocs de pièces opératoires de CCR MSI. Ces TMA étaient prélevés en zone tumorale, en zone périphérique et en zone saine. Nous avons constaté une très faible positivité de l'ensemble du panel immunohistochimique sur l'ensemble des spots. Ces résultats contrastaient avec ceux obtenus dans des études analogues. Plusieurs hypothèses ont été soulevées, notamment un défaut technique, une altération des prélèvements, et l'hétérogénéité tumorale (Photo 18). L'utilisation d'un kit d'amplification par ultra-view (Ventana®, Tucson, AZ) a corrigé cette insuffisance de marquage. En raison de l'épuisement d'un certain nombre de spots, de la mauvaise qualité du marquage et de la potentielle hétérogénéité tumorale de ces marqueurs immunitaires nous avons réorienté notre étude sur une nouvelle cohorte de patients avec un CCR dMMR/MSI traités par immunothérapie et à partir de lames entières.

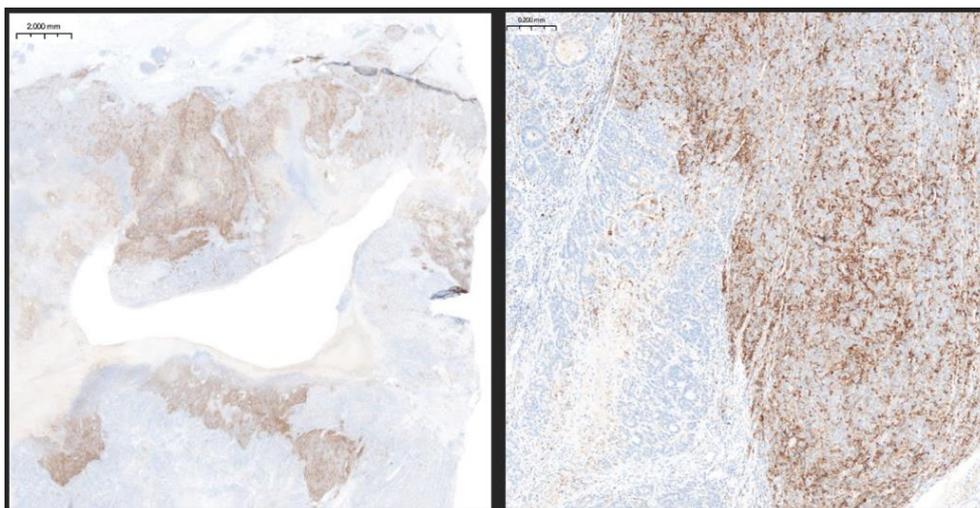


Photo 18 : Un exemple d'hétérogénéité tumorale. Hétérogénéité d'expression avec l'anticorps anti-PDL-1 (0.5x à gauche et 5.0x à droite).

Caractéristiques des patients et des tumeurs

Notre étude comprenait 24 patients atteints d'un CCR dMMR/MSI, dont 12 femmes (50.0 %) et 12 hommes (50.0 %). L'âge moyen était de 60.1 ans. La plupart des patients avaient un CCR du côlon ascendant (83.3 %), de type non spécifique (66.7 %), moyennement ou peu différencié (40.0 % et 40.0 %, respectivement), de stade III ou IV (37.5 % et 58.3 %, respectivement). Les mutations des gènes *RAS* et *BRAF* ont été observées respectivement dans 23.8 % et 47.8 % des tumeurs. La plupart des tumeurs avaient une perte de protéines MLH1 et PMS2 (75.0 %), due à l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* dans 68.75 %. Une mutation constitutionnelle d'un gène MMR était présente dans 31.6 %

des cas (Tableau 3). Nos prélèvements provenaient de 23 pièces opératoires (95.8 %) et de biopsie pour un des patients (4,2 %). Au début de la première ligne, 95.8 % des patients avaient au moins une localisation métastatique, notamment péritonéale (58.3 %), ganglionnaire (58.3 %), hépatique (29.2 %) ou pulmonaire (4.2 %). Les patients avaient majoritairement un statut OMS < 2 (87.5 %).

Caractéristiques	Patients (n = 24)
Age (médiane, min-max)	60.1 (35.9-87.5)
Sexe	
Homme	12 (50.0 %)
Femme	12 (50.0 %)
Stade au diagnostic	
0	0
I	0
II	1 (4.2 %)
III	9 (37.5 %)
IV	14 (58.3 %)
Site tumoral	
Côlon ascendant	20 (83.3 %)
Côlon descendant	3 (12.5 %)
Rectum	1 (4.2 %)
Grade tumoral	
Bien différencié	3 (20.0 %)
Moyennement différencié	6 (40.0 %)
Peu différencié	6 (40.0 %)
Données manquantes	9
Type histologique	
Non spécifique (NOS)	16 (66.7 %)
Mucineux	8 (33.3 %)
Autres	0
Mutation du gène RAS	
Oui	5 (23.8 %)
Non	16 (76.2 %)
Données manquantes	3
Mutation du gène BRAF	
Oui	11 (47.8 %)
Non	12 (52.2 %)
Données manquantes	1
Perte des protéines MMR	
MLH1+PMS2	18 (75.0 %)
MSH2+MSH6	3 (12.5 %)
PMS2 seule	0
MSH6 seule	1 (4.2 %)
Autre*	2 (8.3 %)
Hyperméthylation de <i>MLH1</i>**	(n =19)
Oui	11 (68.75 %)
Non	5 (31.25 %)
Syndrome de Lynch	
Mutation MMR identifiée	6 (25.5 %)
Suspecté	2 (8.3 %)
Sporadique	16 (66.7 %)
Résection du primitif	
Oui	23 (95.8 %)
Non	1 (4.2 %)
Métastases au début de la première ligne	
Hépatique	7 (29.6 %)
Pulmonaire	1 (4.2 %)
Carcinose péritonéale	14 (58.3 %)
Ganglionnaire	14 (58.3 %)
Nombre de site métastatique au début de la première ligne	
0	1 (4.2 %)
1	11 (45.8 %)
2	10 (41.7 %)
3	2 (8.3 %)
Statut OMS au début de la première ligne	
0	12 (50.0 %)
1	9 (37.5 %)
2	3 (12.5 %)

NOS : Not Otherwise Specified ; MMR : MisMatch Repair.

*L'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* a été analysée que pour les tumeurs avec perte de *MLH1* et *PMS2*

**Perte de *MLH1* seul et *MSH2/PMS2*.

Tableau 3 : Caractéristiques des patients et des tumeurs au diagnostic de la maladie.

Traitements

8 patients ont reçu l'immunothérapie en première ligne (33.3 %), 7 en deuxième ligne (29.2 %) et 9 en troisième ligne ou plus (37.5 %). Au début de l'immunothérapie, la majorité des patients présentaient des métastases (95.8 %), notamment ganglionnaires (66.7 %), péritonéales (37.5 %), hépatiques (29.2 %) et/ou pulmonaires (12.5 %). En ce qui concerne la réponse à l'immunothérapie, 41.0 % des patients présentaient une réponse complète, 22.7 % une réponse partielle, 13.6 % une stabilité et 22.7 % une progression de la maladie (Tableau 4).

Caractéristiques	Patients (n = 24)
Métastase à l'introduction de l'immunothérapie	
Absence de métastase	1 (4.2 %)
Présence de métastase	23 (95.8 %)
Sites métastatiques	
Hépatique	7 (29.2 %)
Pulmonaire	3 (12.5 %)
Carcinose péritonéale	15 (62.5 %)
Ganglionnaire	16 (66.7 %)
Réponse à l'immunothérapie	
Réponse complète	9 (41.0 %)
Réponse partielle	5 (22.7 %)
Progression de la maladie	5 (22.7 %)
Stabilité de la maladie	3 (13.6 %)
Données manquantes	2

Tableau 4 : Caractéristiques des patients et des tumeurs au début de l'immunothérapie.

Les médianes de survie sans progression et survie globale ne sont pas atteintes. La survie sans progression à 2 ans est de 86.3% et la survie globale à 4 ans de 82.4%.

Expressions des points de contrôle immunitaire.

L'évaluation de l'expression de PDL-1 a montré que la majorité des tumeurs (91.7 %) avait un score TPS < 1 %, et 8.3 % un score TPS compris entre 10 % et 20 %. 54.1 % des tumeurs avaient un score CPS < 1 et 8.4 % un score > 10 (Tableau 4). L'expression de PDL-1 au niveau des cellules tumorales et des cellules immunitaires était majoritairement localisée au front d'invasion tumoral (47.8 %).

Scores TPS/CPS	PDL-1 (n=24)
TPS	
< 1 %	22 (91.7 %)
1 % - 5 %	0
5 % - 10 %	0
10 % - 20 %	2 (8.3 %)
> 20 %	0
CPS	
< 1	13 (54.1 %)
1 - 10	9 (37.5 %)
11 - 20	1 (4.2 %)
> 20	1 (4.2%)

Tableau 5 : Expression de PDL-1, score TPS et CPS.

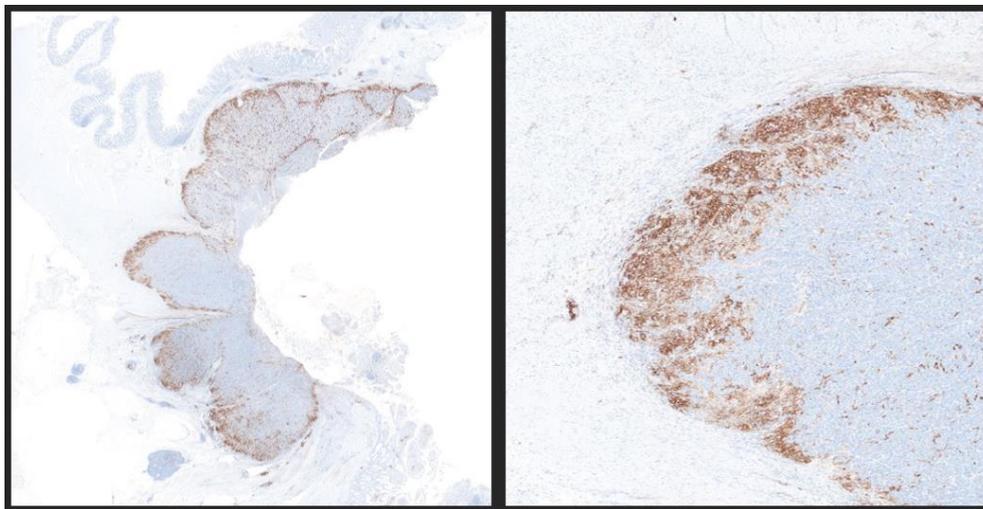


Photo 19 : Expression de PDL-1 (0.5x à gauche et 3.6x à droite). Sur la lame de gauche, on repère un marquage essentiellement périphérique dans la partie basse associé à un marquage central dans la partie haute. Le score TPS était < 1 % et le score CPS était de 8 sur cette lame.

