HAL
open science

Caractérisation anatomo-clinique et phénotypique des adénocarcinomes canalaires du pancréas avec instabilité des microsatellites

Renato Micelli Lupinacci

To cite this version:

Renato Micelli Lupinacci. Caractérisation anatomo-clinique et phénotypique des adénocarcinomes canalaires du pancréas avec instabilité des microsatellites. Cancer. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066311 . tel-01720460

HAL Id: tel-01720460

https://theses.hal.science/tel-01720460v1

Submitted on 1 Mar 2018

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

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

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Centre de Recherche Saint-Antoine UMR_S 938, INSERM, UPMC

Equipe « Instabilité des Microsatellites & Cancers »

THESE DE DOCTORAT

Spécialité Génétique des Cancers

Caractérisation anatomo-clinique et phénotypique des adénocarcinomes canalaires du pancréas avec instabilité des microsatellites

Présentée par

Renato MICELLI LUPINACCI

Dirigée par le Professeur Magali SVRCEK

Soutenue publiquement le 21 novembre 2017 devant un jury composé de :

P^{r}. Pierre AUCOUTURIER	Président
P^{r}. Emmanuelle LETEURTRE	Rapporteur
P^{r}. Eric VAN CUTSEM	Rapporteur
D^{r}. Nelson DUSETTI	Examinateur
P^{r}. Pierre CATTAN	Examinateur
P^{r}. Magali SVRCEK	Directrice de thèse
D^{r}. Alex DUVAL	Directeur du laboratoire

Dédicace

A mes parents qui m’ont appris la valeur de l’effort et m’ont élevé dans l’amour.

A mon épouse Constance qui a accepté de construire avec moi ce qui nous dépasse.

A mes filles Louise et Alice qui subliment mon passage dans ce monde.

RESUME

L'adénocarcinome canalaire du pancréas (ACP) est un problème majeur de santé publique du fait de sa mortalité extrêmement élevée. L'ACP se développe principalement à partir de deux lésions précurseurs : les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques et les tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP). Les mécanismes moléculaires sous-tendant l'oncogenèse pancréatique sont nombreux. Nous avons étudié, plus particulièrement, le mécanisme de cancérogenèse MSI (MicroSatellite Instability) où il existe une déficience dans le système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN ou système MMR (Mismatch Repair) (dMMR). Ce mécanisme de cancérogenèse original est caractérisé par une instabilité génétique de l'ADN affectant les séquences répétées microsatellites du génome. Le phénotype MSI a été décrit initialement dans le syndrome génétique de Lynch (SL), dans lequel il existe une mutation germinale d'un des gènes du système MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*). Dans les cancers sporadiques le phénotype MSI est lié à une méthylation du promoteur de *MLH1.* L'intérêt de l'étude des cancers MSI s'est accru de façon considérable ces dernières années avec le développement des immunothérapies dirigées contre les checkpoints immunitaires (ICK), en particulier PD-1/PD-L1. A l'heure actuelle, la fréquence du phénotype MSI dans les ACP, de même que les principales caractéristiques anatomo-cliniques et phénotypiques de ces tumeurs demeurent mal connues. L'objectif de ces travaux a donc été de mieux caractériser, à la fois d'un point de vue anatomo-pathologique, mais aussi moléculaire, les ACP présentant un phénotype dMMR/MSI.

Nous avons pu confirmer que la fréquence du phénotype MSI se situe entre 1-2%. Aussi, nous avons montré que l'immunohistochimie à l'aide des 4 protéines du système MMR est probablement la méthode de screening plus adaptée pour l'identification de l'ACP dMMR/MSI en comparaison avec les techniques de biologie moléculaire. De manière intéressante, le phénotype dMMR/MSI a été plus fréquemment observé dans un contexte de TIPMP. Les cas dMMR/MSI identifiés présentaient des caractéristiques biologiques évocatrices du syndrome de Lynch (perte d'expression hétérogène des protéines MMR et absence de méthylation du promoteur de *MLH1*). Egalement, nos résultats confirment la présence d'un processus de carcinogenèse MSI immunogénique, mais suggèrent que des évènements somatiques issus de l'instabilité microsatellitaire semblent spécifiques à l'organe d'origine du cancer. Par ailleurs, les ACP dMMR/MSI étaient caractérisés par un infiltrat inflammatoire riche en lymphocytes cytotoxiques T CD8+ (en particulier au niveau du front d'invasion) et surexprimaient l'ICK PD-L1. L'ensemble de ces données permettent de supposer une probable réponse clinique de l'ACP dMMR/MSI à l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1.

Bien que notre étude n'ait porté que sur un nombre limité de cas, il nous paraît raisonnable, à la lumière de nos résultats, de proposer la recherche du statut dMMR par IHC chez tous les patients opérés d'ACP et plus particulièrement d'une TIPMP dégénérée. De même, tous les facteurs permettant de suspecter d'un SL doivent être investigués.

Mots clés : Cancer du Pancréas ; Tumeur Intracanalaire Papillaire et Mucineuse du Pancréas ; Immunohistochimie ; Checkpoints Immunitaires ; Instabilité de Microsatellites

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a major public health problem in France and around the world because of its extremely high mortality. PDAC is developed mainly from two precursor lesions: pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN). There are several molecular mechanisms underlying pancreatic oncogenesis. Particularly, we were interested in the MSI (MicroSatellite Instability) which is due to a defective DNA Mismatch Repair (MMR) system, which normally functions to recognize and repair erroneous insertions, deletions, and mis-incorporation of bases that can arise during DNA replication and recombination. MSI tumors develop through a distinctive molecular pathway characterized by genetic instability in numerous microsatellite DNA repeat sequences spread throughout the genome. The MSI phenotype was first described in the familial cancer condition known as Lynch syndrome (LS), where the MMR genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2* harbor germline mutations. It is also observed in sporadic cancer due to epigenetic, bi-allelic silencing of MLH1 expression by de novo methylation of the *MLH1* promoter. Interest in MSI tumors has recently increased after studies have highlighted the concomitant expression of multiple active immune checkpoint (ICK) markers including PD-1 and PD-L1 and the role of the MSI status to predict clinical benefit from immune checkpoint blockade. At present, the frequency of the MSI phenotype in PDAC, as well as its main anatomo-clinical features and phenotypic characteristics remains poorly understood. The aim of this work was to better characterize MSI/dMMR PDAC, both anatomopathologically and molecularly.

Our results indicate the dMMR/MSI phenotype occurs in PDAC with a frequency of 1-2%. Overall, our data showed that IHC using antibodies against the four MMR proteins was more sensitive for the assessment of dMMR/MSI status in PDAC than PCR-based methods. In addition, we demonstrate for the first time a statistically significant positive association between dMMR/MSI and IPMNs in PDAC. dMMR/MSI PDAC, including IPMN, are unlikely to be sporadic since they display molecular features that are usually observed in LS-related neoplasms, e.g. heterogeneous MMR defects (MLH1, MSH2, MSH6) without methylation of the *MLH1* promotor. Also, our results highlight that an MSI-driven immunogenic pathway to cancer is active in dMMR/MSI PDACs but suggest that MSI-driven somatic events may be tissue-specific. We observed a stronger lymphocytic tumor infiltration by activated TCD8 cells (especially at the invasive front) in dMMR/MSI PDAC compared to MSS PDAC and found a positive association between PD-L1 expression and MMR status. These results suggest that dMMR/MSI PDAC could be responsive to ICK blockade therapy.

Despite of the limitations of this work, we feel comfortable to propose the systematic screening of PDAC (and particularly in the context of IPMN-related PDAC) for dMMR/MSI using IHC. Also, the research of LS features shall be encouraged.

Keywords: Pancreatic cancer; Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm; Immunohistochemistry; Immune checkpoint; Microsatellite Instability.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements au **Professeur Pierre Aucouturier** pour avoir accepté de présider cette soutenance de Thèse de Sciences. J'adresse mes profonds remerciements au **Professeur Emmanuelle Leteurtre** et au **Professeur Eric Van Cutsem** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de le rapporter. Je suis honoré et fier d'être jugé par deux confrères dont l'expérience clinique et la rigueur scientifique ont construit leur renommée. Je remercie le **Professeur Pierre Cattan**, véritable chirurgien chercheur et collègue de bistouri, qui ne peut ignorer l'investissement nécessaire à l'aboutissement de ce travail, d'avoir accepté de l'examiner. Je remercie aussi le **Docteur Nelson Dusetti** non seulement d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi et surtout pour la générosité et confiance dont il a fait preuve à mon égard.

Je remercie vivement le **Docteur Alex Duval** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Alex, je ne saurai trouver les mots pour te dire quelle chance j'ai eu de travailler dans ton laboratoire. Le travail que je présente n'aurait évidemment pas existé sans ton aide. J'espère que cette thèse sera le début d'une riche collaboration.

Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, le **Professeur Magali Svrcek**. Chère Magali, cette thèse a été portée par ton énergie et ta détermination. Tes connaissances et ta rigueur ont apporté à ce travail une dimension particulière. Je te remercie de ta confiance, ta patience et surtout de tes encouragements.

J'aimerais remercier le **Professeur Jean Baptiste Bachet** pour m'avoir offert son aide dès le début de ce projet. Merci aussi pour ton amitié.

Je remercie également le **Docteur Juan Iovanna** pour sa contribution importante à ce travail.

J'aimerais remercier les ingénieurs de l'équipe, **Kristell Wanherdrick** et **Olivier Buhard** qui ont participé et contribué au bon déroulement de ce projet. Un grand merci Olivier pour l'aide dans d'innombrables domaines et ta patience sans limite avec mon ignorance informatique.

Je remercie le Service d'Anatomo-Pathologie, et en particulier le **Professeur Jean François Fléjou**, le **Docteur Pascale Cervera** ainsi que **Sylvie Dumont** et **Aurélie Scriva** pour leurs conseils, expertises et aides techniques.

Je tiens à remercie **A'dem Bokhari** et **Malorie Greene** pour leur aide précieuse surtout ces dernier mois.

Je tiens enfin à remercier les autres membres de l'équipe, que j'ai eu l'occasion de côtoyer au cours de ces trois années : **Marie-Annick**, **Martine**, **Ada**, **Romain**, **Mouna**, **Delphine**, **Vincent** et **Anastasia**.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 10

LISTE DES FIGURES 12

LISTE DES TABLEAUX 13

I. INTRODUCTION 14

A. Les cancers du pancréas 15

1. Epidémiologie 15

a) Facteurs de risque 17

(1) Tabagisme 17

(2) Diabète 17

(3) Alimentation et obésité 17

(4) Pancréatite chronique 18

2. Histoire familiale et susceptibilité génétique 18

3. Classification histologique 19

a) L'adénocarcinome canalaire du pancréas (ACP) 19

(1) Variantes histologiques de l'ACP 21

b) Classification TNM 21

4. Oncogenèse et lésions pré cancéreuses 24

a) Les lésions pré cancéreuses 26

b) Tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) 27

5. Traitement 30

a) Chirurgie 30

b) Chimiothérapie et radiothérapie 32

B. Oncogenèse MSI 33

1. Le système MMR 33

a) Le fonctionnement du système MMR 33

2. L'oncogenèse MSI (déficience du système MMR) 36

a) Les cancers MSI héréditaires : le syndrome de Lynch (SL) 37

(1) Historique et définition 37

(2) Caractéristiques moléculaires et génétiques du SL....38

(3) Identification des patients atteints du SL....40

b) Le syndrome CMMRD....41

c) Les cancers MSI sporadiques....41

3. Détermination du statut MSI/MMR....43

a) Valeur pronostique et prédictive du statut MSI/MMR....43

b) Méthodes de détermination....44

(1) Le génotypage....44

(2) L'immunohistochimie....46

C. Le cancer du pancréas MSI....48

1. Fréquence de l'instabilité de microsatellites dans l'ACP....48

2. Cancer du pancréas et syndrome de Lynch....54

3. Variantes histologiques du cancer du pancréas associées au phénotype MSI....55

D. Immunologie et cancer....56

1. Le système immunitaire....57

2. Système immunitaire et cancer....59

a) L'immuno-editing....60

b) Les check-points immunologiques....64

(1) CTL-4....66

(2) PD-1....66

3. L'immunologie des tumeurs MSI....68

a) Différences entre les cancers MSI sporadiques et héréditaires (SL)....71

4. Immunothérapie....72

a) Immunothérapie et cancer du pancréas....74

II. RESULTATS.... 76

III. DISCUSSION.... 109

A. Fréquence du phénotype MSI dans l'ACP....110

B. Quelle est la meilleure méthode pour diagnostiquer le phénotype MSI dans l'ACP ?....111

C. L'ACP de phénotype MSI présente-t-il des caractéristiques morphologiques particulières?....112

1. Syndrome de Lynch et l'ACP....112

D. Le phénotype MSI est-il un critère pronostique pour l'ACP ? 113
E. Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire et de l'environnement tumoral 114
F. Analyse mutationnelle des gènes cibles 115
G. Expression des checkpoints immunologiques 116

IV. PERSPECTIVES 118

V. CONCLUSION 120

VI. REFERENCES 121

VII. ANNEXES 146

A. Classification OMS 146
B. Articles cités dans la these 146
Para-aortic lymph node sampling in pancreatic head carcinoma (*Br J Surg 2014*) 146
Distal pancreatectomie for pancreatic carcinoma in the era of multimodal treatment (*Br J Surg 2015*) 146