L'expression de CTLA-4 était présente dans 25.0 % des cas, LAG-3 dans 75.0 %, TIGIT dans 79.8 % et TIM-3 dans 100 % (Tableau 5). L'ensemble des cas positifs pour CTLA-4 avaient un H-score compris entre 1 et 10 alors qu'on compte 29.2 % d'expression de LAG3, 33.3 % d'expression de TIGIT et 70.8 % d'expression de TIM-3 avec un H-score > 10 (Tableau 5).

H-score	CTLA-4 (n=24)	LAG-3 (n=24)	TIGIT (n=24)	TIM-3 (n=24)
0	18 (75.0 %)	6 (25.0 %)	5 (20.8 %)	0
1 - 10	6 (25.0 %)	11 (45.8 %)	11 (45.8 %)	7 (29.2 %)
11 - 30	0	6 (25.0 %)	5 (20.8 %)	11 (45.8 %)
31 - 50	0	0	0	0
51 - 100	0	1 (4.2 %)	3 (12.5 %)	6 (25.0 %)
> 100	0	0	0	0

Tableau 6 : Expression de CTLA-4, LAG-3, TIGIT et TIM-3, système H-score.

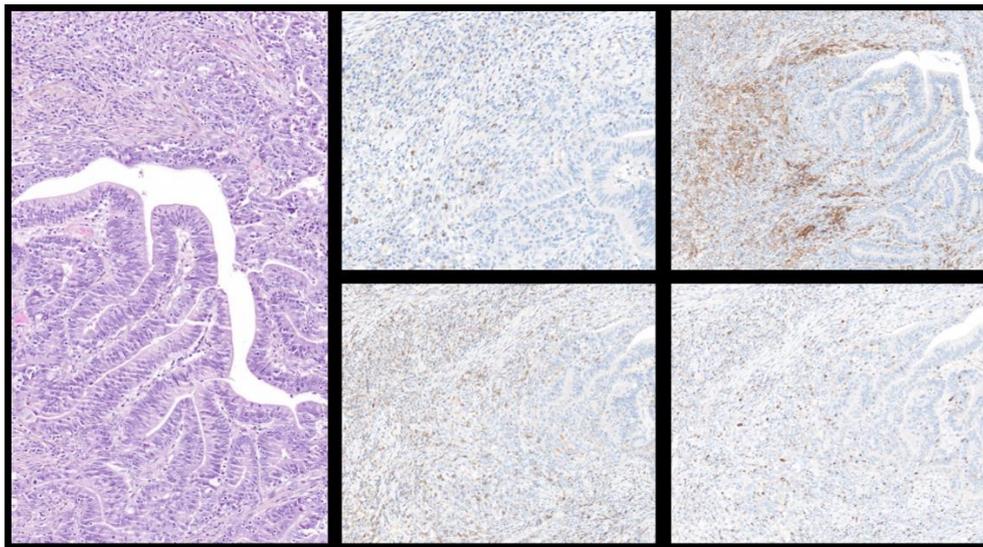


Photo 20 : Expression des ICP. A gauche HES (10.0x), en haut à gauche CTLA-4 (H-score 6, 20.0x), en haut à droite TIM-3 (H-score 90, 10.0x), en bas à gauche TIGIT (H-score 90, 13.0x) et en bas à droite LAG-3 (H-score 15, 14.0x).

Les expressions de PDL-1, CTLA-4, LAG-3 et TIGIT étaient principalement retrouvées en périphérie de la tumeur. L'expression de TIM-3 était plus diffuse en périphérie et au sein de la tumeur (Tableau 6 et Photo 21). Pour l'ensemble des anticorps, l'expression au centre de la tumeur était systématiquement associée à une expression en bordure de la tumeur. En revanche une expression exclusive en bordure de tumeur était dominante notamment pour PDL-1, CTLA-4, LAG-3 et TIGIT.

ICI	Expression au centre de la tumeur (n=24) (n, %)	Expression en bordure de la tumeur (n=23*) (n, %)
PDL-1 + (n=11)	4 (16.7 %)	11 (47.8 %)
CTLA-4 + (n=6)	2 (8.3 %)	6 (26.1 %)
LAG-3 + (n=18)	11 (45.8 %)	17 (73.9 %)
TIGIT + (n=19)	7 (29.2 %)	19 (82.6 %)
TIM-3 + (n=24)	21 (87.5 %)	22 (95.6 %)

*Expression en bordure de la tumeur non évaluable sur le prélèvement biopsique.

Tableau 7 : Région tumorale d'expression des ICP.

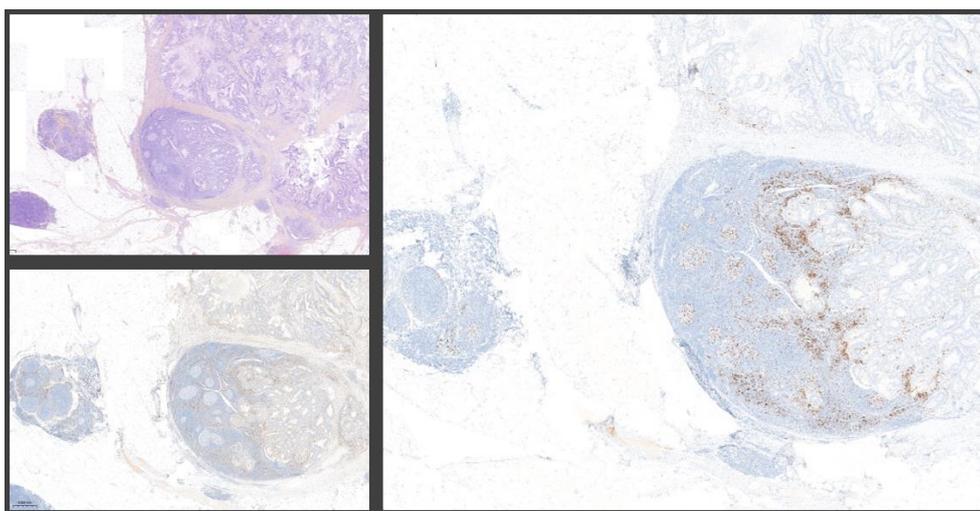


Photo 21 : Ganglion envahi par continuité dans une tumeur avec contingent mucineux. A gauche expression périphérique de PDL-1 (score TPS < 1 % et score CPS à 3), en haut à droite expression plus diffuse de TIM-3 (H-score 30), en bas à droite coloration HES.

Corrélations anatomocliniques

Nous avons mis en évidence une forte corrélation entre l'expression des 5 points de contrôle de la réponse immunitaire. La plus faible corrélation était entre l'expression de PDL1 et TIGIT ($p=0.03$) et la plus forte entre le PDL1 et CTLA4 ($p=0.0006$) (Figure 24).

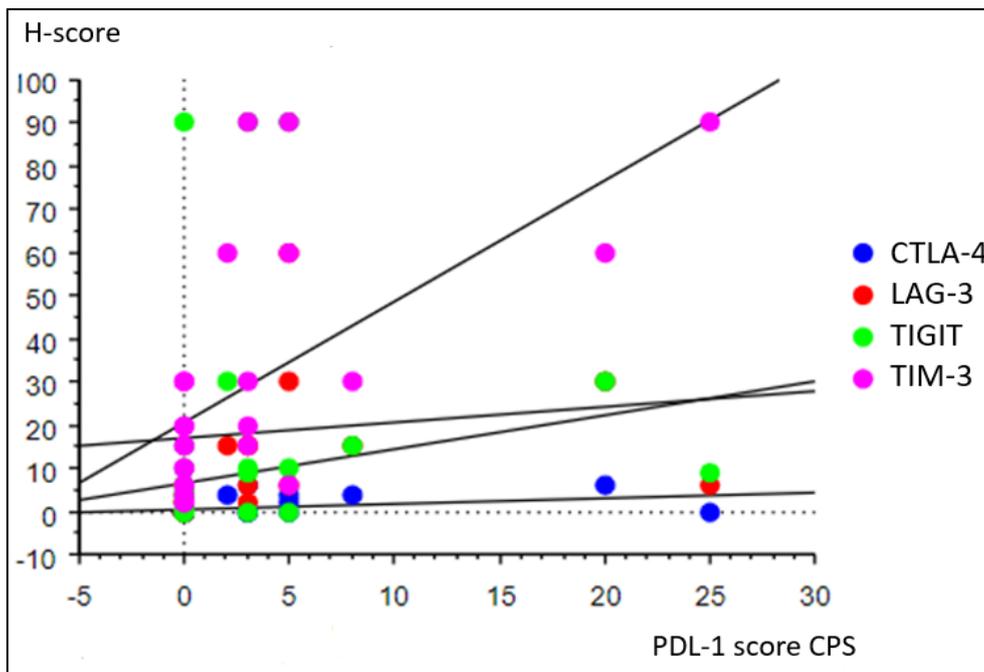


Figure 24 : *Corrélations entre l'expression de PDL-1 (score CPS) et CTLA-4, LAG-3, TIGIT et TIM-3 (H-score).*

D'un point de vue anatomo-clinique, nous avons mis en évidence une corrélation entre l'expression de PDL-1 (évaluée avec le score CPS), et le stade au diagnostic, avec des moyennes d'expression plus élevées de PDL-1 dans les stades II et III (respectivement 8.0 et 6.9) par rapport au stade IV (0.8) ($p=0.05$). Dans le sous-type mucineux, les moyennes d'expression de PDL-1 et LAG-3 étaient moins élevées (respectivement 0.7 et 2.7) que dans l'ADK NOS (respectivement 4.7 et 12.7) avec cependant une significativité non atteinte. Les moyennes d'expression de PDL-1 apparaissaient moins élevées en cas de présence de métastases hépatiques que ce soit au début de première ligne (4.5 vs 0.86, $p=0.21$) ou au début de l'immunothérapie (4.5 vs 0.9, $p=0.21$). En cas de présence de carcinose péritonéale, la moyenne d'expression de PDL-1 était également moins élevée (2.0 vs 5.8, $p=0.03$) ainsi que l'expression de LAG-3 (8.5 vs 11, $p=0.06$). D'un point de vue général, la moyenne d'expression de PDL-1 diminuait avec l'augmentation du nombre de localisation métastatique au début de l'immunothérapie mais sans atteindre la significativité ($p=0.24$). En cas de progression de la maladie, la moyenne d'expression de PDL-1 était plus faible (0.4) par rapport à une réponse complète (4.3), une réponse partielle (6.6) ou une stabilité de la maladie (2.7) ($p=0.41$).

Caractéristiques / expression des ICI (moyenne)	PDL-1 CPS	p	CTLA4 H-score	p	LAG3 H-score	p	TIGIT H-score	p	TIM3 H-score	p
Âge (continu)		0.01		0.10		0.13		0.20		0.09
Sexe										
Homme	3.2	0.56	1.0	0.95	5.2	0.49	12.7	0.06	28.4	0.34
Femme	3.7		1.2		13.7		23.7		31.7	
Stade au diagnostic										
II	8.0		4.0		15.0		15.0		30.0	
III	6.9	0.05	1.8	0.18	16.6	0.20	20.4	0.45	42.9	0.54
IV	0.8		0.4		4.4		17.0		21.8	
Site tumoral										
Côlon ascendant	7.0		2.3		20		40.9		60.5	
Côlon descendant	1.5	0.49	0	0.50	3	0.70	3	0.12	26.7	0.45
Rectum	5		2		6		0		6	
Grade tumoral										
Bien différencié	1.0		2.0		6.3		32.0		37.3	
Moyennement différencié	5.8	0.74	0.7	0.81	17.3	0.80	23.2	0.74	47.3	0.69
Peu différencié	4.2		1.7		10.7		13.0		28.7	
Type histologique										
Non spécifique (NOS)	4.7	0.13	1.6	0.14	12.7	0.09	19.7	0.35	36.9	0.25
Mucineux	0.7		0		2.7		15.1		16.4	
Mutation du gène RAS										
Oui	1.0	0.74	0.8	0.97	5.0	0.80	9.2	0.77	24.0	0.97
Non	3.8		0.7		8.8		17.2		26.3	
Mutation du gène BRAF										
Oui	5.5	0.20	0.9	0.83	14.1	0.25	23.6	0.22	37.5	0.20
Non	1.1		1.0		4.7		13.5		23.2	
Perte des protéines MMR										
MLH1+PMS2	3.9		0.9		9.4		16.1		27.2	
MSH2+MSH6	1.0	0.91	0	0.32	4.0	0.50	5.7	0.34	20.7	0.45
MSH6 seule	3.0		6.0		15.0		90.0		90.0	
Autre	3.0		4.0		15.0		10.0		60.0	
Hyperméthylation de MLH1										
Oui	5.5	0.29	1.1	0.83	7.8	0.97	15.1	0.94	31.5	0.89
Non	1.3		1.0		11.2		16.2		31.4	
Syndrome de Lynch										
Mutation MMR identifiée	0.3		0.7		4.2		9.5		20.7	
Suspecté	3.0	0.19	3.0	0.67	10.5	0.34	45.0	0.91	60.0	0.25
Sporadique	4.6		1.0		11.2		18.1		29.8	
Résection du primitif										
Oui	3.4	0.45	1.0	0.71	9.6	0.20	19.0	0.60	31.1	0.29
Non	0		0		0		4.0		6.0	
Métastases au début de L1										
Hépatique										
Oui	0.86	0.21	0	0.18	11.3	0.48	7.0	0.77	17.3	0.37
Non	4.5		1.5		4.7		22.8		35.3	
Pulmonaire										
Oui	3.0	0.56	6.0	0.11	15.0	0.31	90.0	0.13	90.0	0.13
Non	3.4		0.9		9.2		15.1		27.4	
Carcinose péritonéale										
Oui	2.1	0.06	1.0	0.77	8.9	0.10	20.3	0.91	24.6	0.17
Non	5.2		1.2		10.1		15.3		37.7	
Ganglionnaire										
Oui	4.6	0.54	1.0	0.79	7.9	0.38	18.9	0.70	28.3	0.73

Non	1.8		1.2		11.6		17.3		32.5	
Nombre de sites métastatiques au début de L1										
0	8.0	0.32	4.0	0.61	15.0	0.19	15.0	0.84	30.0	0.10
1	4.1		0.9		12.3		15.5		39.3	
2	2.9		1.2		7.6		23.9		25.3	
3	0		0		0		6.0		3.0	
OMS au début de L1										
0	2.0		0.8		8.9		19.6		21.7	
1	4.2	0.92	1.1	0.91	9.2	0.87	17.9	0.84	41.2	0.49
2	6.7		2.0		12.0		13.7		30.0	
Nombre de sites métastatiques à l'introduction de l'immunothérapie										
0	8.0	0.24	4.0	0.65	15.0	0.48	15.0	0.60	30.0	0.33
1	5.0		1.0		14.6		18.1		46.5	
2	3.4		1.4		8.4		24.4		25.3	
3	0		0		2.0		8.2		12.7	
4	0		0		2.0		0		15.0	
Métastases à l'introduction de l'immunothérapie										
Hépatique										
Oui	0.9	0.21	0	0.18	4.7	0.48	7.0	0.77	17.3	0.37
Non	4.5		1.5		11.3		22.8		35.3	
Pulmonaire										
Oui	1.0	0.54	2.0	0.66	7.7	0.63	35.0	0.54	45.0	0.29
Non	3.7		0.9		9.7		15.8		27.9	
Carcinose péritonéale										
Oui	2.0	0.03	0.9	0.63	8.5	0.06	18.9	0.65	23.9	0.12
Non	5.8		1.3		11.0		17.0		40.2	
Ganglionnaire										
Oui	4.0	0.97	0.8	0.52	7.5	0.48	18.1	0.74	27.8	0.27
Non	2.2		1.5		13.2		18.4		24.5	
Réponse à l'immunothérapie										
Réponse complète	4.3	0.41	1.6	0.47	13.9	0.43	18.9	0.89	32.3	0.71
Réponse partielle	6.6		0		11.0		7.0		40.0	
Stabilité de la maladie	2.7		2.7		7.0		30.0		32.7	
Progression de la maladie	0.4		0.8		3.8		25.6		23.6	

L1 : première ligne de traitement.

Tableau 8 : Corrélations anatomocliniques entre l'expression des ICP et les caractéristiques au diagnostic de la maladie.

En termes de survie, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de PDL-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3 et la survie sans progression et la survie globale. Un niveau plus élevé d'expression de LAG-3 était corrélé à une survie globale plus péjorative sans atteindre la significativité ($p=0.9$). Il en était de même pour TIGIT, dont un niveau d'expression plus élevé était également corrélé à une survie globale plus péjorative ($p=0.038$).

IV/ DISCUSSION

L'objectif de notre étude était de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les profils immunohistochimiques des points de contrôle immunitaire et les données anatomopathologiques et cliniques dans les CCR dMMR/MSI. Comme déjà précisé, nous avons dû réorienter notre population d'étude à la suite de difficulté de mise au point des anticorps et l'épuisement de notre matériel initialement sous la forme de *TMA*. Un autre argument était aussi de diminuer l'effet de l'hétérogénéité tumorale liée aux *TMA* grâce à une analyse en pleine sur tumeur primitive.

La principale limite de notre étude, est la taille limitée de notre cohorte conduisant et une faible représentativité des tumeurs CCR dMMR/MSI et à un manque de puissance de nos résultats. Une autre limite concernant les analyses immunohistochimiques dont l'évaluation n'est pas encore bien codifiée en pathologie tumorale. Outre l'évaluation standardisée de PDL-1 avec les scores TPS et CPS, l'utilisation du système H-score pour le reste du panel d'anticorps apparaît moins précis avec des méthodes d'évaluation variables selon les études (146-147-162). Une autre est limite est que nous avons analysé que les tumeurs primitives et non les métastases alors que certains travaux montrent une hétérogénéité d'expression des immunes checkpoint entre primitif et métastase (160).

Notre étude s'est concentrée sur une série de 24 patients avec 12 hommes et 12 femmes atteints de CCR dMMR/MSI avec des données robustes et tous traités par immunothérapie. L'âge médian au diagnostic était inférieur par rapport à l'âge médian au diagnostic en France (60.1 ans vs 72 ans). Les tumeurs étaient de stade avancé, peu différenciées (40 %) avec une surreprésentation de sous-type mucineux (33.3 %) et localisées au niveau du côlon droit. Les tumeurs présentaient 42.5 % de mutation du gène *BRAF* ce qui était faisait partie de la valeur haute par rapport aux données de la littérature (20 à 40 %). Il y avait 31.6 % de mutations constitutionnelles d'un gène MMR confirmant un syndrome de Lynch. Finalement, les caractéristiques de cette série des patients avec un CCR dMMR/MSI traités par immunothérapie est similaire à ceux observés dans la littérature (70-72-73-74).