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Adénocarcinome Canalaire du Pancréas
CAM	Cystadénome Mucineux
CCR	Cancers ColoRectal
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMMRD	*Constitutional MisMatch Repair Deficiency*
cMS	*coding MicroSatellite*
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigène
CTLA-4	*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*
EpCAM	*Epithelial Cell Adhesion Molecule*
FDA	*Food and Drugs Administration*
HNPCC	*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*
HSP	*Heat Shock Protein*
ICGC	*International Cancer Genome Consortium*
IHC	ImmunoHistoChimie
MMR	*MisMatch Repair*
dMMR	*deficient MisMatch Repair*
pMMR	*proficient MisMatch Repair*
MSI	*MicroSatellite Instability*
NK	*Natural Killers*
PanIn	*Pancreatic Intra-epithelial neoplasm*
PD-1	*Programmed-cell Death 1*
PDX	Xénogreffes
SEER	*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*
SG	Survie Globale
SL	Syndrome de Lynch
SSR	Survie Sans Récidive

TCGA	*The Cancer Genoma Atlas*
TIL	*Tumor Infiltrate Lymphocytes*
TMA	*Tissue Micro-Array*
TIPMP	Tumeurs Intracanalaires Papillaires et Mucineuses
TCR	*T-Cell Receptors*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Aspect histologique de l'adénocarcinome canalaire du pancréas 20

Figure 2. Schéma anatomique du pancréas : organes de voisinage et relais ganglionnaires 22

Figure 3. Processus et voies de signalisation des cancers pancréatiques 24

Figure 4. « PanINgram » 27

Figure 5. Macroscopie. Coupe transversale d'une TIPMP du canal pancréatique principal 28

Figure 6. Mode d'action du système MMR chez l'Homme 35

Figure 7. Le système immunitaire inné et adaptatif 58

Figure 8. Mutations, néoantigènes et immunogénéicité 61

Figure 9. Le processus d'immuno-editing 62

Figure 10. L'immunité antitumorale chez l'homme 63

Figure 11. Mécanisme d'expression des ligands du PD-L1 et mécanisme d'action des anticorps anti PD-1 et anti PD-L1 67

Figure 12. Immunogénéicité et évasion immunitaire secondaires aux mutations de cMS.....70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Syndromes génétiques associés au cancer du pancréas 19

Tableau 2. AJCC 2009, 7ème version 23

Tableau 3. Critères d'Amsterdam I, Amsterdam II et de Bethesda 42

Tableau 4. Revue de la littérature (cancer du pancréas et instabilité de microsatellites). 51

I. INTRODUCTION

Le cancer du pancréas est un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. Sa mortalité reste extrêmement élevée, malgré les progrès constants des techniques d'imagerie diagnostique et de la prise en charge médico-chirurgicale. Le taux de survie à 5 ans, tous stades confondus, est encore d'environ 5%, aux Etats-Unis, comme en Europe (Sant 2009 ; Jemal 2009).

Le terme de « cancer primitif du pancréas » s'emploie pour décrire une tumeur maligne dont l'origine est une cellule pancréatique. En fait, ce terme regroupe un grand nombre de tumeurs au comportement et au pronostic variés, mais que l'on peut séparer en deux groupes bien distincts : les rares tumeurs issues des îlots de Langerhans, c'est-à-dire du tissu pancréatique endocrine, et le groupe des tumeurs issues du pancréas non endocrine. Au sein de ce second groupe, qui compte une quinzaine de tumeurs différentes, l'adénocarcinome canalaire est de loin le plus fréquent puisqu'il représente à lui seul plus de 80% de la totalité des cancers pancréatiques (Winter 2006). Les cancers non canalaires sont beaucoup plus rares et forment un groupe hétérogène qui comprend, entre autres, le carcinome à cellules acineuses (développé à partir des acini pancréatiques), de même que des tumeurs conjonctives, lymphomateuses, ou encore le pancréatoblastome (De Martel 2010).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement à l'adénocarcinome canalaire du pancréas (ACP) dont le pronostic est effroyable, avec une croissance locale péri-nerveuse et vasculaire et une dissémination métastatique à distance précoces qui excluent la possibilité d'une chirurgie curatrice chez la plupart des patients. En outre, l'ACP est caractérisé par une résistance notable aux traitements plus conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie et thérapie moléculaire). Enfin, le cancer du pancréas est la conséquence de multiples altérations génétiques et épigénétiques et présente un microenvironnement tumoral dense et complexe, typiquement caractérisé par un stroma desmoplastique.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant la cancérogenèse pancréatique sont nombreux. Les stratégies émergentes pour améliorer la prise en charge du cancer du pancréas incluent l'identification de sous-groupes de patients, permettant ainsi un

traitement individualisé, le développement de thérapies moléculaires ciblées et une meilleure compréhension du microenvironnement tumoral comme cible potentielle (Kleeff 2016). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au mécanisme de cancérogenèse MSI (MicroSatellite Instability), un mécanisme de cancérogenèse original lié à une instabilité génétique de l'ADN affectant les séquences répétées microsatellites du génome. Les tumeurs MSI sont déficientes dans le système de réparation des erreurs de réplication de l'ADN ou système MMR (Mismatch Repair). En effet, l'intérêt de l'étude des cancers MSI s'est accru de façon considérable ces 5 dernières années avec le développement des immunothérapies dirigées contre les checkpoints de l'immunité. En effet, pour la première fois dans l'histoire de l'agence américaine de médicaments (FDA, Food and Drugs Administration), un phénotype, le phénotype MSI, a été considéré comme plus important que l'origine anatomique (organe-dépendant) comme condition préalable à l'utilisation d'un médicament anti-tumoral (immunothérapies).

Contrairement au cancer colorectal (CCR), de l'estomac et de l'endomètre, la fréquence du phénotype MSI dans les ACP, de même que les principales caractéristiques anatomo-cliniques et phénotypiques de ces tumeurs demeurent mal connues. Aussi, l'investigation relativement récente, et ce à grande échelle, des tumeurs de phénotype MSI extra-coliques, est en train redéfinir le paysage clinique de ces tumeurs (Espenschied 2017).

L'objectif de ces travaux a donc été de mieux caractériser, à la fois d'un point de vue anatomo-pathologique, mais aussi moléculaire, les ACP présentant un phénotype MSI.

A. Les cancers du pancréas

1. Epidémiologie

Les taux de mortalité par cancer ont progressivement diminué aux Etats-Unis et en Europe durant les deux dernières décennies (Hashim 2016 ; Rosso 2016 ; Siegel 2016), avec une baisse globale de la mortalité de 23%, permettant ainsi d'éviter 1,7 million de décès par cancer. Malgré ces progrès, le cancer reste, à l'heure actuelle, la principale cause de décès pour la population américaine. Des disparités importantes sont toutefois observées pour

certains cancers, avec une augmentation de l'incidence et de la mortalité, notamment pour les cancers du poumon chez la femme, du pancréas et du foie. Les projections européennes issues des registres d'incidence estiment la mortalité par cancer du pancréas en 2017 à 43600 personnes (Malvezzi 2017). Les taux d'incidence comparés à 2012 sont stables chez l'homme (7.9/100000 personnes) mais augmentent de 3.5% chez la femme (5.6/100000 personnes).

Par rapport à la plupart des autres tumeurs pancréatiques malignes, l'adénocarcinome canalaire se caractérise par un pronostic particulièrement sombre, avec une médiane de survie de 13 à 18 mois pour les patients qui peuvent bénéficier d'une intervention curative, et de seulement 6 mois pour les patients non opérables (Winter 2006 ; Cress 2006). Alors que la résection chirurgicale est le seul traitement curatif possible, seuls moins de 20% des patients sont éligibles à une intervention au moment du diagnostic (Spanknebel 2001) ; toutefois, même si une chirurgie à but curatif a été possible et qu'une chimiothérapie adjuvante a pu être réalisée, la survie à 5 ans est d'environ 20% (Oettle 2013). Pour la majorité des patients qui ne peuvent pas bénéficier d'une exérèse chirurgicale, la chimiothérapie palliative prolonge la survie d'à peine quelques mois (Conroy 2011).

L'âge médian de survenue du cancer du pancréas se situe aux alentours de 70 ans. Les données de SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results program) portant sur le début des années 2000 montrent qu'aux Etats-Unis le diagnostic est très rare avant l'âge de 45 ans (moins de 5% des cas), et que l'incidence augmente ensuite avec l'âge, et ce dans les deux sexes (Duffy 2009). Pour le cancer pancréatique, comme pour la plupart des cancers digestifs, à l'exception de celui de la vésicule biliaire, il existe une prédominance masculine marquée. Le sexe ratio est autour de 1.5. L'incidence reste stable chez l'homme, mais elle ne cesse d'augmenter chez la femme (Teiblum 2009 ; Malvezzi 2017).

L'incidence du cancer pancréatique se caractérise par une grande disparité géographique (de Martel 2010). Globalement, les pays les plus touchés sont situés en Amérique du Nord, en Europe (pays nordiques et Italie), et en Asie (Corée et Japon) (de Martel 2010). Peu de progrès ont été faits concernant le dépistage, le management et le traitement du cancer du pancréas. De même, la prévalence grandissante du surpoids, de l'obésité et du diabète a probablement affecté de façon défavorable les taux de cancer pancréatique (Bosetti 2014).

a) Facteurs de risque

Les facteurs de risque tels que le tabagisme, le diabète de type 2 et la pancréatite chronique sont actuellement responsables d'environ un quart à un tiers des cas d'ACP (Kleeff 2016).

(1) Tabagisme

Le tabac est le principal facteur de risque reconnu de cancer du pancréas (Kleeff 2016). La proportion des cas attribués au tabac est estimée à 15-30% (Bosetti 2012b ; Parkin 2011). Les fumeurs ont un risque 2- 3 fois supérieur aux non-fumeurs de développer un cancer du pancréas ; qui plus est, une relation dose-effet a été décrite, ainsi qu'une diminution du risque après l'arrêt du tabac. Même si l'effet du tabagisme peut paraître relativement faible en comparaison de celui observé pour les cancers du fumeur, comme le cancer du poumon ou celui de l'oropharynx, il est loin d'être négligeable, puisqu'il a été estimé que la suppression (théorique) totale et instantanée du tabagisme pourrait à elle seule prévenir 20 à 30% des cancers pancréatiques dans le monde, ce qui représenterait 150 000 patients au sein de l'Union Européenne pour la période 1994-2015 (Mulder 2002).

(2) Diabète

Le diabète de type 2 est également associé au risque de cancer du pancréas dans la quasi-totalité des études transversales ou prospectives réalisées à ce jour, mais l'interprétation des résultats de ces études est délicate. Le diabète est à la fois un facteur de risque pour le développement de la maladie et une conséquence du cancer pancréatique. L'existence d'un diabète entrainerait un risque 2 fois supérieur de cancer pancréatique (Bosetti 2012a).

(3) Alimentation et obésité

L'obésité et une faible activité physique sont aussi liées au cancer du pancréas (Behrens 2015 ; Genkinger 2015). Dans le cas du diabète comme dans celui de la surcharge pondérale, l'un des mécanismes physiopathologiques pourrait être une résistance à l'insuline qui se caractérise par une hyperactivité du pancréas, avec une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (de Martel 2010).

L'évaluation des risques liés à l'alimentation semble montrer à travers plusieurs études que la consommation excessive de graisses saturées, viande rouge et charcuterie, élèverait le

risque, alors qu'un régime riche en légumes et fruits serait associé à une légère diminution du risque (Jiao 2009 ; Larsson SC & Wolk 2012 ; Bosetti 2013).

(4) Pancréatite chronique

La pancréatite chronique, quelle que soit son origine, prédispose au cancer du pancréas. Dans les pays industrialisés, où elle est majoritairement due à une consommation excessive d'alcool, le risque de cancérisation augmente avec la durée de la pancréatite (Malka 2002). Deux formes particulières de pancréatite chronique ont été associées à des risques très élevés : la forme tropicale et la forme héréditaire. Dans les deux cas, la maladie est caractérisée par un plus jeune âge d'apparition, et la cancérisation survient également à un plus jeune âge. Une étude européenne qui a évalué la forme héréditaire sur 418 patients de 112 familles a trouvé un risque cumulé de cancer du pancréas de 8.5% à 40 ans (Howes 2004). Une étude américaine a également montré que la cancérisation survient plus tôt chez les patients fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Lowenfels 2001).

2. Histoire familiale et susceptibilité génétique

L'existence d'antécédents familiaux n'est retrouvée que dans un petit nombre de cas de cancers pancréatiques. Ainsi, environ 10% des patients ont une histoire familiale de cancer pancréatique (Turati 2013). Globalement, le risque de cancer pancréatique est à peine plus élevé chez les descendants d'un patient index que dans la population générale (HR 1,2 ; 95%CI 0,85-1,61) (Hemminki 2001). En effet, quelques conditions héréditaires présentent un risque accru de cancer pancréatique, en particulier le syndrome de Peutz-Jeghers. Les mutations des gènes *BRCA1*, *BRCA 2*, *CDKN2A*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1*, *MLH1* et *PALB2* sont associées à un risque de cancer du pancréas avec une pénétrance variable (**Tableau 1**) (Giardiello 2000 ; Lowenfels 1997 ; Howes 2004 ; Goldstein 1995 ; Borg 2000 ; Kastrinos 2009 ; Maisonneuve 2007 ; Iqbal 2012 ; Breast Cancer Linkage Consortium 1999 ; Geoffroy-Perez 2001 ; Ruijs 2010 ; Klein 2004). Cependant, dans la grande majorité des cas, les mutations successives conduisant à la cancérisation sont uniquement observées au niveau du tissu pancréatique et ne sont donc pas transmissibles. Ces mutations, appelées somatiques, surviennent spontanément ou sous l'action des facteurs environnementaux.

Tableau 1. Syndromes génétiques associés au cancer du pancréas. Adapté de Kleef 2016.