Concernant l'expression de PDL-1 au niveau de cellules tumorales évaluée avec le score TPS seuls 2 patients (8,4 %) montraient un score TPS > 1. Ce résultat est inférieur aux données de la littérature (de 12,5 à 78 %) avec dans ces études des méthodes d'évaluation de l'expression de PDL-1 différentes (144-147). En revanche l'expression de PDL-1 au niveau du microenvironnement évalué avec le score CPS se rapproche des valeurs retrouvées dans la littérature avec dans notre étude 45.9 % de score CPS > 1 (157-158). Nous n'avons pas d'explication pouvant expliquer cette différence d'expression au niveau des cellules tumorales, outre le faible effectif de notre population. Même si dans notre étude les expressions de PDL-1 sont globalement plus faible que dans la littérature au niveau tumoral, une

prédominance d'expression au sein du microenvironnement est similaire (146-157-158). La détermination du statut CPS/TPS PD-L1 reste subjective et peu étudié dans les CCR dMMR/MSI avec des résultats discordants mais plusieurs études suggèrent une expression de PD-L1 plus importante dans les CCR dMMR/MSI que dans les CCR pMMR/MSS (mettre des références).

Une expression de CTLA-4 était retrouvée dans 25 % des cas dans notre étude, correspondant à une valeur supérieure par rapport à d'autres études rapportant notamment une étude récente expression rapportant une expression que dans 4,5 % des cas (147). Dans cette étude cependant, l'expression de CTLA-4 était décrite au niveau des cellules tumorales contrairement à notre étude où l'expression était essentiellement localisée au sein du microenvironnement. Il faut également souligner que l'expression de CTLA-4 était associée à des valeurs de H-score parmi les plus faibles de notre panel immunohistochimique (H-score < 10), avec malgré une intensité de marquage significative à 2+ à 3+ mais un faible pourcentage d'expression dans les différentes zones tumorales.

Une expression de LAG-3 était retrouvée dans 75 % des cas, 79,8 % pour TIGIT et 100 % pour TIM-3. Ces valeurs figurent dans les intervalles hauts de celles retrouvées dans d'autres études avec néanmoins un nombre limité d'études publiées (146-147-149-152-154-156-162)). Outre le faible effectif de notre population, cela peut s'expliquer par des valeurs seuils de positivité inférieures à celles appliquées dans certaines études. On voit ainsi que dans notre étude, un certain nombre de cas avec un H-score faible (<10). Les expressions de LAG-3 et TIGIT étaient prédominantes au front d'invasion tumorale et l'expression de TIM-3 apparaissait plus diffuse avec une expression au front d'invasion et au centre de la tumeur. Ces profils d'expression étaient superposables à ceux de la littérature (146).

Nous avons également constaté l'expression simultanée d'au moins deux points de contrôle immunitaire dans la plupart des tumeurs et atteignant jusqu'à 91.3 % en bordure de tumeur. D'autres études ont également retrouvé une expression concomitante de plusieurs ICP dans les CCR mais également dans d'autres tumeurs notamment au niveau pulmonaire (157-159). Notre étude a mis en évidence une forte corrélation entre l'expression des différents ICI notamment entre PDL-1 et CTLA-4. La coexpression des ICI est également décrite dans la littérature avec notamment une coexpression de PDL-1, CTLA-4 et LAG3 nettement plus élevée dans les CCR dMMR/MSI par rapport au CCR pMMR/MSS (163-164). L'expression simultanée et avec des niveaux d'expression proches de plusieurs points de contrôle immunitaire est logique puisque l'échappement à la réponse immunitaire antitumorale implique généralement l'expression de plusieurs points de contrôle immunitaire négatifs. Ces corrélations renforcent la pertinence clinique de traiter les CCR dMMR/MSI par une combinaison d'anti-PD-L1 et anti-CTLA4 comme dans les essais Checkmate 142 ou 8HW qui suggèrent une efficacité

supérieure aux anti-PD1 seuls. Il faut souligner que les co-expressions étaient constatées quelque que soit la valeur du H-score et diminuaient pour des valeurs > 50.

Nous avons également constaté dans notre étude que les valeurs du H-score, ne dépassaient pas le seuil de 100 alors que d'autres études obtenaient des valeurs > 200 (165). Nous pouvons expliquer cela par une possible sous-estimation du pourcentage d'expression des différents marqueurs au niveau du micro-environnement. Il est en effet difficile d'apprécier la nature précise des différents éléments du stroma tumoral et l'utilisation d'un marqueurs T (comme CD3) aurait pu permettre d'affiner ce point.

Concernant les corrélations anatomo-cliniques, l'expression de PDL-1 avait tendance à diminuer avec le stade de la maladie au diagnostic, et on retrouvait ainsi des moyennes d'expression plus élevées dans les stades II et III par rapport au stade IV ($p=0.05$). D'autres études ont démontré au contraire une association entre l'expression tumorale de PDL-1 et un stade avancé (144). Néanmoins, cela pourrait expliquer la plus grande efficacité des anti-PD1 dans les CCR dMMR/MSI localisés par rapport aux formes métastatiques, bien que certaines études rapportent une absence de corrélation entre l'expression de PDL-1 et l'efficacité des anti-PD1 dans les CCR dMMR/MSI. Les moyennes d'expression de PDL-1 étaient plus élevées dans l'ADK NOS par rapport au sous-type mucineux ($p=0.13$) ce qui correspondait aux résultats d'autres études qui décrivaient une expression prédominante de PDL-1 dans les tumeurs peu différenciées sans composante colloïde mucineuse (144). De manière globale, l'expression des ICI était plus représentée dans les ADK NOS par rapport au sous-type mucineux. Dans le cas de TIM-3, l'expression avait pourtant été décrite préférentiellement dans le sous-type mucineux (153). Dans notre étude, ce point pouvait s'expliquer par le faible effectif et par des variations d'échantillonnage avec des prélèvements comportant plus ou moins de composante colloïde mucineuse et donc plus ou moins de cellules tumorales ou de stroma analysables. Les moyennes d'expression de PDL-1 avaient tendance à diminuer avec le nombre de site métastatiques ($p=0.24$). Plus précisément, l'expression de PDL-1 était corrélée à l'absence de métastase hépatique ($p=0.21$) et de carcinose péritonéale ($p=0.03$). Les données issues d'autres études, objectivent au contraire l'expression de PDL-1 serait associée au statut métastatique et pourrait même représenter un biomarqueur des métastases dans l'ADK d sous-type festonné (160-161). Néanmoins, cela pourrait expliquer la résistance aux anti-PD1 des CCR dMMR/MSI métastatiques qui auraient différents mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire et non pas seulement liée à la surexpression de PDL-1.

En termes de survie, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de PDL-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3 et la survie sans progression et la survie globale. Néanmoins, un niveau plus élevé d'expression de TIGIT était également corrélé à une survie globale plus péjorative. Ces résultats suggèrent que comme décrit dans de précédentes études l'expression de PD-L1 ne conditionne pas l'efficacité des anti-PD1 dans les tumeurs dMMR/MSI. En revanche l'expression de TIGIT qui intervient dans l'échappement à la réponse immunitaire antitumorale est associée à la survie et la combinaison anti-PD1 plus anti-TIGIT serait intéressante à évaluer dans les CCR dMMR/MSI.

Pour conclure, notre étude est la première à démontrer une co-expression des points de contrôle de la réponse immunitaire dans les CCR dMMR/MSI et des corrélations avec certaines caractéristiques tumorales et la survie. Ces résultats ouvrent la piste à une meilleure compréhension de la résistance à l'immunothérapie des CCR dMMR/MSI. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés dans des séries indépendantes de plus large effectif. Il serait aussi intéressant d'utiliser des techniques de multiplexage en immunofluorescence permettant d'évaluer l'expression mais aussi la colocalisation de plusieurs anticorps simultanément. Le but ultime reste une optimisation personnalisée du traitement par immunothérapie des CCR dMMR/MSI en combinant les ICI en fonction de l'expression tumorale des différents points de contrôle de la réponse immunitaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lapôte-Ledoux Bénédicte, Remontet Laurent, Uhry Zoé, Dantony Emmanuelle, Grosclaude Pascale, Molinié Florence et al. Incidence des principaux cancers en France métropolitaine en 2023 et tendances depuis 1990 - Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2023, n°. 12-13, p. 188-204.
2. Panorama des cancers en France – Édition 2023 Édité par l’Institut national du cancer (INCa).
3. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l’incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) : Santé publique France, 2019. 372 p. ISBN : 979-10-289-0555-2.
4. Launoy G, Cariou M, Bouvier A-M, Bouvier V, Lecoffre C, Lafay L et al. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Côlon et rectum. Boulogne Billancourt : Institut national du cancer, septembre 2020, 12 p. ISBN : 978-2-37219-566-9.
5. Lydia Guittet, Véronique Bouvier, Nicole Mariotte, Jean-Pierre Vallee, Romuald Levillain, Jean Tichet et al. Performance of immunochemical fecal occult blood test in colorectal cancer screening in average-risk population according to positivity threshold and number of samples, *Int. J. Cancer*, 2009. 125(5) : p.1127-33.
6. Béatrice Lauby-Secretan, Nadia Vilahur, Franca Bianchini, Neela Guha, Kurt Straif. The IARC Perspective on Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2018 May 3;378(18):1734-1740.
7. Who classification of tumors, digestif system tumours (5th edition) Robert D. Odze, Iris D. Nagtegaal, Mark J. Arends, Manuel Salto-Tellez, Ariana Znaor.
8. Niek Hugen, Jasper J P van Beek, Johannes H W de Wilt, Iris D Nagtegaal. Insight into mucinous colorectal carcinoma: clues from etiology. *Ann Surg Oncol*. 2014 Sep;21(9):2963-70.
9. J Verhulst, L Ferdinande, P Demetter, W Ceelen. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Pathol*. 2012 May;65(5):381-8.
10. Niek Hugen, Gina Brown, Robert Glynn-Jones, Johannes H W de Wilt, Iris D Nagtegaal. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jun;13(6):361-9.
11. Juliana Andrici, Mahtab Farzin, Loretta Sioson, Adele Clarkson, Nicole Watson, Christopher W Toon et al. Mismatch repair deficiency as a prognostic factor in mucinous colorectal cancer. *Od Pathol*. 2016 Mar;29(3):266-74.
12. John R Hyngstrom, Chung-Yuan Hu, Yan Xing, Y Nancy You, Barry W Feig, John M Skibber et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol*. 2012 Sep;19(9):2814-21.
13. Niek Hugen, Rob H Verhoeven, Valery E Lemmens, Carola J van Aart, Marloes A Elferink, Sandra A Radema et al. Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. *Int J Cancer*. 2015 Jan 15;136(2):333-9.
14. N Hugen, C J H van de Velde, J H W de Wilt, I D Nagtegaal. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol*. 2014 Mar;25(3):651-657.
15. Hinoi, M Tani, P C Lucas, K Caca, R L Dunn, E Macri, M Loda et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol*. 2001 Dec;159(6):2239-48.
16. Robert D Knox, Nathan Luey, Loretta Sioson, Andrew Kedziora, Adele Clarkson, Nicole Watson et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol*. 2015 Sep;22(9):2988-96.
17. G Lanza, R Gafà, M Matteuzzi, A Santini. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2429-38.