Syndrome	Gene affecté	Risque relatif	Références
Sd Peutz-Jeghers	*STK11*	132	Giardiello 2000
Pancréatite héréditaire	*PRSS1*	53-67	Lowenfels 1997; Howes 2004
FAMMM	*CDKN2A*	22-38	Goldstein 1995; Borg 2000
Sd Lynch	*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM*	9	Kastrinos 2009
Cancer Pancréatique Familial	non connu	9 *	Klein 2004
Mucoviscidose	*CFTR*	5	Maisonneuve 2007
Sd Seins-Ovaires	*BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51*	2-4	Iqbal 2012; BCLC 1999
Ataxie-télangiectasie	*ATM*	non connu	Geoffroy-Perez 2001
Sd Li-Fraumeni	*TP53, CHEK2*	non connu	Ruijs 2010

* 5-32 en fonction du nombre d'apparentés.
FAMM, familial atypical multiple mole melanoma; BCLC, breast cancer linkage consortium.

3. Classification histologique

Le parenchyme pancréatique est constitué d'environ 10% de cellules épithéliales canalaires, de 80% de cellules acineuses, d'environ 1% de cellules endocrines et le reste par du tissu conjonctif (Monges & Fléjou 2010). Au total, 60 à 70% des adénocarcinomes se développent dans la tête du pancréas, le reste dans le corps ou la queue. La classification de l'OMS est présentée en détails en annexes (**Annexe 1**).

a) L'adénocarcinome canalaire du pancréas (ACP)

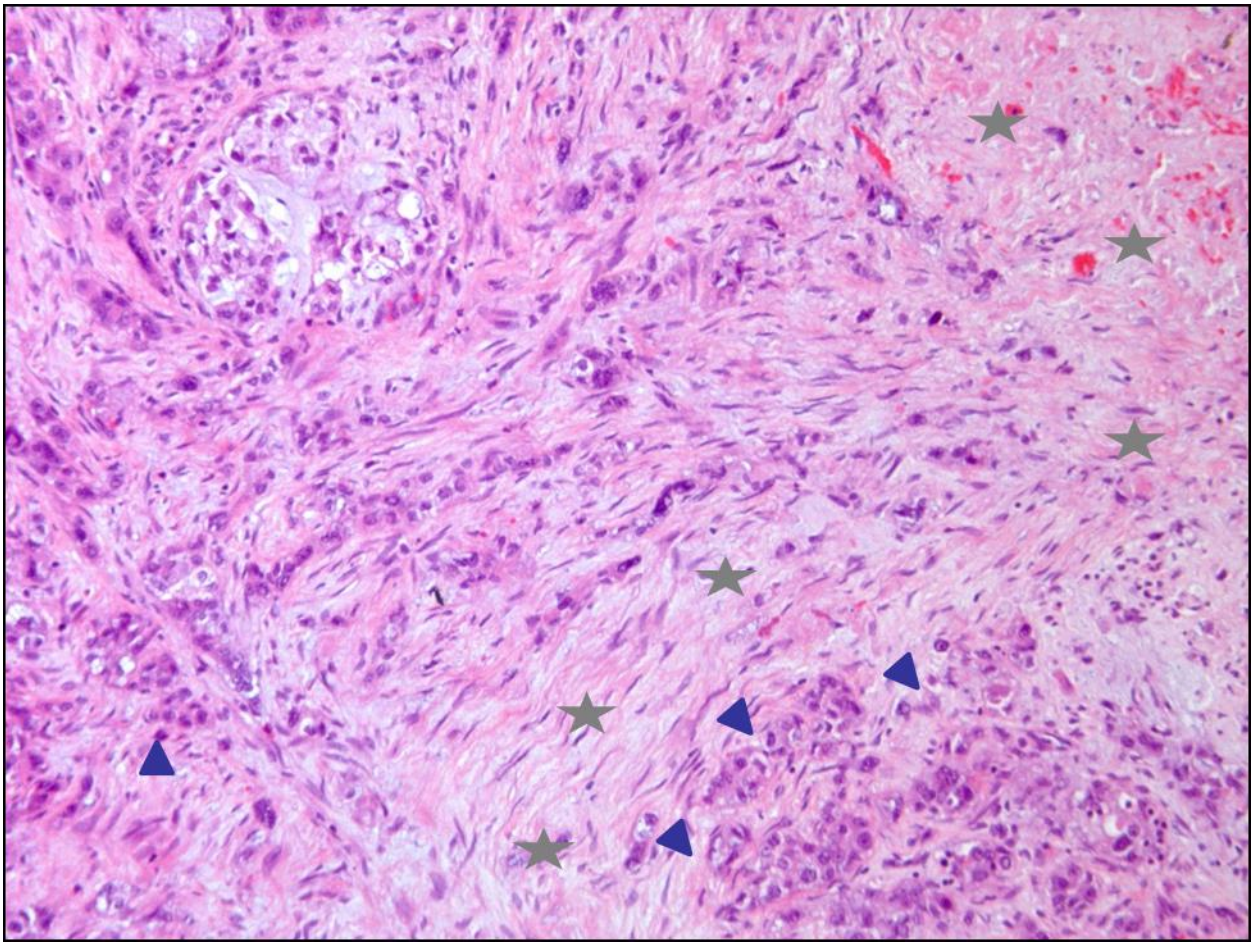
L'ACP se développe à partir des cellules épithéliales canalaires et représente, avec ses variantes histologiques, la très grande majorité des tumeurs solides primitives du pancréas.

La plupart des adénocarcinomes sont bien ou moyennement différenciés, caractérisés par des formations canalaires, glandulaires ou tubulaires développées dans un stroma desmoplasique (**Figure 1**) (Kloppel 2004). Les adénocarcinomes bien différenciés sont caractérisés par des formations canalaires, glandulaires ou tubulaires avec parfois des projections papillaires endocanalaires, des cellules éosinophiles, un index mitotique peu important. Dans les adénocarcinomes moyennement différenciés, les formations canalaires, glandulaires et tubulaires sont plus irrégulières, les cellules plus souvent éosinophiles, l'index mitotique plus élevé. L'adénocarcinome peu différencié est rare, avec des plages massives

sans structures canalaires, un stroma souvent inflammatoire, parfois nécrotique et hémorragique. Les cellules sont pléomorphes sans activité sécrétoire, et l'index mitotique est élevé (Monges & Fléjou 2010).

Il n'y a pas de marqueur immunohistochimique spécifique de l'ACP. Certains marqueurs sont utiles pour distinguer des adénocarcinomes de lésions non carcinomateuses (Hruban 2007). En règle générale, les adénocarcinomes du pancréas expriment les mucines : MUC1, MUC3, MUC5/6, mais pas MUC2 (qui est cependant exprimé dans l'adénocarcinome mucineux), ainsi que d'autres glycoprotéines : CA19-9, CA 125, ACE. Comme les cellules épithéliales canalaires, les adénocarcinomes expriment les cytokératines 7, 8, 18, 19, alors que la cytokératine 20 n'est généralement pas exprimée. Les marqueurs endocrines sont négatifs, de même que les enzymes pancréatique trypsine, chymotrypsine et lipase (Monges & Fléjou 2010).

Figure 1. Aspect histologique de l'adénocarcinome canalaire du pancréas (tête de flèche) comportant un abondant stroma desmoplasique (étoiles). H&E 100x.



(1) Variantes histologiques de l'ACP

Il existe des variantes histologiques de l'ACP, parmi lesquelles nous pouvons citer :

- les carcinomes médullaires, caractérisés par la faible différentiation et l'aspect syncytial des cellules, une assez bonne limitation en périphérie, et un nombre élevé de lymphocytes intra-tumoraux (Wilentz 2001). Ces tumeurs ne comportent en général pas de mutation du gène *KRAS*, contrairement aux adénocarcinomes canalaires classiques, et sont classiquement associés à une instabilité des microsatellites.

- les carcinomes adénosquameux (1 à 4%), dans lesquels la composante malpighienne doit représenter au moins 30% du tissu tumoral, et qui seraient plus fréquents au niveau de la queue du pancréas. Ils sont considérés de très mauvais pronostic (Voong 2010).

- les carcinomes hépatoïdes, composes de grandes cellules polygonales au cytoplasme éosinophile étendu, qui expriment l'alpha-fœtoprotéine. Leurs marqueurs immunohistochimiques plus spécifiques sont ceux du carcinome hépatocellulaire (Hep Par-1, ACE et CD10) (Hameed 2007).

b) Classification TNM

L'extension péri-pancréatique se fait le long des gaines péri-nerveuses dans le tissu cellulo-adipeux rétropéritonéal, secondairement dans les veines et les nerfs rétropéritonéaux. L'extension ganglionnaire se fait dans les relais lymphatiques régionaux, puis à distance dans les relais cœliaques et mésentériques supérieurs (**Figure 2**). Les métastases par voie hématogène s'observent par ordre décroissante dans le foie, les poumons, les surrénales, les reins, les os, le cerveau et la peau. L'extension directe dans les organes de voisinage et le péritoine est le fait de tumeurs avancées.

Le staging suit la classification pTNM (TNM 7, 2009), (Sobin 2009) (**Tableau 2**).

Figure 2. Schéma anatomique du pancréas : organes de voisinage et relais ganglionnaires. D'après Kleef 2016.

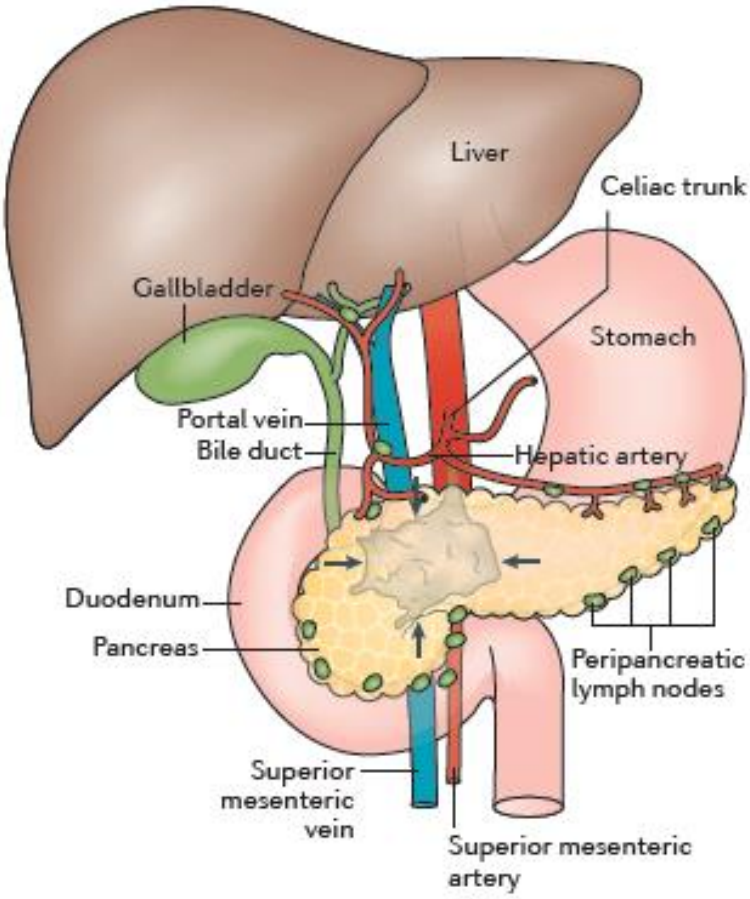


Tableau 2. AJCC 2009, 7ème version. Adapté de Sobin 2009.

T (extension tumorale) :	
Tx	renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
Tis	carcinome in situ
T1	tumeur limitée au pancréas inférieure ou égale à 2 cm dans son plus grand diamètre
T2	tumeur limitée au pancréas supérieure à 2 cm dans son plus grand diamètre
T3	tumeur s'étendant au-delà du pancréas mais sans envahir le tronc cœliaque ni l'artère mésentérique supérieure
T4	tumeur étendue au tronc cœliaque ou à l'artère mésentérique supérieure (tumeur primitive non résécable).
N (adénopathies)* :	
Nx	renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	envahissement des ganglions lymphatiques régionaux
M (métastases) :	
M0	pas de métastase,
M1	présence de métastase(s) à distance
Synthèse (les stades) :	
Stade 0	Tis N0M0
Stade IA	T1, N0, M0
Stade IB	T2, N0, M0
Stade IIA	T3, N0, M0
Stade IIB	T1-3, N1, M0
Stade III	T4, tout N, M0
Stade IV	M1 quel que soit T et N.

*L'examen d'au moins 10 ganglions est souhaitable.

4. Oncogenèse et lésions pré cancéreuses

Dans la grande majorité des cas, les mutations successives conduisant à la cancérisation sont uniquement observées au niveau du tissu pancréatique, et ne sont donc pas transmissibles. Le nombre moyen de mutations somatiques observées dans le cancer du pancréas semble beaucoup plus limité que dans le cancer du sein ou le cancer colorectal (Jones 2008). Une explication plausible pour cela est de considérer que les cellules qui initient la tumorigénèse pancréatique ont connu moins de divisions que les cellules de cancer colorectal ou du sein. Une accumulation progressive de mutations dans les gènes *KRAS*, *TP53*, *p16/CDKN2a* et *DPC4* accompagne la transformation histologique. Les mutations de l'oncogène *KRAS* sont rares dans le pancréas normal puisque leur fréquence se situe autour de 13%, alors qu'elles sont observées dans près de 90% des cancers pancréatiques. Jones et al. ont identifié 541 gènes et 12 voies métaboliques associées au processus de cancérisation. Six voies étaient altérées dans 100% des tumeurs analysées, il s'agit des voies d'apoptose, de régulation de la phase de transition G1/S, Hedgehog, KRAS, TGF-β et Wnt/Notch (Jones 2008) (**Figure 3**).