18. José García-Solano, Miguel Pérez-Guillermo, Pablo Conesa-Zamora, Jesús Acosta-Ortega, Javier Trujillo-Santos, Pablo Cerezuela-Fuentes et al. *Étude clinicopathologique de 85 adénocarcinomes colorectaux dentelés : informations complémentaires sur la reconnaissance complète d'un nouveau sous-ensemble de carcinome colorectal.* *Hum Pathol.*2010 octobre; 41(10):1359-68.
19. Montse Verdu, Ruth Roman, Miquel Calvo, Natalia Rodón, Beatriz García, Marta González et al. *Caractérisation clinico-pathologique et moléculaire du carcinome micropapillaire colorectal.* *Mod Pathol.*2011 mai ;24(5):729-38.
20. Bisong Haupt, Jae Y Ro, Marie R Schwartz, Steven S Shen. *Adénocarcinome colorectal à motif micropapillaire et son association avec des métastases ganglionnaires.* *Mod Pathol.*Juillet 2007;20(7):729-33.
21. Juan P Palazzo, Tina Bocker Edmonston, Linda M Chaille-Arnold, Susan Burkholder. *Adénocarcinome papillaire invasif du côlon.* *Hum Pathol.*33(3):372-5, mars 2002.
22. Timothy S Loy, Paul A Kaplan. *Adénocarcinome vilieux du côlon et du rectum : une étude clinicopathologique de 36 cas.* *Am J Surg Pathol.*2004 novembre ; 28(11) : 1460-5.
23. Raúl S González, Justin MM Cates, Mary Kay Washington, Robert-Daniel Beauchamp, Robert J Coffey, Chanjuan Shi. *Adénocarcinome de type adénome : un sous-type de carcinome colorectal avec un bon pronostic, une apparence trompeuse à la biopsie et une mutation KRAS fréquente.* *Histopathologie.*janvier 2016;68(2):183-90.
24. B Cagir, MW Nagy, Un Topham, J Rakinic, Frire RD. *Carcinome adénosquameux du côlon, du rectum et de l'anus : épidémiologie, distribution et caractéristiques de survie.* *Dis Colon Rectum.*1999 février ; 42(2) : 258-63.
25. E Moussaly, JP Atallah. *Un cas rare de carcinome indifférencié du côlon à caractéristiques rhabdoïdes : à propos d'un cas et revue de la littérature.* *Oncol Med.*2015 :2015 :531348.
26. Abbas Agaimy, Ondrej Daum, Bruno Markl, Inès Lichtmanegger, Michal Michal, Arndt Hartmann. *Carcinomes indifférenciés/rhabdoïdes déficients en complexe SWI/SNF du tractus gastro-intestinal : une série de 13 cas mettant en évidence une perte mutuellement exclusive de SMARCA4 et SMARCA2 et une co-inactivation fréquente de SMARCB1 et SMARCA2.* *Am J Surg Pathol.*avril 2016;40(4):544-53.
27. Mark J. Arends. *Pathways of colorectal carcinogenesis.*
28. Georges Pouligiannis, Koichi Ichimura, Rifat A Hamoudi, Feijun Luo, Suet et Leung, Siu T Yuen et al. *Arends : Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer* *J Pathol.* 2010 Feb;220(3):338-47.
29. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer,* *nature*11252.
30. Ashraf E K Ibrahim, Mark J Arends, Ana-Luisa Silva, Andrew H Wyllie, Liliana Greger, Yoko Ito et al. *Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression.* *10.1136/gut.*2010.223602
31. E R Fearon, B Vogelstein. *A genetic model for colorectal tumorigenesis* *Cell,* Vol. 61, 759-767, June 1, 1990.
32. P J Morin, A B Sparks, V Korinek, N Barker, H Clevers, B Vogelstein et al. *Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC.* *Science* 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.
33. Marco Scarpa, Ignazio Castagliuolo, Carlo Castoro, Anna Pozza, Mélanie Scarpa, Andromachi Kotsafti et al. *Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis.* *Monde J Gastroenterol.* 14 juin 2014 ; 20(22) : 6774-6785.
34. M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, JG Herman, SB Baylen, JP Issa. *Phénotype méthylateur de l'île CpG dans le cancer colorectal.* *Proc Natl Acad Sci US A.,* 96 (15) (1999), pp. 8681-8686.
35. Evrard C, Tachon G, Tougeron D. *Carcinogénèse colorectale, données fondamentales.* *EMC - Gastro- entérologie* 2020;0(0):1-19 [Article 9-000-E-20.
36. Sarah Briggs, Ian Tomlinson. *Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers.* *J Pathol.* 2013 Jun;230(2):148-53.

37. Luigi Magrin, Daniele Fanale, Chiara Brando, Alessia Fiorino, Lidia Rita Corsini, Roberta Sciacchitano et al. *POLE, POLD1, and NTHL1: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. Oncogene* 2021 Oct;40(40):5893-5901.
38. Baretta M, Le DT : Réparation des mésappariements d'ADN dans le cancer. *Pharmacol Ther* 189:45-62, 2018.
39. Ma J, Setton J, Lee NY, et al : La signification thérapeutique des signatures mutationnelles du déficit de réparation de l'ADN dans le cancer. *Nat Commun* 9:3292, 2018.
40. Lepore Signorile M, Disciglio V, di Carlo G, et al : De la génétique à la caractérisation histomoléculaire : Un aperçu de la carcinogénèse colorectale dans le syndrome de Lynch. *Int J Mol Sci* 22:6767, 2021.
41. Lower SS, McGurk MP, Clark AG, et al : Evolution de l'ADN satellite : vieilles idées, nouvelles approches. *Avis actuel Genet Dev* 49:70-78, 2018.
42. Gilson P, Merlin JL, Harlé A : Détection de l'instabilité des microsatellites : état de l'art et applications futures dans l'ADN tumoral circulant (ADNct). *Cancers* 13:1491, 2021.
43. Iyer RR, Pluciennik A : Réparation des mésappariements d'ADN et son rôle dans la maladie de Huntington. *J Huntingtons Dis* 10:75-94, 2021.
44. V. Randrian, C. Evrard, D. Tougeron. *Microsatellite instability in colorectal cancers : carcinogenesis, neo-antigens, immuno-resistance and emerging therapies. Cancers*, 2021.
45. Shia J : La diversité des tumeurs présentant une instabilité microsatellite : mécanismes moléculaires et impact sur les tests d'instabilité microsatellite et l'immunohistochimie des protéines de réparation des mésappariements. *Histopathologie* 78 : 485-497, 2021.
46. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I et al : Caractérisation moléculaire complète de l'adénocarcinome gastrique. *Nature* 513 : 202-209, 2014.
47. Polom K, Marano L, Marrelli D, et al : Méta-analyse de l'instabilité des microsatellites en relation avec les caractéristiques clinicopathologiques et la survie globale dans le cancer gastrique. *Frère J Surg* 105:159-167, 2018.
48. Diao Z, Han Y, Chen Y et al : L'utilité clinique de l'instabilité des microsatellites dans le cancer colorectal. *Crit Rev Oncol Hématol* 157:103171, 2021.
49. Diaz-Padilla I, Romero N, Amir E et al : Statut de réparation des mésappariements et résultats cliniques dans le cancer de l'endomètre : une revue systématique et une méta-analyse. *Crit Rév Oncol Hématol* 88 : 154-167, 2013.
50. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY et al : Un portrait moléculaire de l'instabilité des microsatellites dans plusieurs cancers. *Nat Commun* 8:15180, 2017.
51. Mike F Müller, Achraf EK Ibrahim, Mark J. Arends. *Molecular pathological classification of colorectal cancer. Arche de Virchow*.Août 2016 ; 469(2) : 125-34.
52. Justin Guinney, Rodrigo Dienstmann , Xin Wang , Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Soneson et al. *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6.
53. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. *Classification pathologique moléculaire du cancer colorectal. Arche de Virchow.* Août 2016.
54. Le, D. T., et al. (2017). *Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science* 357, 409-413.
55. Et Luchini, C., et al. (2019). *ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden : a systematic review-based approach. Ann. Oncol.* 30, 1232-1243.
56. *Recommandations INCA : © Évaluation du statut MMR tumoral/synthèse, Collection Recommandations et référentiels, novembre 2021 <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Evaluation-du-statut-MMR-tumoral-synthese-2021>.*