Figure 3. Processus et voies de signalisation dont les gènes ont subi des mutations dans la plupart des cancers pancréatiques. (Les 12 processus et voies de signalisation ne sont pas toujours mutés)**. D'après Jones 2008.**

Une équipe australienne a récemment établi une classification moléculaire à partir de 4 sous-types basés sur des profils de variations structurelles de l'ADN et impliquant des mécanismes moléculaires sous-jacents (Waddell 2015). L'analyse des mutations a confirmé la forte prévalence de mutations de gènes décrits jusqu'à présent : *KRAS* dans la très grande majorité des cas, *TP53* (74 %), *SMAD4* (31 %), *CDKN2A* (35 %). Deux gènes jusque-là non rapportés sont ressortis de cette analyse comme nouveaux candidats de « *drivers* » moléculaires avec, dans 10 % des cas, des mutations ou des variants structurels : *KDM6A* et *PREX2*. Le sous-type 1 a été classé comme « stable » (20 % des échantillons) ; ces génomes tumoraux contenaient ≤ 50 variations structurelles et présentaient souvent une aneuploïdie, suggérant des défauts dans le cycle cellulaire/mitose. Le sous-type 2 a été classé comme « localement réarrangé » (30 % des échantillons) ; ce sous-type présentait un événement focal significatif sur un ou deux chromosomes. Le sous-type 3 a été classé comme « dispersé ou éparse » (36 % des échantillons) ; les tumeurs de cette classe présentaient une gamme modérée de dégâts chromosomiques non aléatoires et moins de 200 variations structurelles. Le sous-type 4 a été classé comme « instable » (14 % des échantillons) ; les tumeurs présentaient un grand nombre de variations structurelles (> 200 ; maximum 558). Cette échelle de l'instabilité génomique suggérait des défauts dans la réparation de l'ADN, qui définit potentiellement une sensibilité aux agents endommageant l'ADN.

Très récemment le TCGA (The Cancer Genoma Atlas) a publié une analyse « multi-omique » (génomique, transcriptomique et proteomique) de 150 ACP (TCGA 2017). Cette étude a confirmé la fréquence importante de mutations dans les gènes *KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, RNF43, ARID1A, TGFbR2, GNAS,* et *PBRM1*, et a identifié une nouvelle voie liée au gène *RREB1*. Les rares tumeurs *KRAS* sauvage (environ 7%) présentait des mutations dans d'autres oncogènes, principalement *GNAS, BRAF, CTNNB1*, ainsi que d'autres gènes de la voie RAS. En outre, une partie des tumeurs présentait de multiples mutations du gène *KRAS*, avec pour certaines, une mutation bi-allélique. Même si aucune nouvelle classification moléculaire de l'ACP n'a été proposée, cette étude confirme la complexité et l'hétérogénéité du paysage moléculaire des ACP.

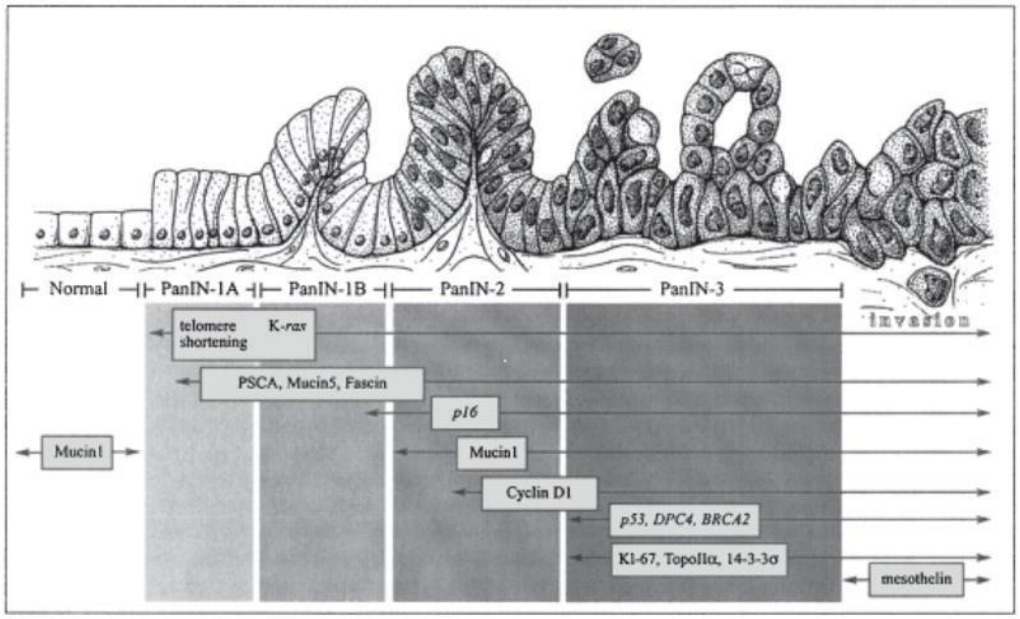
a) Les lésions pré cancéreuses

Les lésions précurseurs reconnues du cancer pancréatique sont principalement au nombre de trois : i) les néoplasies intra-épithéliales pancréatiques (PanIn, Pancreatic Intraepithelial Neoplasias) ; ii) les tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses (TIPMP) ; et iii) les cystadénomes mucineux (CAM). Si ces trois lésions sont susceptibles de progresser vers le cancer invasif, le processus physiopathologique par lequel elles y parviennent n'a été véritablement établi que pour les PanINs, qui constituent les précurseurs principaux de l'adénocarcinome canalaire (**Figure 4**) (Feldmann 2007). Les PanINs sont classés en 3 grades suivant la terminologie de l'OMS : PanIN-1, PanIN-2 et PanIN-3. Les lésions de PanIN-1 correspondent à une hyperplasie simple du revêtement canalaire (plane 1A ou papillaire 1B), les lésions de PanIN-2 comportent une dysplasie de bas grade et les lésions de PanIN-3 une dysplasie de haut grade. Cette lésion est considérée comme indistinguable et donc synonyme du carcinome *in situ* (Tis) (Monges & Fléjou 2010). Il s'agit de lésions microscopiques atteignant par définition des canaux de diamètre inférieur à 5mm. Les lésions de PanIN s'observent fréquemment à la périphérie des adénocarcinomes, suggérant des formes de passage entre l'hyperplasie et la néoplasie. Leur fréquence augmente avec l'âge. Elles comportent les mêmes altérations génétiques que les cancers invasifs, et la fréquence de ces altérations augmente avec le degré de dysplasie. Une méta-analyse des données publiées entre 1988 et 2003 a montré que les mutations du gène *KRAS* sont détectées dans respectivement 36, 44 et 87% des lésions PanIN-1, PanIN-2 et PanIN-3 (Lohr 2005). Cette étude a donc montré que l'augmentation graduelle dans la positivité *KRAS* est corrélée à la sévérité des lésions précancéreuses.

Les CAM sont des kystes muco secrétant dont la taille souvent supérieure à 5 cm les rend facilement identifiables sur les examens d'imagerie. Leurs parois sont constituées d'un épithélium cylindrique muco secrétant et d'un chorion présentant l'aspect d'un stroma ovarien caractéristique. L'ACE intra kystique prélevé lors d'une ponction sous écho endoscopie permet de faire suspecter la nature mucineuse du kyste avec 95-100% de spécificité lorsqu'il est supérieur à 400ng/ml. Ces lésions sont rares. Elles surviennent chez la femme de 40-50 ans, principalement au niveau de la tête et de la queue du pancréas. Le risque d'évolution des CAM vers une lésion borderline, un carcinome in situ, puis finalement un cancer invasif, est élevé (6 à 36%). Ce risque élevé justifie la recommandation d'une

résection chirurgicale systématique, ce d'autant que la survie des CAM opérés en l'absence de carcinome invasif est proche de 100% à 5 ans. Les facteurs prédictifs d'un risque de dégénérescence sont la présence d'un nodule mural, un épaississement marqué de la paroi et une taille supérieure à 60mm (Crippa 2008).

Figure 4. « PanINgram » ilustrant la progression vers le cancer pancréatique à partir des lésions précurseurs PanINs. D'après Feldmann 2007.



b) Tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP)

Les TIPMP font l'objet d'un intérêt particulier depuis quelques années. Les TIPMP sont définies par le remplacement de l'épithélium normal des canaux excréteurs du pancréas par un épithélium néoplasique, d'architecture le plus souvent papillaire, habituellement mucosécrétant (Adsay 2010). Typiquement, le remplacement de l'épithélium normal par un épithélium néoplasique mucosécrétant entraîne la dilatation, voire l'ectasie et la kystisation des segments canalaires atteints, dont la lumière se remplit de mucus (Scoazec & Couvelard 2015) (**Figure 5**).

Figure 5. Macroscopie. Coupe transversale d'une TIPMP du canal pancréatique principal. On note une dilatation importante du canal pancréatique et la présence de mucus dans la lumière des canaux dilatés.

Au Japon les TIPMP sont plus fréquentes chez l'homme (sexe ratio 3/1) (Zamboni 2013), mais en Occident, le sexe ratio semble équilibré (Fernandez-Del Castillo 2010). L'âge moyen lors du diagnostic pour les lésions non dégénérées est de 63 ans, tandis que les TIPMP dégénérées sont diagnostiquées en moyenne 5 ans plus tard (68 ans) (Partenski 2015). On estime la prévalence des TIPMP dans la population occidentale à 0,8 pour 100 000 personnes (Laffan 2008) et un tiers des TIPMP est diagnostiqué au stade de cancer pancréatique invasif (Distler 2014). Le risque d'adénocarcinome canalaire est nettement supérieur chez les patients porteurs d'une TIPMP. Kawakubo et al. ont retrouvé un risque 10,7 fois supérieur pour une incidence de 0,6% par an (Kawakubo 2011).

Quatre types histologiques de TIPMP sont décrits (Furukawa 2005 ; Katabi 2008). Leur identification est importante car ils sont associés à des caractéristiques cliniques et à des potentiels évolutifs différents. Par ordre de fréquence décroissante (Scoazec & Couvelard 2015):

- le *type intestinal* : il est caractérisé par une prolifération de cellules épithéliales mucosécrétantes ressemblant aux cellules intestinales normales de type caliciforme ; l'architecture est typiquement papillaire. Il s'agit du type le plus fréquent de TIPMP et il est associé à un risque de transformation maligne d'environ 35% ;
- le *type biliopancréatique* : il est caractérisé par une prolifération de cellules ressemblant aux cellules épithéliales de revêtement des canaux biliaires et pancréatiques normaux (elles sont typiquement CK7+ et CK20-). Il existe un risque élevé de transformation maligne, sous la forme de carcinome, habituellement, de type canalaire conventionnel ;
- le *type gastrique* : ici, la prolifération néoplasique est constituée de cellules ressemblant aux cellules épithéliales mucosécrétantes de la muqueuse gastrique ; ce type histologique est très souvent associé à des atteintes des canaux secondaires ; les papilles sont courtes, voire absentes ; les dilatations canalaires sont peu importantes ; le risque de transformation maligne est très faible ;
- le *type oncocytaire* : ce sous-type rare est caractérisé par une prolifération de cellules à cytoplasme abondant et éosinophile, d'aspect granulaire ; l'architecture est complexe ; la prolifération tend à s'organiser en papilles épaisses et anastomosées pour former des zones solides plus ou moins étendues ; les atypies cytonucléaires sont fréquentes.

Un point essentiel du diagnostic anatomopathologique est de distinguer les formes non invasives des formes invasives. Les TIPMP non invasives sont classées en dysplasie de bas grade, ou de haut grade selon l'intensité des anomalies architecturales et des atypies cytonucléaires présentées (Adsay 2010 ; Hruban 2004). Des foyers de carcinome invasif peuvent être détectés dans environ 30% des cas de TIPMP (Adsay 2010). Les lésions invasives sont classées selon les mêmes critères histologiques que ceux utilisés pour les carcinomes canalaires pancréatiques « *de novo* » ; les deux formes histologiques les plus

fréquentes sont le type colloïde muqueux (ou mucineux), habituellement associé au type intestinal, et le type canalaire classique, habituellement observé dans les TIPMP de type pancréaticobiliaire (Adsay 2010).

Globalement, les TIPMP présentent des altérations des gènes cibles comparables à celles observées dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Deux anomalies génétiques activatrices de prolifération sont retrouvées avec grande fréquence dans les TIPMP : la mutation *GNAS* et la mutation *KRAS* (Ryan 2014). Les mutations *BRAF*, *PIK3CA*, *STK11* et *SMAD4*, quoique relativement fréquentes dans l'adénocarcinome canalaire, sont moins observées dans les TIPMP. Le gène *GNAS* code pour une protéine G, facteur de transmission de signal extracellulaire vers les cascades moléculaires intracellulaires. Il existe une mutation de ce gène, responsable d'une activation permanente de certaines voies de signalisation intracellulaire, dans une large majorité des TIPMP. Cette mutation est détectable dans 96% des prélèvements de liquide kystique des TIPMP et semble très spécifique (Wu 2011). Contrairement aux adénocarcinomes canalaires conventionnels, les TIPMP ne présentent pas d'altération de la voie *SMAD4*/*DPC4*.

Dans une méta-analyse de 39 études publiées entre janvier 1996 et octobre 2010 (représentant un total de 1235 échantillons de TIPMP), Nissim et al. ont identifié 8 marqueurs génétiques différents associés à la progression histologique de TIPMP (bénin vers malin) : *MUC1*, *MUC2*, *MUC5AC*, *KRAS*, *p53*, *hTERT*, *Cox2* et *Shh* (Nissim 2012). La plus forte association avec la progression maligne de TIPMP était en rapport avec l'expression de *hTERT*, *Shh* et *MUC1*, tandis que l'expression de *MUC5AC* avait la plus faible association. Bien qu'assez fréquent, *MUC5AC* et *KRAS* n'étaient pas fortement associés à une transformation maligne, probablement lié au fait que des altérations conduisant à l'expression de ces marqueurs se produisent au début de la progression histologique de TIPMP vers le cancer.

5. Traitement

a) Chirurgie

La résection chirurgicale ne concerne malheureusement que peu de malades atteints d'un adénocarcinome pancréatique (Spanknebel & Conlon 2001). Des recommandations concernant la résection chirurgicale des tumeurs pancréatiques ont été émises par la Société

Française de Chirurgie Digestive et l'Association de Chirurgie Hépatobiliaire et de Transplantation hépatique (Slim 2009). Le scanner avec injection est aujourd'hui le meilleur examen pour prédire la non-resécabilité des adénocarcinomes pancréatiques (Vargas 2004). Le bilan de resécabilité ne doit être réalisé qu'en l'absence de contre-indication opératoire (terrain) et si le bilan d'extension métastatique est négatif. Trois contre-indications sont et restent classiques : la découverte de métastases et/ou d'une carcinose péritonéale sur le scanner ou au cours de l'intervention ; un envahissement ganglionnaire aortico-cave. Les médianes de survie observées dans ces circonstances ne dépassent pas un an et ne sont pas supérieures à celles observées avec les lignes actuelles de chimiothérapie (Shrikhande 2007 ; Schwarz 2014 ; Paye 2015). Les extensions locorégionales, vasculaires ou ganglionnaires à distance, constituent les 3 éléments principaux à prendre en compte pour la resécabilité. Du point de vue chirurgical, les tumeurs pancréatiques sont divisées en trois groupes (Delpero & Sauvanet 2010) :

- Resécables : cela signifie qu'on peut enlever la tumeur en totalité à but curatif. Dans ce cas, la tumeur est confinée au pancréas (ou organes de voisinage direct), ne touche pas la veine mésentérique supérieure, la veine porte, le tronc cœliaque, l'artère hépatique ou l'artère mésentérique supérieure ;

- « Borderlines » ou à la limite de la resécabilité : le contact avec l'artère mésentérique supérieure et/ou le tronc cœliaque, et, a *fortiori*, un engainement artériel hémi-circonférentiel, sont des contre-indications classiques à une résection d'emblée, mais il est utile de réévaluer les malades après un traitement « d'induction » qui peut être une chimiothérapie ou une chimiothérapie suivie d'une radiothérapie (Katz 2008). L'envahissement d'un court segment de l'artère hépatique peut être considéré de la même façon ainsi comme l'envahissement de plus de 50% de la circonférence de l'axe veineux (Ishikawa 1992);

- Non résécables : la tumeur est non résécable quand l'ablation complète de la lésion n'est pas possible en fonction de l'envahissement vasculaire. Ainsi, un envahissement de l'artère mésentérique supérieure, de l'artère hépatique ou du tronc cœliaque contre-indique formellement une résection. L'envahissement de l'artère hépatique est une contre-indication pour la majorité des équipes. Il en est de même d'un

envahissement de la veine mésentérique supérieure ou de la veine porte s'il intéresse plus de la moitié de l'axe veineux, si la partie proximale de la veine mésentérique supérieure est concernée (convergences des veines jéjunales et iléocoliques) ou s'il existe des signes manifestes d'hypertension portale segmentaire (cavernome périportal, par exemple).

b) Chimiothérapie et radiothérapie

Le pronostic de l'adénocarcinome pancréatique est resté pratiquement inchangé depuis les dernières décennies et la survie à 5 ans demeure inférieure à 7% (Sant 2009). La résection chirurgicale est la seule à offrir la possibilité de guérison, mais, comme déjà mentionné, moins de 20% des patients sont admissibles à la résection au moment du diagnostic.

Les traitements adjuvant sont adaptés aux modalités possibles de récidive de la maladie après chirurgie à visée curative : radiothérapie et plus volontiers radiochimiothérapie par rapport au risque de rechute locale ou locorégionale ; traitement systémique par rapport au risque d'évolutivité métastatique.

L'exérèse chirurgicale de la tumeur primaire sans l'addition d'un traitement complémentaire résulte en de taux de survie à 5 ans de 8 à 12% (Neoptolemos 2004 ; Oettle 2007). Plusieurs essais randomisés de phase III (Neoptolemos 2004 ; Oettle 2007) ont montré que la chimiothérapie post-opératoire supplémentaire (avec gemcitabine ou 5-FU) après une résection à but curatif augmente systématiquement la survie à 5 ans d'au moins 11%. En revanche, les résultats de la radiochimiothérapie postopératoire sont plus hétérogènes et certains démontrent même un effet délétère (Van Laethem 2010 ; Neoptolemos 2001). Les résultats finaux de l'étude randomisée multicentrique de phase III ESPAC-4 parus cette année (Neoptolemos 2017) ont montré l'augmentation de la survie globale médiane de 25,5 mois dans le bras gemcitabine seule à 28 mois dans le bras avec un régime combiné de gemcitabine et capécitabine ((HR) 0,82, 95% CI 0,68-0,98 ; p=0,032). La survie à 5 ans (estimations) a augmenté de 16,3% à 28,8%. Il est à signaler que, comme pour les essais précédents, les patients ayant des résections R0 avaient une meilleure survie et un bénéfice significatif avec le régime combiné, alors que pour les malades avec résection incomplète (R1) l'apport d'un régime combiné n'a pas démontré de bénéfice statistiquement significatif.

B. Oncogenèse MSI

1. Le système MMR

Le système MMR ou système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN, joue un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité génomique. Au cours de la réplication, à partir d'un génome dit « mère », l'ADN polymérase duplique l'ADN en deux génomes filles. Cette enzyme a une activité de relecture exonucléotidique 3'-5' qui corrige les erreurs de réplication. Néanmoins, les erreurs de réplication qui échappent à cette activité de relecture de l'ADN polymérase, sont prises en charge par le système MMR, qui intervient donc de manière post-réplicative. Chez tous les organismes, la réparation des mésappariements des bases se fait en quatre étapes principales :

- reconnaissance et fixation sur le mésappariement d'un complexe du système MMR ;
- recrutement d'autres protéines du système MMR, permettant notamment l'incision du brin contenant le mésappariement ;
- dégradation du fragment contenant le mésappariement par des exonucléases ;
- resynthèse de la séquence excisée par une polymérase et ligation du brin réparé par une ligase.

Les protéines du système MMR sont également impliquées dans d'autres processus, tels que la recombinaison génétique, la réparation des ponts inter- et intra-brins, ainsi que la diversité des immunoglobulines.

a) Le fonctionnement du système MMR

Les fonctions individuelles des protéines MMR dans la détection, l'excision et la réparation des erreurs de type mésappariements de bases canoniques ou boucles insertions/délétions de bases survenant aux cours de la réplication de l'ADN sont bien décrites. Ainsi, l'inactivation du système MMR confère un phénotype mutateur qui se caractérise par un taux de mutations spontanées élevé. Le système MMR est très conservé de la bactérie aux mammifères.

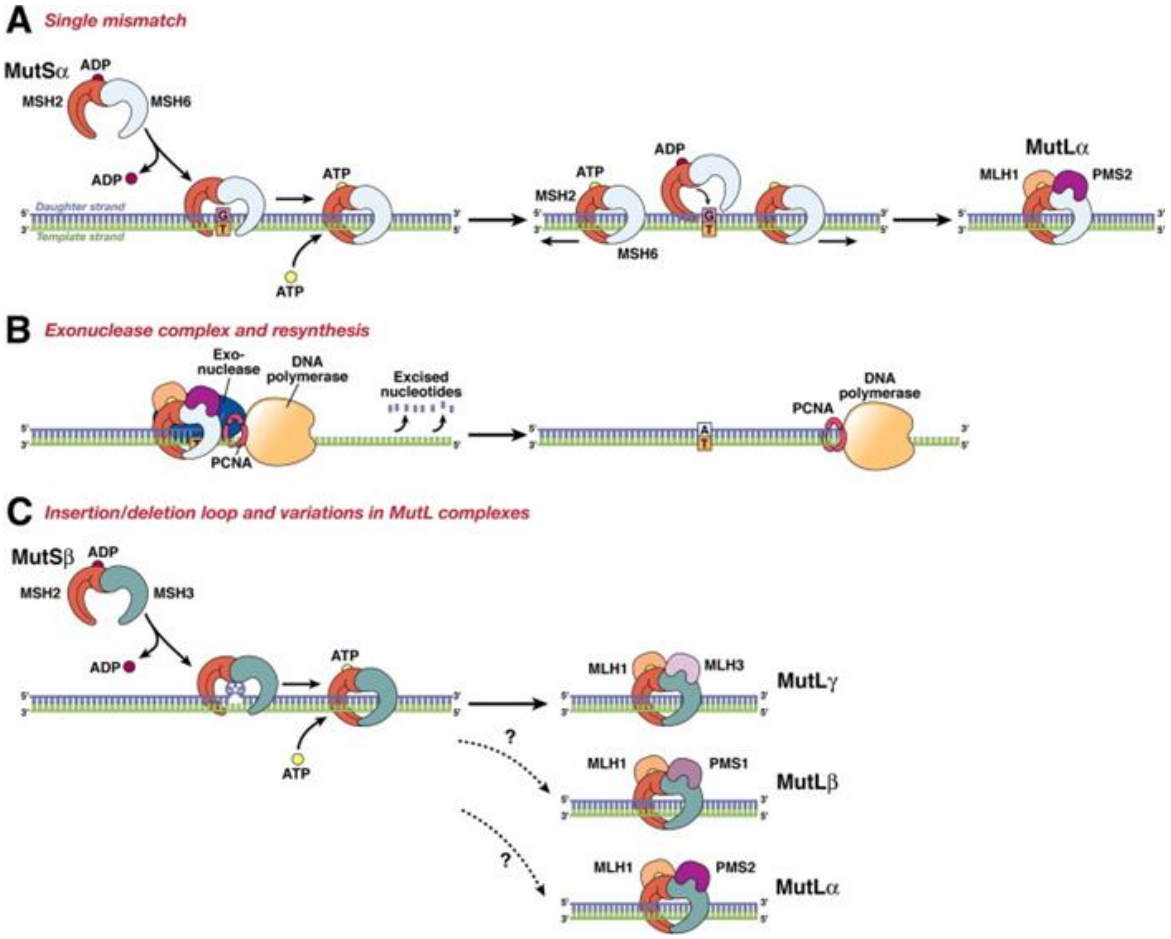
La plupart de nos connaissances sur le système MMR sont issues de l'étude de ce complexe chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Ceci est composé de trois protéines principales : MutS, MutL et MutH (Claverys & Lacks 1986 ; Lahue 1989 ; Lu 1983 ; Modrich 1989 ; Modrich 1991 ; Modrich & Lahue 1996). En comparaison avec le système bactérien, le système MMR des eucaryotes est hautement conservé, mais le degré de complexité est augmenté par l'ajout de plusieurs homologues de MutS et de MutL. Chez les mammifères, il existe cinq homologues de MutS (MSH2 à MSH6), et quatre homologues de MutL (MLH1, MLH3, PMS1 et PMS2). MutH n'a pas d'homologue connu.

Chez les eucaryotes, le début du processus de réparation nécessite la présence de trois différents homologues de MutS (MSH2, MSH3, et MSH6) qui forment les complexes MSH2-MSH6 (MutSα) et MSH2-MSH3 (MutSβ) (Kolodner 1996 ; Marsischky 1996). Le complexe MutSα initie la réparation des mésappariements ne touchant qu'une seule base ainsi que les boucles d'insertions/délétions d'une seule base, tandis que le complexe MutSβ initie la réparation des grandes boucles insertions/délétions de deux à quatre bases en plus des boucles d'insertions/délétions d'une seule base (Edelmann 2000 ; Genschel 1998 ; Greene & Jinks-Robertson 1997 ; Guerrette 1998 ; Kolodner 1996 ; Marsischky 1996). Chez l'Homme, le complexe MutSα est présent en quantité plus élevée que MutSβ (Jacob & Praz 2002). Les complexes MutSα et MutSβ nécessitent l'interaction avec des homologues de MutL pour activer les étapes ultérieures de la réparation.

La fonction des protéines MSH3 et MSH6 étant partiellement redondante, l'altération d'un des deux gènes correspondants est associée à un phénotype mutateur atténué (Jacob & Praz 2002).

Les homologues de MutL interagissent pour former trois hétérodimères composés respectivement de MLH1-PMS2 (MutLα), MLH1-PMS1 (MutLβ), et MLH1-MLH3 (MutLɣ), MLH1 constituant la sous-unité commune à ces trois complexes (Kondo 2001).

Figure 6. Mode d'action du système MMR chez l'Homme. Le système MMR fonctionne en plusieurs étapes : **A.** Le complexe MutSα (MSH2 et MSH6) reconnait les mésappariements de base et IDL (insertion-deletion loop) de petite taille (≤ 2 nucléotides) et adopte une conformation de pince coulissante entourant l'ADN. Cette étape nécessite l'échange de l'ADP en ATP. Ce complexe est ensuite lié à MutLα (MLH1 et PMS2). **B.** Le complexe interagit avec la protéine PCNA et l'Exonucléase 1 qui va dégrader le brin fils jusqu'au mésappariement. Finalement, le complexe se dissout quand la synthèse du nouveau brin par l'ADN Polymérase est effectuée. **C.** Selon le même principe, le complexe MutSβ (MSH2-3) agit sur les IDL de plus grande taille (> 2 nucléotides). **D'après Boland & Goel 2010.**



La première étape dans la correction des erreurs de réplication consiste en une efficace reconnaissance des mésappariements et des boucles d'insertions/délétions au cours de la phase S de la réplication, réalisée par le complexe MutS (**Figure 6**). Cette étape nécessite la fixation d'une molécule d'ATP sur un domaine ATPase très conservé du complexe, permettant sa stabilisation vers une conformation de pince coulissante entourant l'ADN.

Puis, le complexe MutS recrute l'hétérodimère MutL, agissant également de manière ATP dépendante. Celui-ci, à son tour, dirige la machinerie réparatrice, constituée notamment d'une exonucléase et de l'ADN polymérase afin de dégrader et réparer le brin nouvellement synthétisé contenant le mésappariement.