57. Sigurdís Haraldsdóttir, Rachel Roth, Rachel Pearlman, Wendy L. Frankel. Concordance du déficit de réparation des mésappariements entre le cancer colorectal primitif et les métastases correspondantes. Avril 2016. *Cancer familial* 15(2).
58. Y. Parc, S. Gueroult, N. Mourra, L. Serfaty, J.-F. Fléjou, E. Tired, et al. Signification pronostique de l'instabilité des microsatellites déterminée par coloration immunohistochimique de MSH2 et MLH1 dans le cancer du côlon sporadique T3N0M0. *Intestin*, 53 (3) (2004), pp. 371 – 375.
59. G. Hutchins, K. Southward, K. Handley, L. Magill, C. Beaumont, J. Stahlschmidt et al. Valeur de la réparation des mésappariements, des mutations KRAS et BRAF dans la prévision de la récurrence et des avantages de la chimiothérapie dans le cancer colorectal ; *J Clin Oncol*, 29 (10) (2011), pp. 1261 – 1270.
60. Grothey, AF Sobrero, AF Shields, T. Yoshino, J. Paul, J. Taieb et al. Durée de la chimiothérapie adjuvante pour le cancer du côlon de stade III. *N Engl J Med*, 378 (13) (2018).
61. DJ Sargent, Q. Shi, G. Yothers, S. Tejpar, MM Bertagnolli, SN Thibodeau et al. Impact pronostique de la réparation déficiente des mésappariements (dMMR) chez 7 803 patients (pts) atteints d'un cancer du côlon (CC) de stade II/III : analyse regroupée des données individuelles des points de 17 essais sur les adjuvants dans la base de données ACCENT. *J Clin Oncol*, 32 (15_suppl) (2014).
62. J. Taieb, Q. Shi, L. Pederson, S. Alberts, N. Wolmark, E. Van Cutsem et al. Pronostic de l'instabilité des microsatellites et/ou d'un déficit de réparation des mésappariements chez les patients atteints d'un cancer du côlon de stade III après une récurrence de la maladie après un traitement adjuvant : résultats d'une analyse groupée ACCENT de sept études. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*, 30 (9) (2019).
63. S. Venderbosch, ID Nagtegaal, TS Maughan, CG Smith, JP Cheadle, D. Fisher et al. Statut de réparation des mésappariements et statut de mutation BRAF chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique : une analyse groupée des études CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 20 (20) (2014).
64. DJ Sargent, S. Marsoni, G. Monges, SN Thibodeau, R. Labianca, SR Hamilton et al. Réparation des mésappariements déficiente en tant que marqueur prédictif du manque d'efficacité du traitement adjuvant à base de fluorouracile dans le cancer du côlon. *J Clin Oncol*, 28 (20) (2010).
65. D. Tougeron, G. Mouillet, I. Trouilloud, T. Lecomte, R. Coriat, T. Aparicio et al. Efficacité de la chimiothérapie adjuvante dans le cancer du côlon avec instabilité des microsatellites : une vaste étude AGEO multicentrique. *J Natl Cancer Inst*, 108 (7) (2016).
66. Zaanan, J. Henriques, R. Cohen, D. Sefrioui, C. Evrard, C. de la Fouchardière, et al. Efficacité de l'anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique à instabilité microsatellite en fonction de l'origine sporadique ou familiale. *J Natl Cancer Inst*, 113 (4) (2021).
67. Ribas. Immunothérapie tumorale dirigée contre PD-1. *N Engl J Med*, 366 (26) (2012).
68. FS Hodi, SJ O'Day, DF McDermott et coll. Amélioration de la survie avec l'ipilimumab chez les patients atteints de mélanome métastatique. *N Engl J Med*, 363 (2010).
69. Borghaei, H., et al. "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 373, no. 17 (2015): 1627-1639.
70. DT Le, JN Uram, H. Wang, BR Bartlett, H. Kemberling, AD Eyring et al. Blocus PD-1 dans les tumeurs présentant un déficit de réparation des mésappariements. *N Engl J Med*, 372 (26) (2015).
71. H.-J. Lenz, E. Van Cutsem, M. Luisa Limon, KYM Wong, A. Hendlitz, M. Aglietta et al. Nivolumab de première intention plus ipilimumab à faible dose pour le cancer colorectal métastatique à instabilité élevée/inadéquation des microsatellites et à réparation déficiente : l'étude CheckMate 142 de phase II. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 40 (2) (2022).
72. André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C et al. KEYNOTE-177 Investigators. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2207-2218. doi: 10.1056/NEJMoa2017699. PMID: 33264544.

73. Taïeb J, Bouche O, André T, Le Malicot K, Laurent-Puig P, Bez J et al. SAMCO-PRODIGE 54 Enquêteurs. Avelumab vs chimiothérapie standard de deuxième intention chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et d'instabilité des microsatellites : un essai clinique randomisé. *JAMA Oncol.* 1er octobre 2023;9(10):1356-1363. est ce que je: 10.1001/jamaoncol.2023.2761. PMID : 37535388.
74. T.André et al. *CheckMate 8HW, ASCO GI, 2024.*
75. S. Champiat, L. Dercle, S. Ammari, C. Massard, A. Hollebecque, S. Postel-Vinay, et al. La maladie hyperprogressive est un nouveau modèle de progression chez les patients cancéreux traités par Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* , 23 (8) (2017).
76. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., Ribas, A. "Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy." *Cell* 168, no. 4 (2017): 707-723.
77. R. Cohen, E. Hain, O. Buhard, A. Guilloux, A. Bardier, R. Kaci , et al. Association de la résistance primaire aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans le cancer colorectal métastatique avec un diagnostic erroné d'instabilité des microsatellites ou de statut de déficit de réparation par mésappariement. *JAMA Oncol*, 5 (4) (2019).
78. Flecchia C, Auclin E, Alouani E, Mercier M, Hollebecque A, Turpin A et al. Primary resistance to immunotherapy in patients with a dMMR/MSI metastatic gastrointestinal cancer: who is at risk? An AGEO real-world study. *Br J Cancer.* 2024 Feb;130(3):442-449. doi: 10.1038/s41416-023-02524-3. Epub 2023 Dec 15. PMID: 38102227; PMCID: PMC10844357.
79. TK Kim, RS Herbst, L. Chen. Définir et comprendre la résistance adaptative en immunothérapie anticancéreuse. *Trends Immunol* (2018).
80. JM Zaretsky et al. Mutations associées à la résistance acquise au blocage de PD-1 dans le mélanome. *N. Engl. J.Méd.* (2016).
81. L. Horn et coll. Nivolumab versus docétaxel chez des patients précédemment traités atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avancé : résultats sur deux ans de deux essais randomisés et ouverts de phase III (CheckMate 017 et CheckMate 057). *J. Clin. Oncol.* , 35 (2017).
82. EJ Lipson et coll. Régression durable du cancer hors traitement et thérapie de réinduction efficace avec un anticorps anti-PD-1. *Clin. Cancer Rés* (2013).
83. Colle R, Lonardi S, Cachanado M, Overman MJ, Elez E, Fakih M et al. BRAF V600E/RAS Mutations and Lynch Syndrome in Patients With MSI-H/dMMR Metastatic Colorectal Cancer Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *Oncologist.* 2023 Sep 7;28(9):771-779. doi: 10.1093/oncolo/oyad082. PMID: 37023721; PMCID: PMC10485382.
84. Ratovomanana T, Nicolle R, Cohen R, Diehl A, Siret A, Letourneur Q et al. Prediction of response to immune checkpoint blockade in patients with metastatic colorectal cancer with microsatellite instability. *Ann Oncol.* 2023 Aug;34(8):703-713. doi: 10.1016/j.annonc.2023.05.010. Epub 2023 Jun 1. PMID: 37269904.
85. Gallois C, Landi M, Taieb J, Sroussi M, Saberzadeh-Ardestani B, Cazelles A et al. Transcriptomic Signatures of MSI-High Metastatic Colorectal Cancer Predict Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2023 Sep 15;29(18):3771-3778. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-3964. PMID: 37439810; PMCID: PMC10502457.
86. P. Maby, D. Tougeron, M. Hamieh, B. Mlecnik, H. Kora, G. Bindea, et al. Corrélation entre la densité de l'infiltrat de lymphocytes T CD8+ dans les cancers colorectaux instables microsatellites et les mutations de décalage de cadre : justification de l'immunothérapie personnalisée. *Cancer Res*, 75 (17) (2015), pages 3446 à 3455.
87. Laura S Rozek, Stephanie L Schmit, Joel K Greenson, Lynn P Tomsho, Hedy S Rennert, Gad Rennert, Stephen B Gruber. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016 May 12;108(8).
88. TC Smyrk, P Watson , K Kaul , HT Lynch. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer.* 15 juin 2001;91(12):2417-22.
89. Franck Pagès, Bernhard Mlecnik, Florence Marliot, Gabriela Bindea, Fang-Shu Ou, Carlo Bifulco et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet.* 2018 May 26;391(10135):2128-2139.

90. Gavin P Dunn, Allen T Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J Old, Robert D Schreiber. *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol* 2002;3:991–8. doi:10.1038/ni1102-991.
91. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. (1992). "Expression induite de PD-1, un nouveau membre de la superfamille des gènes d'immunoglobuline, lors de la mort cellulaire programmée". *EMBO J.* 11 (11), 3887–3895.
92. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008). PD-1 et ses ligands en tolérance et immunité. *Ann. Rév. Immunol.* 26, 677-704. 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
93. Li Y., Fang M., Zhang J., Wang J., Song Y., Shi J. et al. (2015). L'hydrogel à double administration de célécoxib et d'anti-PD-1 améliore de manière synergique l'immunité antitumorale. *Oncoimmunologie* 5.
94. Daassi D., Mahoney KM, Freeman GJ (2020). L'importance du PDL1 exosomal dans l'évasion immunitaire tumorale. *Nat. Rév. Immunol.* 20 (4), 209-215. 10.1038/s41577-019-0264-y.
95. Hamanishi J., Mandai M., Matsumura N., Abiko K., Baba T., Konishi I. (2016). Blocus PD-1/PD-L1 dans le traitement du cancer : perspectives et enjeux. *Int. J. Clin. Oncol.* 21 (3).
96. F.S. Hodi, S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 363 (2010).
97. K. Harper, C. Balzano, E. Rouvier, MG Mattei, MF Luciani, P. Golstein. Les molécules lymphocytaires activées par CTLA-4 et CD28 sont étroitement liées chez la souris et chez l'homme en ce qui concerne la séquence, l'expression du message, la structure des gènes et la localisation chromosomique. *J. Immunol.* 147 (3) (1991).
98. P.S. Linsley, J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, R. Peach. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, 1 (9) (1994).
99. D.V. Chan, H.M. Gibson, B.M. Aufiero, A.J. Wilson, M.S. Hafner, Q.S. Mi, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun.*, 15 (1) (2014).
100. Rowshanravan et al. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* (2018).
101. G.J. Freeman, D.B. Lombard, C.D. Gimmi, S.A. Brod, K. Lee, J.C. Laning, et al. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J. Immunol.*, 149 (12) (1992).
102. Hannier S., Tournier M., Bismuth G., Triebel F. Les molécules du gène d'activation lymphocytaire 3 associées au complexe CD3/TCR inhibent la signalisation CD3/TCR. *J. Immunol.* 1998 ; 161 : 4058-4065.
103. Huard B., Gaulard P., Faure F., Hercend T., Triebel F. Expression cellulaire et distribution tissulaire de la protéine humaine codée par LAG-3, un ligand du CMH de classe II. *Immunogénétique.* 1994 ; 39 : 213-217.
104. Chen J., Chen Z. L'effet du microenvironnement immunitaire sur la progression et le pronostic du cancer colorectal. *Méd. Oncol.* 2014 ; 31.
105. Mastrangeli R, Micangeli E, Donini S. Clonage de LAG-3 murin par sondes homologues liées à des billes magnétiques et PCR (PCR par capture de gènes). *Anal Biochem* (1996) 241 (1) : 93-102. 10.1006/abio.1996.0382.
106. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, Bruniquel D, Donini S, El-Tayar N et al. "Caractérisation du site de liaison du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sur la protéine LAG-3". *Immunologie* (1997) 94 (11) : 5744–9. 10.1073/pnas.94.11.5744.
107. Ascierto PA, Melero I, Bhatia S, Bono P, Sanborn RE, Lipson EJ. Efficacité initiale du gène d'activation anti-lymphocytaire-3 (anti-LAG-3 ; BMS-986016) en association avec le nivolumab (nivo) chez les patients atteints de mélanome (MEL) préalablement traités par un traitement anti-PD-1/PD-L1. *J Clin Oncol* (2017) 35 (15) :9520. 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9520.

108. Zuazo M., Arasanz H., Fernández-Hinojal G., García-Granda MJ, Gato M., Bocanegra A et al. L'immunité systémique fonctionnelle contre les CD4 est requise pour les réponses cliniques au traitement par blocage PD-L1/PD-1. *EMBO Mol. Méd.* 2019 ; 11 : e10293.
109. L. Monney et coll. La protéine de surface cellulaire spécifique Th1, Tim-3, régule l'activation des macrophages et la gravité d'une maladie auto-immune. *Nature*, 415 (6871) (2002).
110. Homayouni V, Ganjalikhani-Hakemi M, Rezaei A, Khanahmad H, Behdani M, Lomedasht FK (2016) Préparation et caractérisation d'un nouveau nanocorps contre l'immunoglobuline des lymphocytes T et la mucine-3 (TIM-3). *Iran J Basic Med Sci* 19(11):1201. 10.22038/ijbms.2016.7820.
111. Liu Y, Gao LF, Liang XH, Ma CH. Rôle de Tim-3 dans l'infection par le virus de l'hépatite B : un aperçu. *Monde J Gastroenterol.* 2016 ; 22 (7):2294.
112. Zhu C et al (2005) Le ligand Tim-3, la galectine-9, régule négativement l'immunité T helper de type 1. *Nat Immunol* 6(12):1245-1252. 10.1038/ni1271.
113. Pagès F, et al. Cellules T mémoire effectrices, métastases précoces et survie dans le cancer colorectal. *N Engl J Med.* 2005 ; 353 (25):2654-2666.
114. Zhang L. et coll. "Cellules T intratumorales, récurrence et survie dans le cancer épithélial de l'ovaire ". *N. Engl. J.Méd.* 348, 203-213 (2003).
115. Van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. États des lymphocytes T CD8+ dans le cancer humain : aperçus de l'analyse unicellulaire. *Nat Rev Cancer.* 2020 ; 20 (4):218.
116. Blank C., Gajewski TF & Mackensen A. Interaction de PD-L1 sur les cellules tumorales avec PD-1 sur les cellules T spécifiques de la tumeur en tant que mécanisme d'évasion immunitaire : implications pour l'immunothérapie tumorale. *Immunol contre le cancer. Immunautre.*
117. Dong H. et coll. "Le B7-H1 associé à la tumeur favorise l'apoptose des lymphocytes T : un mécanisme potentiel d'évasion immunitaire ". *Nat. Méd.* 8, 793-800 (2002).
118. Sakuishi K. et coll. Les lymphocytes T régulateurs TIM3+FOXP3+ sont des promoteurs spécifiques des tissus du dysfonctionnement des lymphocytes T dans le cancer. *Oncoimmunologie* 2, e23849 (2013).
119. Sakuishi K. et coll. "Cibler les voies Tim-3 et PD-1 pour inverser l'épuisement des lymphocytes T et restaurer l'immunité anti-tumorale ". *J. Exp. Méd.* 207, 2187-2194 (2010).
120. Neslihan Cabioglu, Gizem Oner, Hüseyin Karatay, Mustafa Tukenmez, Mahmut Muslumanoglu, Abdullah Igci et al. L'expression de TIM3 sur les TIL est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie néoadjuvante chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif localement avancé. *Cancer BMC.* 6 avril 2021;21(1):357.
121. Berckmans Y, Vankerckhoven A, Caro AA, Kempeneers J, Ceusters J, Thirion G, Vandenbrande K, Vergote I, Laoui D, Coosemans A. L'inhibition du point de contrôle TIM3 ne parvient pas à prolonger la survie chez les souris porteuses d'un cancer de l'ovaire. *Cancers (Bâle).* 14 mars 2024 PMID : 38539483.
122. Hollebecque A., Chung HC, de Miguel MJ, Italiano A., Machiels J.-P., Lin C.-C. et al. Sécurité et activité antitumorale de l'anticorps α -PD-L1 en monothérapie ou en association avec l'anticorps α -TIM-3 chez les patients présentant une instabilité des microsatellites – réparation élevée/inadéquation – tumeurs déficientes. *Clin. Cancer Rés.* 2021.
123. Liu JF, Ma SR, Mao L, Bu LL, Yu GT, Li YC et al. Le blocage de la mucine 3 par immunoglobuline des lymphocytes T entraîne une réponse immunitaire antitumorale dans le cancer de la tête et du cou. *Mol Oncol.* Février 2017.
124. Farren MR, Mace T, Geyer S, Mikhail S, Wu C, Ciombor KK et al. L'activité immunitaire systémique prédit la survie globale chez les patients naïfs de traitement atteints d'un cancer du pancréas métastatique . *Clini Cancer Res.* 22 , 2565-2574.
125. Zheng H, Guo X, Tian Q, Li H et Zhu Y (2015). Rôle distinct de Tim-3 dans le lupus érythémateux disséminé et le carcinome rénal à cellules claires . *Int J Clin Exp Med* 8 , 7029-7038.

126. Gürler, F., Aktürk Esen, S., Akyürek, N., Kurt İnci, B., Sütçüoğlu, O., Uçar, G. et al. Retrospective Analyses of PD-L1, LAG-3, TIM-3, OX40L Expressions and MSI Status in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Cancer Investigation*, 42(2), 141–154. <https://doi.org/10.1080/07357907.2024.2330102>.
127. Yu X, Harden K, Gonzalez LC et al. La protéine de surface TIGIT supprime l'activation des lymphocytes T en favorisant la génération de cellules dendritiques immunorégulatrices matures. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 48-57.
128. Boles KS, Vermi W, Facchetti F et al. Une nouvelle interaction moléculaire pour l'adhésion des cellules T CD4 folliculaires aux DC folliculaires. *Eur J Immunol* 2009 ; 39 : 695-703.
129. H. Harjunpää et C. Guillerey. TIGIT comme point de contrôle immunitaire émergent. *Clin Exp Immunol*. mai 2020 ; 200(2) : 108-119.
130. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J et al. L'immunorécepteur TIGIT régule la fonction effectrice des lymphocytes T CD8(+) antitumorale et antivirale. *Cellule cancéreuse* 2014 ; 26 :923–37.
131. Kong Y, Zhu L, Schell TD et al. L'immunoglobuline des lymphocytes T et le domaine ITIM (TIGIT) sont associés à l'épuisement des lymphocytes T CD8+ et à de mauvais résultats cliniques chez les patients atteints de LMA. *Clin Cancer Res* 2016 ; 22 : 3057–66.
132. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J et al. TIGIT et PD-1 altèrent les cellules T CD8(+) spécifiques de l'antigène tumoral chez les patients atteints de mélanome. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 2046-58.
133. Guillerey C, Harjunpää H, Carrie N et al. Le blocage du point de contrôle immunitaire TIGIT rétablit l'immunité des lymphocytes T CD8(+) contre le myélome multiple. *Sang* 2018 ; 132 :1689–94.
134. Stalhammar G, Seregard S, Grossniklaus HE. "Expression des récepteurs de point de contrôle immunitaire indoléamine 2,3-dioxygénase et du domaine Ig et ITIM des lymphocytes T dans le mélanome choroidien métastatique et non métastatique ». *Cancer Med* 2019 ; 8 :2784–92.
135. O'Brien SM, Klampatsa A, Thompson JC et al. Fonction des lymphocytes humains infiltrant les tumeurs dans le cancer du poumon non à petites cellules à un stade précoce. *Cancer Immunol Res* 2019 ; 7 : 896-909.
136. He W, Zhang H, Han F et al. La signalisation CD155/TIGIT régule le métabolisme des lymphocytes T CD8(+) et favorise la progression tumorale dans le cancer gastrique humain. *Rés Can* 2017 ; 77 : 6375–88.
137. Degos C, Heinemann M, Barrou J et al. Le microenvironnement de la tumeur endométriale modifie le recrutement des cellules NK humaines, ainsi que le phénotype et la fonction des cellules NK résidentes. *Avant Immunol* 2019 ; 10 : 877.
138. Fourcade J, Sun Z, Chauvin JM et al CD226 s'opposent au TIGIT pour perturber les Tregs dans le mélanome. *Aperçu JCI* 2018 ; 3 : pii : 121157.
139. Sun Y., Luo J., Chen Y. et al. L'évaluation combinée de l'état d'expression de CD155 et de TIGIT joue un rôle important dans le pronostic du LUAD (adénocarcinome du poumon) *Int Immunopharmacol*. 2020.
140. Sicong Li, Li Lanxing, Poêle Tianyan, Xiaoqun Li, Yujia Tong, Yongdong Jin. Valeur pronostique du TIGIT chez les patients d'Asie de l'Est atteints de cancers solides : une revue systématique, une méta-analyse et une analyse du pancancer. *Immunol avant* .2022 septembre 21:13:977016.
141. Cho BC, Abreu DR, Hussein M. et al. Tiragolumab plus atezolizumab versus placebo plus atezolizumab comme traitement de première intention du cancer du poumon non à petites cellules sélectionné par PD-L1 (CITYSCAPE) : analyses primaires et de suivi d'une étude de phase 2 randomisée, en double aveugle. *Lancette Oncol*. 2022 ; 23 (6) : 781-792.
142. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2016 Nov;29(11):1433-1442. doi: 10.1038/modpathol.2016.139. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27443512; PMCID: PMC5083129.
143. Kim JH, Park HE, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016 Aug 9;115(4):490-6. doi: 10.1038/bjc.2016.211. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27404452; PMCID: PMC4985354.