2. L'oncogenèse MSI (déficience du système MMR)

Qu'elles soient héréditaires (syndrome de Lynch) ou sporadiques, les tumeurs MSI sont la conséquence directe d'un défaut du système MMR, consécutif à l'inactivation biallélique d'un des gènes majeurs de ce système. Dans le cas de cancers MSI héréditaires, les protéines impliquées sont principalement MSH2 et MLH1, et moins fréquemment MSH6 et PMS2, suite à une mutation germinale sur un des gènes (Fishel 1993; Bronner 1994; Akiyama 1997a; Nicolaides 1994). Dans le cas de cancers MSI sporadiques, il s'agit dans l'immense majorité des cas d'un défaut épigénétique touchant le promoteur du gène *MLH1* (Kane 1997 ; Veigl 1998).

La déficience du système MMR induit un grand nombre d'évènements mutationnels. Ces évènements sont pour la plupart des insertions ou délétions au niveau de microsatellites, car, comme déjà mentionné précédemment, ces régions sont particulièrement vulnérables au glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN (Jiricny 2006).

Les CCR MSI présentent une pathologie distincte, étroitement liée à la survenue de mutations atteignant les régions codantes des microsatellites (cMS, Coding MicroSatellites). Ainsi, si les mutations affectant les régions intergéniques ou non-codantes n'ont, généralement, aucune signification fonctionnelle, les insertions ou délétions de nucléotides dans les régions cMS peuvent aboutir à traductions qui iront interférer dans les fonctions des protéines (Furlan 2002 ; Woerner 2006). Bien que la probabilité de glissement de l'ADN polymérase soit proportionnelle à la longueur des microsatelllites, la fréquence mutationnelle observée au niveau de différents microsatellites de longueur similaire peut varier considérablement, ce qui suggère une sélection des mutations frameshift pro-tumorales durant la carcinogenèse et la progression des CCR MSI (Duval 2001).

Un des premiers exemples de gène contenant un cMS relevant pour la progression des tumeurs MSI est le gène *TGFBR2* qui abrite une répétition A10 mutée dans plus de 90% des

tumeurs colorectales MSI (Markowitz 1996). Ces mutations impliquent une abolition de la signalisation de la voie TGFBR2 ce qui induit une augmentation du taux de prolifération des cellules MSI (Akiyama 1997b).

D'autres exemples de mutation cMS favorisant la tumorigenèse MSI affectent le gène transducteur de signal *ACVR2* et le gène pro-apoptotique *BAX* (Hempen 2003 ; Ionov 2000 ; Duval 2002).

La déficience de ce système n'est pas en soi un évènement transformant et il est maintenant établi que la transformation des clones MMR-déficients (dMMR) (on nommera par la suite les tumeurs MMR éficients pMMR en référence à la version anglaise « proficient ») dépend de l'accumulation de mutations secondaires affectant des gènes ayant un rapport avec l'oncogenèse. De telles mutations secondaires sont en majorité accumulées du fait de l'instabilité microsatellitaire dans ces cellules. Ces mutations affectent des gènes impliqués dans des processus biologiques divers, tels que la régulation du cycle et/ou de la prolifération cellulaire, la régulation de l'apoptose, la réparation et signalisation des dommages de l'ADN. De nombreux gènes contenant des microsatellites codants sont mutés dans les tumeurs MSI (*TGFBR2*, *BAX*, *CASP5…*) mais un faible nombre a fait l'objet d'études fonctionnelles.

a) Les cancers MSI héréditaires : le syndrome de Lynch (SL)

(1) Historique et définition

L'histoire du syndrome de Lynch (SL) a débuté en 1895 avec Alfred Warthin, professeur d'Anatomie Pathologique à l'Université américaine de Michigan (Lynch 2015). Warthin s'est ému des confidences de sa couturière dépressive qui attribuait son état psychologique aux nombreux décès par cancer (en particulier du côlon, de l'estomac et de l'utérus) dans l'ensemble de sa famille. Warthin a commençé par documenter les antécédents médicaux de sa famille, ainsi que les résultats pathologiques des cancers chez la famille et a appelé leur pedigree « family G ». Après avoir récupéré dans les registres de l'Université de Michigan deux autres arbres généalogiques de familles aux nombreux cancers il a publié ses premiers résultats en 1913 (Warthin 1913). Il a également noté que la transmission de la susceptibilité au cancer au sein de ces familles était compatible avec la proposition de Mendel d'hérédité autosomique dominante (Lynch 2015).

En 1962, au cours de son internat en médecine interne, Henry Lynch a rencontré un patient avec une histoire familiale similaire à celle de la couturière de Warthin. Lynch a donc colligé l'ensemble des cancers observés dans cette famille et a retrouvé plusieurs patients atteints de CCR et de cancer de l'endomètre sur plusieurs générations. Il a appelé cette famille la « famille N » (pour Nebraska). En 1966 il publie son premier article en utilisant les données des deux familles (N et M, pour Michigan) (Lynch 1966). Malgré l'intérêt que cet article a suscité, les agences de financement n'ont pas accepté tout de suite l'étiologie génétique préférant privilégier une origine environnementale.

En 1971, Lynch a complété la description des antécédents familiaux et les a nommé le syndrome des cancers familiaux (« cancer family syndrome ») (Lynch & Krush 1971a ; Lynch & Krush 1971b).

C'est Boland et Troncale qui sont à l'origine de l'éponyme « Lynch syndrome » apparu pour la première fois dans leur article de 1984. Cet article a confirmé, à travers l'analyse de ségrégation des familles, le mode de transmission autosomique dominant (Boland & Troncale 1984). Durant cette même année, le terme HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) a été utilisé pour la première fois (Tempero 1984). Cet acronyme a été utilisé jusqu'à très récemment. Cependant ce terme, trop réducteur, ne doit pas être utilisé car d'autres cancers non-colorectaux ont été associés à ce syndrome (Kalady 2013 ; Lynch 2015). De nos jours, le diagnostic de SL est basé sur la présence d'un phénotype clinique compatible, de l'examen anatomo-pathologique et/ou du screening génétique (Boland & Lynch 2013 ; Lynch & Lynch 2013 ; Lynch 2015).

(2) Caractéristiques moléculaires et génétiques du SL

Le syndrome de Lynch se transmet selon un mode autosomique dominant. Les patients atteints du SL sont porteurs d'une mutation mono-allélique germinale d'un gène du système MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*) qui les prédispose au cancer. Une altération somatique de l'allèle sauvage suffit à inactiver le système MMR selon le modèle de carcinogenèse en « two hits » de Knudson et peut conduire à la transformation cellulaire par un processus d'instabilité nucléotidique (Knudson 1985). Les mécanismes moléculaires sous-tendant l'inactivation somatique de l'allèle sauvage ne sont pas parfaitement connus ; cette

inactivation peut résulter d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou d'une méthylation du promoteur du gène (Potocnik 2001).

La méthylation du promoteur du gène *MLH1*, évoqué dans les cancers MSI sporadiques, ne permet cependant pas d'exclure formellement un SL, notamment chez les patients présentant des antécédents familiaux et une tumeur survenant à un âge précoce, ces deux éléments évoquant un SL. En effet, dans le SL, la méthylation du gène *MLH1* peut constituer le second hit chez un patient porteur d'une mutation germinale (Bellizzi & Frankel 2009 ; Niessen 2009). De plus, il existe des cas de méthylation constitutionnelle du promoteur du gène *MLH1* responsable de SL (Goel 2010). Par ailleurs, une méthylation somatique de *MSH2* a été décrite comme étant le second hit chez 24% des patients présentant une mutation germinale de *MSH2*, sans que cela ne soit jamais rapporté dans les CCR sporadiques (Nagasaka 2010).

En 2004, il a été constitué une database avec toutes les mutations responsables d'un cancer chez les patients avec SL. Cette database est actualisée continuellement par l'« International Society for Gastrointestinal and Hereditary Tumors » (InSiGHT). En 2012, la répartition des altérations génétiques était la suivante : 42% de mutations affectant le gène *MLH1*, 33% *MSH2*, 18% *MSH6*, et 7.5% *PMS2* (Plazzer 2013).

Certaines familles présentent un phénotype de SL typique avec un phénotype MSI associé à une perte d'expression de la protéine MSH2, mais sans aucune mutation germinale identifiée sur les gènes du système MMR. Dans ces familles, il a été montré que la délétion germinale du gène *EpCAM* (Epithelial Cell Adhesion Molecule) provoque une fusion des transcrits EpCAM-MSH2 conduisant à l'inactivation de la protéine MSH2 (Ligtenberg 2009). Cette mutation serait responsable d'environ 1 à 3% des SL (Niessen 2009).

Une autre donnée dont l'importance est actuellement établie pour les CCR MSI concerne l'oncogène *BRAF*. Ce dernier appartient à la famille des gènes *RAF* et participe à la voie de signalisation des MAP kinases. Les mutations de *BRAF* sont observées de manière significativement plus fréquente dans les CCR de phénotype MSI que dans les CCR de phénotype MSS (35% *versus* 5%) (Oliveira 2003). De façon plus spécifique, les mutations de *BRAF* ne surviennent presque exclusivement que dans des CCR MSI sporadiques présentant

une méthylation de la région promotrice du gène *MLH1*. Ces données suggèrent que les mutations activatrices de *BRAF* sont liées au caractère sporadique du phénotype MSI.

Deux des évenements moléculaires décrits ci-dessus : l'hypermethylation de *MLH1* et la mutation oncogénique *BRAF*-V600E ; peuvent être utilisés pour différentier les CCR sporadiques des CCR associés au SL (McGivern 2004 ; Lynch 2015).

(3) Identification des patients atteints du SL

Le SL est responsable de 2 à 7% de l'ensemble des CCR (Hampel 2005 ; Lynch & Lynch 2004). En 2008 Hampel et al. ont étudié 500 patients consécutifs atteints d'un CCR et ont retrouvé une mutation des gènes MMR chez 18 (3.5%), confirmant la prévalence cliniquement relevante du SL (Hampel 2008).

La pénétrance de ce syndrome est élevée, avec 70 à 80% de risque de CCR cumulé pour les hommes, et 40 à 60% pour les femmes. Le risque de cancer de l'utérus est de 42% à 70 ans (Dunlop 1997 ; Win 2012).

L'identification des malades atteints d'un SL est un enjeu majeur car la morbidité et la mortalité par cancer chez les malades et leurs apparentés peuvent être réduites par un dépistage précoce (Jarvinen 2000 ; de Jong 2006). En 1991, un consortium international, réuni à Amsterdam, a énoncé des critères, dits d'Amsterdam (**Tableau 3**), définissant ce syndrome sur le plan clinique (Vasen 1991). Les critères d'Amsterdam I ne prenaient en compte que les CCR et ont été actualisés en 1998 tenant également compte d'autres localisations tumorales (endomètre, estomac, ovaire, SNC, intestin grêle, voies urinaires, hepato-biliaire) (Vasen 1999).

Les critères d'Amsterdam sont très spécifiques mais peu sensibles (Vasen 2007). Ainsi, d'autres critères, moins stricts que ceux d'Amsterdam, incluant notamment les caractéristiques anatomopathologiques des CCR, ont été proposés afin de guider les cliniciens pour la sélection des malades devant bénéficier d'un test MSI avant la recherche de mutations constitutionnelles des gènes MMR, en particulier ceux ne présentant pas les critères d'Amsterdam. Ces recommandations connues comme les critères de Bethesda (Rodrigues-Bigas 1997) ont été révisées en 2004 afin d'améliorer encore la reconnaissance des malades pour lesquels l'âge de début de leur maladie est plus tardif et/ou n'ayant pas

d'histoire familiale de cancer (Umar 2004) (**Tableau 3**). Bien que ces critères soient moins strictes que les critères d'Amsterdam, leur sensibilité est seulement de 40 à 80% dans des populations à haut risque de cancers (Lynch 2003 ; Gologan 2005 ; Wolf 2006), et de 50% ou moins dans des populations non sélectionnées (Aaltonen 1998 ; Salovaara 2000 ; Piñol 2005 ; Julié 2008).

b) Le syndrome CMMRD

Le syndrome de déficience constitutionelle du système MMR (Constitutional MisMatch Repair Deficiency, CMMRD) est une prédisposition majeure aux cancers pédiatriques. Plus d'une centaine de cas de cancers pédiatriques ou du jeune adulte ont été rapportés chez des patients porteurs de mutations germinales délétères bialléliques à l'état homozygote ou hétérozygote composite affectant un des gènes du système MMR. Plus de la majorité des patients CMMRD sont porteurs de mutations germinales bialléliques de *PMS2* (Wimmer 2014).

Chez la quasi-totalité des patients atteints du CMMRD, des cancers ou de lésions précancéreuses affectant le tractus digestif ont été rapportées. D'autres localisations sont aussi fréquentes : i) des hémopathies (lymphome et leucémie), ii) tumeurs cérébrales, et iii) sarcomes. A l'instar de ce qui est observé dans le SL, il existe une corrélation entre le gène MMR impliqué et le spectre tumoral des patients (Wimmer 2014).

c) Les cancers MSI sporadiques

Les cancers MSI sporadiques représentent 10-15% environ des cancers sporadiques du côlon, de l'estomac et de l'endomètre (Bolland 1998). Dans ces cancers, il est assez rare de mettre en évidence des mutations sur la séquence codante des gènes MMR, notamment *MLH1* et *MSH2*, alors que ce type d'altération est retrouvé dans la majorité des cas de cancers chez les patients atteints du SL. Néanmoins, de telles mutations (altérations bi-alléliques et somatiques sur un gène MMR) ont été récemment rapportées en nombre au niveau de patients avec un CCR MSI et sans mutation germinale identifiée (Haraldsdottir 2014). Une des grandes caractéristiques de ces tumeurs, par rapport aux cancers MSI héréditaires, reste l'inactivation du gène *MLH1* par méthylation bi-allélique de son promoteur (Veigl 1998), associée à une perte de l'expression de ce gène. Seule la

méthylation de la région proximale du promoteur de *MLH1* induit un « silencing » du gène. Si la méthylation se situe dans la région distale, il n'y aura pas d'impact sur l'expression (Capel 2007).

Tableau 3. Critères d'Amsterdam I, Amsterdam II et de Bethesda (d'après Vasen 1991 ; Vasen 1999 ; Umar 2004 ; Laghi 2004).

Critères d'Amsterdam I pour le diagnostic de SL Au moins 3 malades apparentés doivent être atteints de cancers colorectaux histologiquement confirmés et : 1. Un malade doit être apparenté au premier degré avec les deux autres ; 2. Au moins deux générations successives doivent être atteintes ; 3. Un des cancers doit être diagnostiqué avant l'âge de 50 ans ; 4. Le diagnostic de polypose adénomateuse familiale doit être impérativement exclu.
Critères d'Amsterdam II pour le diagnostic de SL Au moins 3 malades apparentés doivent être atteints de CCR ou cancer associé au SL histologiquement confirmés (endomètre, estomac, ovaire, intestin grêle, uretère ou bassinet, cerveaux, tumeurs sébacées) et : 1. Un malade doit être apparenté au premier degré avec les deux autres ; 2. Au moins deux générations successives doivent être atteintes ; 3. Un des cancers doit être diagnostiqué avant l'âge de 50 ans ; 4. Le diagnostic de polypose adénomateuse familiale doit être impérativement exclu dans les cas où un cancer colorectal est diagnostiqué.
Critères de Bethesda pour justifier le screening d'instabilité de microsatellites Les tumeurs doivent être analysées pour leur statut MSI dans les cas suivants : 1. CCR diagnostiqué avant 50 ans ; 2. présence d'au moins 2 tumeurs (CCR ou Associés au SL*), synchrones ou métachrones, quel que soit l'âge ; 3. CCR d'histologie évocatrice d'un phénotype MSI§ diagnostiqué avant 60 ans ; 4. CCR ou Tumeur associée au SL* chez un apparenté au premier degré avant 50 ans ; 5. CCR ou Tumeur associée au SL* chez 2 apparentés ou plus au premier ou deuxième, quel que soit l'âge.

* Les tumeurs associées au SL incluent : CCR, endomètre, estomac, ovaire, pancréas, voies urinaires, biliaire, cerveaux (généralement glioblastomas), adénomes des glandes sébacées, keratoacanthomes et intestin grêle. § TIL (lymphocytes infiltrant la tumeur), réaction lymphocytaire de type Crohn, cellules mucineuses en bague à chaton ou aspect médullaire.

3. Détermination du statut MSI/MMR

La détermination du statut MSI a un objectif double : d'abord l'identification des patients porteurs d'un cancer MSI (notamment les CCR) permettra à ceux-ci de bénéficier d'un traitement personnalisé car le statut MSI est aujourd'hui établi en tant que bio marqueur pronostic et prédictif ; et secondairement l'identification des patients atteints d'un SL.

a) Valeur pronostique et prédictive du statut MSI/MMR

Aux stades localisés (stades I à III), les CCR dMMR sont de meilleur pronostic que les CCR pMMR (Cohen 2015). L'analyse des essais cliniques comparant la chirurgie seule à la chirurgie associée à une chimiothérapie adjuvante par fluoropyrimidine a permis de démontrer l'influence pronostique favorable du statut dMMR. S'appuyant sur les résultats de 5 essais de phase III concernant des CCR de stade II ou III, Ribic et al. ont rapporté en 2004 un hazard ratio (HR) à 0,31 (p = 0,004) en faveur d'une amélioration de la survie globale (SG) à 5 ans des patients atteints d'un CCR dMMR traité par chirurgie seule (Ribic 2003). L'étude complémentaire de Sargent et al. a validé ces résultats qui perdaient cependant leur significativité en analyse multivariée (Sargent 2010). Finalement, l'étude PETACC-3, qui a analysé les CCR de stades II et III, a confirmé le caractère pronostique positif du statut MMR, avec un impact pronostic plus important pour les tumeurs de stade II comparé aux tumeurs de stade III (Roth 2010 ; Klingbiel 2015). La méta-analyse ACCENT (n = 7 803) a étudié l'impact du statut MMR par sous-groupes : chirurgie seule ou chirurgie associée à une chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracile. Cette étude a confirmé le caractère de bon pronostic du statut dMMR sur la survie sans récidive (SSR) et la SG pour les stades II et III (Sargent 2014).

Concernant le caractère prédictif du statut MMR quant à l'efficacité des chimiothérapies adjuvantes contenant du 5-fluorouracile, celui-ci a été complexe à appréhender. Tout d'abord, l'analyse de Ribic et al. (n = 570) a montré que les patients avec des tumeurs pMMR de stades II et III avaient une meilleure SSR et une meilleure SG lorsqu'ils recevaient une chimiothérapie adjuvante par fluoropyrimidine, contrairement au groupe dMMR (Ribic 2003). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de Sargent et al. portant sur une cohorte plus importante (n = 1 027), analyse qui retrouvait en outre une diminution de la survie sans progression (SSP) chez les patients traités du groupe des CCR dMMR de stade II, mais pas

pour les stades III. La survie des patients avec tumeur dMMR de stade II traitée par fluoropyrimides était statistiquement diminuée par rapport à ceux n'ayant pas reçu de chimiothérapie (Sargent 2010).

Ces données permettent de conclure que le statut dMMR doit être connu pour les stades II, car en cas de tumeur dMMR, il n'y pas d'indication à une chimiothérapie par fluoropyrimidines en raison de leur excellent pronostic et de l'absence d'impact de la chimiothérapie adjuvante dans cette situation (Cohen 2015).

Sur ce sujet, les résultats de l'étude de Sinicrope et al. sont très intéressants car ils ont montré que les patients avec une mutation germinale d'un gène MMR tiraient un bénéfice significatif de la chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracile, tandis que les patients avec une inactivation somatique du système MMR ne présentaient pas d'amélioration de la SSR avec le 5-fluorouracile (Sinicrope 2011). Il est donc possible que l'effet potentiellement délétère des fluoropyrimidines pour les tumeurs dMMR de stade II soit réel pour les patients avec un CCR sporadique, mais pas pour les patients avec un SL. Ces résultats nécessitent d'être confirmés (Devaud & Gallinger 2013 ; Cohen 2015).

b) Méthodes de détermination

(1) Le génotypage

Comme nous l'avons vu, dans les tumeurs MSI, les séquences répétées mono-, di-, tri ou tétra-nucléotidiques sont particulièrement instables, du fait de l'accumulation, à leur niveau, d'erreurs de réplication par glissement (« slippage ») de la polymérase qui ne seront pas ou qui seront mal réparées du fait d'une déficience MMR. Les tumeurs MSI se caractérisent donc par l'apparition de nouveaux allèles par rapport à l'ADN germinal correspondant lorsque l'on génotype des marqueurs microsatellites à partir de l'ADN extrait de cellules tumorales.

De nombreux microsatellites différents ont été étudiés, dans le but d'identifier les tumeurs MSI. En fonction du type (mono-, di-, ou tri-nucléotide) et du nombre de microsatellites analysés, les résultats de la fréquence du statut MSI dans différents types tumoraux sont extrêmement variables (Perucho 1998). En 1997, une réunion internationale de consensus a proposé un panel de 5 marqueurs, pour une analyse standardisée du phénotype MSI (Boland

1998). Ce panel incluait 2 marqueurs mononucléotidiques (BAT-25 et BAT-26) et 3 marqueurs dinucléotidiques (D5S346, D2S123 et D17S250). Les tumeurs présentant une instabilité de deux ou plus de ces marqueurs étaient définies comme MSI-H (High), tandis que celles présentant une instabilité au niveau d'un seul marqueur ou ne présentant aucune instabilité étaient définies respectivement comme MSI-L (Low) et MSS (MicroSatellite Stable). Il est maintenant admis que seul le phénotype MSI-H permet d'identifier de façon indiscutable les malades atteints d'un SL ou présentant une tumeur sporadique avec d'authentiques altérations du système MMR.

Les critères permettant de définir le statut MSI d'une tumeur ont été révisés en 2002, en raison de la mise en évidence d'imperfections liées à l'utilisation, notamment, de marqueurs dinucléotidiques (Umar 2004) qui sont hautement polymorphes, ce qui nécessite alors une analyse comparative avec l'ADN germinal correspondant. Enfin, certaines tumeurs MSI résultant d'une mutation du gène MSH6 ne présentent pas d'altérations au niveau des marqueurs dinucléotidiques (Akiyama 1997a). Pour cela, un panel de 5 marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes (c'est-à-dire présentant peu de variants de taille) dans la population mondiale (BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 et NR27, « PCR pentaplex »), a été mis au point par le laboratoire d'accueil (Suraweera 2002). Ce panel de marqueurs permet d'établir le statut MSI d'une tumeur avec une sensibilité et une spécificité de presque 100%, sans nécessité d'avoir recours à une analyse comparative de l'ADN constitutionnel des malades (Buhard 2006). Il a été, depuis, démontré que l'altération de seulement deux marqueurs suffit pour affirmer le statut MSI des CCR (Goel 2010).

Un biomarqueur d'avenir du CCR dMMR est la protéine HSP110, dont le gène est la cible de mutations dans les CCR dMMR. HSP110 est une protéine chaperonne de la famille des Heat Shock Protein (HSP) qui participe à la survie cellulaire dans différentes conditions de stress. HSP110 est surexprimée dans les CCR et associée à un mauvais pronostic (Slaby 2009 ; Kai 2003). Dans les tumeurs dMMR, HSP110 est systématiquement mutée au niveau d'une répétition nucléotidique T17 dans l'intron 8. Cette mutation se présente sous forme de délétions du T17 de 1 à 7 pb. La mutation d'HSP110 dans les tumeurs dMMR semble associée à un meilleur pronostic, mais aussi à une sensibilité accrue au 5-FU (Cohen 2015 ; Collura 2014). En 2016, le laboratoire d'accueil a publié l'utilisation de la mutation (en effet délétion somatique) du microsatellite intronique T17 en tant que marqueur du phénotype

MSI. Il a été démontré que T17 est remarquablement monomorphe puisqu'il n'a que 2 allèles seulement (T16 et T17). Aussi, T17 a été plus sensible et plus spécifique pour identifier le phénotype MSI d'une tumeur que les panels de marqueurs proposés jusqu'à lors. A ceci s'ajoute la simplicité de lecture due, en particulier, à cause de son exceptionnel monomorphisme dans les ADNs normaux (Buhard 2016).

(2) L'immunohistochimie

La principale alternative au génotypage pour la détermination du statut MSI d'une tumeur est l'immunohistochimie. En effet, les altérations génétiques ou épigénétiques des gènes du système MMR se traduisent par une perte de fonction (et donc d'expression dans la plupart des cas) de la protéine qui en résulte.

L'étude immunohistochimique (IHC) permet d'étudier, sur une coupe histologique, l'expression tissulaire des protéines du système MMR. A l'état normal, ces protéines sont ubiquitaires et de localisation nucléaire. Le principe de l'évaluation par IHC consiste à rechercher une perte d'expression, par les cellules tumorales, de la protéine recherchée. La perte d'expression est somatique, ce qui signifie qu'elle ne s'observe que dans les cellules tumorales, à l'exception du syndrome CMMRD où la protéine MMR ne s'exprime pas, non plus, au niveau du tissu non tumoral. Ainsi, il est nécessaire que soit présent, sur la coupe histologique, un témoin interne positif (muqueuse normale ou lymphocytes du stroma).

L'expression des principales protéines du système MMR peut être actuellement étudiée à l'aide d'anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce depuis 1996 : hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2. La perte d'expression des protéines hMLH1 et hMSH2 est exclusive, c'est-à-dire qu'elle ne concerne qu'une seule des deux protéines. En revanche, en cas de perte d'expression de la protéine hMLH1, on observe une perte d'expression conjointe de la protéine hPMS2. De la même manière, l'extinction de la protéine hMSH2 s'accompagne d'une extinction de la protéine hMSH6. En effet, comme nous l'avons vu, ces protéines agissent sous forme d'hétérodimères MLH1-PMS2 et MSH2-MSH6, l'inactivation d'une des deux protéines affectant l'expression de la protéine partenaire. Ainsi, lorsque MLH1 n'est pas exprimé ou lorsqu'il est muté, de telle sorte qu'il ne peut interagir avec PMS2, cette dernière est dégradée. A l'inverse, MLH1 reste stable en l'absence de la protéine PMS2,

probablement du fait d'interactions avec d'autres homologues de MutL, tels que PMS1 ou MLH3 (Räschle 1999).

L'IHC est une technique intéressante, car peu onéreuse et peu consommatrice de temps. Elle est utilisée en routine dans les laboratoires d'Anatomie Pathologique. C'est une technique extrêmement sensible, utilisable même si l'on ne dispose que de peu de matériel tumoral (biopsie, carcinomes mucineux, cancer en partie stérilisé par le traitement néo-adjuvant). Elle permet en outre de déterminer la protéine défectueuse, et d'orienter ainsi les généticiens vers le gène MMR à séquencer (Hampel 2005 ; Hampel 2008).

Dans le CCR Il existe une excellente corrélation entre la perte d'expression des protéines MMR observée en IHC et l'instabilité des microsatellites mise en évidence par le génotypage (Cawkwell 1999 ; Cunningham 2001 ; Hampel 2005 ; Niessen 2006 ; Piñol 2005 ; Hampel 2008). Plusieurs études ont montré que l'étude des protéines hMHS6 et hPMS2 améliorait le rendement de l'IHC d'environ un tiers et augmentait sa sensibilité par rapport à l'analyse moléculaire (Hampel 2005 ; de Jong 2004 ; Truninger 2005 ; Lagerstedt 2007 ; Senter 2008). Egalement, il a été proposé de commencer l'analyse IHC par une étude de MHS6 et PMS2 (Shia 2009). Malgré l'avantage économique mise en avant par les auteurs, cette approche n'est pas devenue pratique courante car MSH6 et PMS2 sont d'interprétation plus délicate que MLH1 et MSH2.