144. Llosa NJ, Cruise M, Tam A et al. Le microenvironnement immunitaire vigoureux du cancer du côlon instable microsatellite est équilibré par de multiples points de contrôle contre- inhibiteurs . *Cancer Découverte* 2015.
145. Lee SJ, Byeon SJ, Lee J et coll. LAG3 dans les tumeurs solides comme nouvelle cible potentielle d'immunothérapie. *J Immunother* 2019.
146. An S, Li W, Do H, Kwon HY, Kim B, Kim K et al. The Expression Patterns of Immune Checkpoint Molecules in Colorectal Cancer: An Analysis Based on Microsatellite Status. *Biomedicine*. 2024 Mar 28;12(4):752. doi: 10.3390/biomedicine12040752. PMID: 38672108; PMCID: PMC11048643.
147. Lee, SJ, Jun, SY., Lee, IH et al. Expressions de CD274, LAG3 et IDO1 dans les cellules immunitaires infiltrant la tumeur comme biomarqueur pronostique pour les patients atteints d'un cancer du côlon à MSI élevé. *J Cancer Res Clin Oncol* 144, 1005–1014 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2620-x>.
148. Li R, Qiu J, Zhang Z, Qu C, Tang Z, Yu W et al. Prognostic significance of Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) in patients with solid tumors: a systematic review, meta-analysis and pan-cancer analysis. *Cancer Cell Int*. 2023 Dec 2;23(1):306. doi: 10.1186/s12935-023-03157-5. PMID: 38041068; PMCID: PMC10693146.
149. Xu J, Shen D, Zhang T, Wang J, De W, Zhang J. Lymphocyte-activated gene-3 (LAG3) protein expressed in tumor-infiltrating lymphocytes of colorectal cancer. *Pol J Pathol*. 2021;72(4):324-330. doi: 10.5114/pjp.2021.114177. PMID: 35308003.
150. Zaravinos A, Roufas C, Nagara M et al. L'activité cytolytique est en corrélation avec la charge mutationnelle et l'expression dérégulée des points de contrôle immunitaires dans le cancer colorectal . *J Exp Clin Cancer Res* . 2019 ; 38 (1) : 364.
151. Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Le blocage du récepteur de point de contrôle TIGIT prévient l'épuisement des cellules NK et suscite une puissante immunité antitumorale . *Nat Immunol* . 2018 ; 19 (7) : 723 – 732.
152. Zhou X, Ding X, Li H et al. "Régulation positive de TIGIT et PD-1 dans le cancer colorectal avec déficit de réparation des mésappariements" . *Immunol Invest* . 2020 ; 13 : 1 – 18.
153. Emer O'Connell, Manuela Salvucci, Ian S Reynolds, Deborah A McNamara, John P Burke, Jochen HM Prehn. Le cancer colorectal mucineux est associé à l'expression du point de contrôle immunitaire TIM-3 indépendamment du statut d'instabilité des microsatellites (MSI). *Ann Surg Oncol*.2021 novembre;28(12):7999-8006.
154. Xu B, Yuan L, Gao Q et al. "Tim-3 circulant et infiltrant la tumeur chez les patients atteints d'un cancer colorectal" . *Oncotarget* 2015 ; 6 : 20592 – 20603 .
155. Liu J, Zhang S, Hu Y et al. "Cibler les voies PD-1 et Tim-3 pour inverser l'épuisement des lymphocytes T CD8 et améliorer les réponses des lymphocytes T ex vivo aux vaccins dendritiques/tumoraux autologues" . *J Immunother* 2016 ; 39 : 171-180.
156. Max Klapholz, Michael G. Drage, Amitabh Srivastava, Ana C Anderson. La présence de lymphocytes T Tim3 + et PD-1 + CD8 + identifie les carcinomes colorectaux stables microsatellites avec un épuisement immunitaire et des caractéristiques clinicopathologiques distinctes. *J Pathol*. Juin 2022 ; 257(2) : 186-197.
157. Kim JH, Park HE, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016 Aug 9;115(4):490-6. doi: 10.1038/bjc.2016.211. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27404452; PMCID: PMC4985354.
158. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso ML et al. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*. 2018 Jan 12;9(9):8584-8596. doi: 10.18632/oncotarget.24196. PMID: 29492219; PMCID: PMC5823560.
159. Datar I., Sanmamed MF, Wang J., Henick BS, Choi J., Badri T. et al. Analyse de l'expression et signification de PD-1, LAG-3 et TIM-3 dans le cancer du poumon non à petites cellules humain à l'aide d'une analyse unicellulaire résolue spatialement et multiparamétrique. *Clin. Cancer Res*. 2019 ; 25 : 4663–4673. doi : 10.1158/1078-0432.CCR-18-4142.
160. Srivastava P, Husain N, Shukla S, Chauhan S, Pandey A, Masood S. PD-L1 Expression in colorectal carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters, microsatellite instability and BRAF mutation. *Indian J Pathol Microbiol*. 2021 Jul-Sep;64(3):4f90-496. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_521_20. PMID: 34341259.

161. Zhu H, Qin H, Huang Z, Li S, Zhu X, He J, et al. Signification clinique du ligand de mort cellulaire programmée-1 (PD-L1) dans l'adénocarcinome dentelé colorectal *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:9351–9.
162. Teng F, Meng X, Kong L, Mu D, Zhu H, Liu S et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, forkhead box P3, programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 expressions before and after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Transl Res*. 2015 Dec;166(6):721-732.e1. doi: 10.1016/j.trsl.2015.06.019. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26209749.
163. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015 Jan;5(1):43-51. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0863. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25358689; PMCID: PMC4293246.
164. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015 Jan;5(1):16-8. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1397. PMID: 25583798; PMCID: PMC4295637.
165. Zhou E, Huang Q, Wang J, Fang C, Yang L, Zhu M et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jul 1;8(7):8018-27. PMID: 26339368; PMCID: PMC4555696.

RESUME ET MOTS CLES

PROFIL IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRE DANS LE CANCER COLORECTAL AVEC INSTABILITE DES MICROSATELLITES : CORRELATIONS ANATOMO-CLINIQUES.

Introduction : Ces dernières années, le traitement des cancers par immunothérapie s'est largement étendu en oncologie notamment dans la prise en charge des cancers colorectaux (CCR) avec déficit du système *MismatchRepair* (dMMR) et instabilité microsatellitaire (MSI). En interagissant sur les interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI), permettent de contrecarrer l'échappement immunitaire de la tumeur en réactivant une réponse immunitaire antitumorale efficace. La grande majorité des tumeurs dMMR/MSI sont très sensibles aux ICI mais certains patients présentent des résistances aux ICI. De plus, l'expression des points de contrôle immunitaire (ICP) reste peu étudiée dans les CCR dMMR/MSI.

Matériel et méthode : Nous avons étudié les profils d'expression immunohistochimique du *programmed 1 Death Ligand-1* (PDL-1), du *Cytotoxic Lymphocyte Associated Antigen-4* (CTLA-4), du *Lymphocyte activation gene-3* (LAG-3), du *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) et de *T cells immunoglobulin and mucin containing protein-3* (TIM-3) chez 24 patients atteints de CCR dMMR/MSI traités par immunothérapie. L'objectif de l'étude était de rechercher des corrélations entre l'expression de ces points de contrôle immunitaire et les caractéristiques tumorales et l'efficacité de l'immunothérapie.

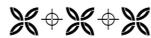
Résultats : Nous avons constaté dans 45.8 % des cas une expression de PD-L1, 25 % de CTLA-4, 75 % de LAG-3, 79.8 % de TIGIT et 100% de TIM-3. L'expression au niveau du front d'invasion tumoral était prédominante sauf pour TIM-3 où l'expression était plus diffuse. Nous avons mis en évidence une forte corrélation entre l'expression des 5 points de contrôle de la réponse immunitaire, la plus forte entre PD-L1 et CTLA4 ($p=0.0006$). L'expression concomitante de plusieurs ICP atteignait 91.3 % au niveau du front d'invasion tumorale. L'expression des ICI était plus importante dans les ADK NOS par rapport au sous-type mucineux. L'expression de PD-L1 était plus élevée dans les stades II et III par rapport au stade IV ($p=0.05$). L'expression de PD-L1 était corrélée à l'absence de carcinose péritonéale ($p=0.03$). Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de PDL-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3 et la survie sans progression et la survie globale. Néanmoins, un niveau plus élevé d'expression de TIGIT était associé à une survie globale plus courte.

Conclusion : Nous avons démontré une co-expression des points de contrôle de la réponse immunitaire dans les CCR dMMR/MSI et des corrélations avec certaines caractéristiques tumorales et la survie. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés dans des séries indépendantes de plus large effectif mais

ouvre la voie à une optimisation personnalisée du traitement par immunothérapie des CCR dMMR/MSI en fonction de l'expression tumorale des différents points de contrôle de la réponse immunitaire.

Mots-clés : cancer colorectal, instabilité microsatellitaire, déficit de réparation des mésappariements de l'ADN, points de contrôle immunitaire.

SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