L'IHC peut toutefois être mise en défaut dans quelques situations particulières. Nous citons les principales : i) en cas de mutations faux sens, responsable d'une perte de fonction d'un gène MMR, sans perte d'expression du gène concerné ; ii) secondaire à l'hétérogénéité des pratiques de fixation des tissus responsable d'une diminution de la sensibilité de la technique. Enfin, il est important d'avoir à l'esprit que les techniques d'IHC ont parfois une interprétation difficile et justifie leur réalisation dans des centres experts (Chapusot 2004 ; Overbeek 2008).

Finalement, il a été proposé en 2016 l'utilisation (basée sur la charge mutationnelle) du séquençage de nouvelle génération pour l'identification des tumeurs dMMR (Stadler 2016). Les auteurs soulignent aussi que l'analyse génomique permettrait de connaître le statut d'autres gènes cliniquement pertinents, tels que *NRAS*, *KRAS* et *BRAF*. Cependant, une grande partie de laboratoires n'ont pas la possibilité ou la disponibilité pour utiliser le

séquençage de nouvelle génération de façon courante dans la pratique clinique. Aussi, le seuil pour considérer une tumeur dMMR doit être établi en fonction du nombre de gènes analysés lors du séquençage ce qui rendrait difficile l'uniformisation des résultats.

C. Le cancer du pancréas MSI

1. Fréquence de l'instabilité de microsatellites dans l'ACP

La fréquence de MSI dans le cancer du pancréas rapportée dans la littérature est très variable et cela pour plusieurs raisons. Nous avons réalisé une recherche exhaustive de la littérature médicale sur ce sujet, résumée sur le **tableau 4**. Depuis 1993, plus de 25 articles ont été publiés avec des fréquences des patients MSI et/ou dMMR allant de 0% à 75%. Si l'on considère uniquement les articles publiés les 5 dernières années (depuis 2012), les résultats ne sont pas moins disparates, variant de 0.3% à 15.4% (Laghi 2012 ; Ottenhof 2012; Liu 2014 ; Mitsuhashi 2015; Riazy 2015 ; Grant 2015 ; Humphris 2017).

Les possibles explications aux différences observées sont les méthodes employées et la sélection des patients (**Tableau 4**). Certains auteurs ont utilisé des marqueurs de biologie moléculaire peu conventionnels ou non recommandés, d'autres n'ont pas différencié MSI-H de MSI-L, et ceux qui ont choisi l'IHC n'ont que rarement réalisé la recherche d'expression des 4 protéines (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) ou encore n'avait visiblement pas d'expérience avec la méthode. Finalement, certains auteurs n'ont étudié que certains sous-types histologiques, tels que le carcinome médullaire ou le carcinome à cellules acineuses, dont la prévalence du phénotype MSI est plus élevé (Goggins 1998 ; Wilentz 2000 ; Liu 2014).

Cependant, deux articles récents avec des résultats concordants doivent être cités. En 2015, Grant et al. ont voulu déterminer la part génétique des cancers pancréatiques. Ainsi, 290 patients sélectionnés à partir de 708 patients porteurs d'un ACP ont eu par séquençage de nouvelle génération (« next-generation sequencing ») l'analyse de 13 gènes dont *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*. La sélection consistait à réduire le biais d'antécédents familiaux (cancers du pancréas, sein, colon) afin de déterminer la prévalence exacte de mutations

constitutionnelles dans une population d'ACP. Onze mutations clairement délétères (soit 3,8 % des cas) étaient identifiées. Ces mutations concernaient le syndrome de Lynch (4/290, 1.38%), le syndrome sein-ovaires (BRCA 1/2), le gène TP 53 (syndrome de Li-Fraumeni) et le gène ATM (syndrome d'ataxie télangiectasie). La fréquence d'une anomalie génétique constitutionnelle était significativement plus importante en cas d'antécédent personnel ou familial de cancer du sein ou du côlon (11 % vs 2-3 %) (Grant 2015). Pour deux patients, des échantillons tumoraux disponibles ont permis de retrouver une correspondance immunohistochimique (soit, la perte d'expression de la protéine respective). Ce travail montre la vraie part génétique/héréditaire des cancers pancréatiques, soit 3,8 % lorsque l'on estime la part génétique des cancers colorectaux à 5 %.

Récemment, Humphris et al. ont publié leur résultats sur l'analyse par sequençage génomique (« whole genome sequencing ») et sequençage exonomique (« whole exome sequencing ») de 385 ACP consécutifs. L'analyse de valeurs aberrantes a permis l'identification de 20 tumeurs avec charge mutationnelle élevée, dont 5 considérés comme hypermutateurs. L'analyse par IHC a confirmé le statut dMMR de 4 (1%) de ses tumeurs et s'est révélée la méthode la plus performante pour l'identification des patients dMMR. La présence de multiples mécanismes génomiques d'inactivation des gènes MMR étant considérée comme facteur confondant selon les auteurs et pouvant, ainsi, compromettre les résultats de la biologie moléculaire (Humphris 2017).

Aussi, la valeur pronostique du phénotype MSI dans le cancer du pancréas n'a pas été démontrée. Si les premières études publiées avaient montré une corrélation, quoique souvent non significative statistiquement, entre MSI et un meilleur pronostic, cela ne s'est pas confirmé par la suite (**Tableau 4**). Une étude récente, dont la fréquence de cas dMMR est cependant trop élevée, a montré l'absence de bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante (avec des analogues de la pyrimidine) chez les patients dMMR, en contraste avec les patients pMMR qui présentaient un gain de survie d'environ 10 mois (Riazy 2015). Cloyd et al. ont très récemment publié une étude concernant 10 patients atteints d'ACP issus de leur base de données prospective de familles considérées à haut risque de cancer gastrointestinal. Sept patients avaient une mutation germinale d'un des gènes du système MMR (4 *MLH1* et 3 *MSH2*). L'âge moyen était de 57 ans et 8/10 avaient une histoire personnelle de cancer du spectre SL. Parmi les 6 patients avec une maladie localisée et qui ont bénéficié d'une

chirurgie à but curatif, la survie globale à 5 ans était de 100% (follow-up de 93.1 mois). Les 4 patients métastatiques traités par chimiothérapie palliative ont eu une survie moyenne de 16.5 mois et une survie à 5 ans de 25% (Cloyd 2017), largement supérieures à celles observées dans la littérature. En effet, la survie moyenne des patients opérés est de 25% (Neoptolemos 2010) et la survie moyenne des patients métastatiques traités par chimiothérapie est de 11.1 mois pour ceux qui supportent le Folfirinox et d'à peine 6.8 mois avec la gemcitabine (Conroy 2011). Leurs résultats doiven être confirmés par des études prospectives de plus grande échelle.

Tableau 4. Revue de la littérature (cancer du pancréas et instabilité de microsatellites).

Référence	Type	n	MSI/dMMR n(%)	Pentaplex NCI[a]	PCR MN[b]	PCR total	MSI-H cutoff	IHC (protéines)	Analyse de survie
Han 1993	carcinome[c]	9	6 (67%)	Non	0	4	---	Non	Non
Seymour 1994	ACP	7	0 (0%)	Non	0	4	---	Non	---
Brentnall 1995	carcinome[d]	8	6 (75%)[e,f]	Non	0	6-12	≥1[e]	Non	Non
Abe 1996	carcinome[c]	44	7 (15.9%)[e]	Non	0	5	≥2[e]	Non	Non
Venkatasubbarao 1998	carcinome[c]	14	4 (28.6%)[e]	Non	0	6	≥2[e]	Non	Non
Ouyang 1997 Ouyang 1998	carcinome[c]	60	9 (15%)[e]	Non	0	5	≥2[e]	Non	Non
Goggins 1998	ACP	82	3 (3.7%)[e]	Non	1	6	≥2[e]	Non	Non
Ghimenti 1999	carcinome[c]	21	0 (0%)[g]	Non	0	10	≥40%	Non	---
Wilentz 2000	medullaire[h,i]	18[i]	4 (22.2%)[i]	Non	3	3	≥2[e]	MLH1[i, j] et MSH2[k]	Non
Ueki 2000	carcinome[c]	36[l]	4 (11.1%)[l]	Non	---	---	---	Non	Non
Yamamoto 2001a	carcinome[c]	100 & 3LS	13/100 (13%) 3/3 (100%)	Oui	2	5	≥2	No[m]	Non
Abraham 2002b	ACC	13	1 (7.7%)[n]	Oui	2	5	≥2	No	Non
Nakata 2002a Nakata 2002b	carcinome[c]	46	8 (17.4%)	Non	0	8	≥3	No	*MSI meilleure survie*
Tomaszewska 2003	carcinome[c]	30	0 (0%)	---	---	---	---	MLH1[j] et MSH2	---
Lüttges 2003	carcinome[o]	23	1 (4.3%)	Oui	2	5	≥2	MLH1[j], MSH2 et MSH6	Non
Nakata 2003	carcinome[c]	55	4 (7.2%)	---	---	---	---	MLH1[j] et MSH2[p]	*Meilleure survie si hMSH2-neg*
Maple 2005	carcinome[c,q]	35[q]	3 (8.6%)[q]	Non	5	10	≥30%	MLH1[j], MSH2 et MSH6	Non
Fujii 2009	ACP[r]	21	0 (0%)	Non	0	5	?	Non	---
de Wilde 2011	ACC	6	0 (0%)	Oui	3	6	≥30%	les 4[j]	---
Laghi 2012	ACP[s]	338	1 (0.3%)	Non	5	5	?[s]	MLH1[j,t] et MSH2	Non
Ottenhof 2012	ACP	78	9 (12.8%)[u]	---	---	---	---	les 4[j]	Non
Liu 2014	ACC	36[v]	5 (13.8%)[v]	---	---	---	---	les 4[j]	*Absence de corrélation*
Mitsuhashi 2015	ACP	283	0 (0%)	Non	2	2	?	---	---

Riazy 2015	ACP[w]	265[w]	41 (15.4%)[w]	---	---	---	---	les 4[j]	*Absence de corrélation*
Grant 2015	ACP	290	4 (1.4%)[x]	---	---	---	---	les 4[y] (l'IHC n'a pu être réalisé que sur 2 patients)	non
Humpris 2017	ACP	385	4 (1%)[z]	---	---	---	---	les 4	non

[a] Travaux ayant inclus le panel du NCI (BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250).

[b] Les marqueurs mononucléotide utilisés sont parmi les suivants : BAT-25, BAT-26, BAT-34C4, BAT-40, TGFßRII, NR-21, NR-22, NR- 24, NR-27, MONO-27, and MYCL.

[c] Carcinome pancréatique sans précision.

[d] Huit cancers du pancréas obtenus à partir de bloc de paraffine, 5 patients atteints d'une pancréatite chronique ont été exclus.

[e] Instabilité de microsatellite (la présence de MSI-H n'a pas été spécifié).

[f] Seulement 50% avaient ≥2 mutations et 1 patient sur 8 avait une mutation sur >30% des marqueurs.

[g] 14 patients sur les 21 présentaient un phénotype MSI-L (≤40% marqueurs).

[h] Séries comprenant de carcinomes médullaires; 3 parmi les 4 tumeurs MSI avaient déjà été rapportés par Goggins M, *et al*.

[i] 77 carcinomes pancréatiques. Aucun (0/77) n'était MSI ou dMMR.

[j] La perte d'expression a été définie comme étant l'absence totale de coloration des cellules tumorales.

[k] MSH2 (0,0%).

[l] 35 xénogreffes de carcinomes pancréatiques et 1 carcinome pancréatique primitif ; 3 parmi les 4 tumeurs MSI avaient déjà été rapportés par Goggins M, *et al*.

[m] L'IHC n'a pas été réalisée (immunoblotting pour l'expression de MLH1 considéré comme "difficilement détectable" pour 5/10 tumeurs sporadiques MSI-H et négative pour les 3 patients LS).

[n] Séries de carcinomes pancréatiques à cellules acineuses; 2/13 classés MSI-L.

[o] Séries de 12 ACP, 3 TIPMP dégénérées et 8 carcinomes mucineux non-kystiques; le patient MSI avait une mutation sur les 5 marqueurs du NCI et perte d'expression de MLH1 en IHC.

[p] Une tumeur (1.8%) considérée MLH1 négative présentait aussi perte d'expression de MSH2.

[q] Population de patients considérés comme « long term survivors » si survie globale >3 ans; 2/3 dMMR était aussi MSI en PCR.

[r] Toutes les tumeurs étaient des ACP à une seule exception (carcinome mucineux non-kystique).

[s] La seule tumeur MSI (1/338) était un carcinome médullaire.

[t] L'IHC pour MLH1 et MSH2 a été réalisée en 182 patients. Le patient MSI présentait une perte d'expression de MLH1.
[u] Les données ont été obtenus après contact personnel avec le dernier auteur. La fréquence de tumeurs dMMR la plus probable est de 3/78 (2 MSH2/MSH6 et 1 MLH1/PMS2).
[v] Le patient dont la tumeur a une perte d'expression de MSH6 et un de deux patients dont les tumeurs ont une perte de MSH2/MSH6 avaient une histoire compatible avec LS.
[w] 2 tumeurs parmi les 41 considérées dMMR avaient de caractéristiques histologiques de carcinome médullaire.
[x] L'étude a réalisé une recherche des mutations germinales des gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*.
[y] L'IHC n'a pu être réalisé que sur 2 patients.
[z] 180 par séquençage génomique (WGS) et 205 par séquençage exômique (WES).
MSI, instabilité de microsatellite; MMR, « mismatch repair »; MN, marqueur mononucleotidique; NCI, National Cancer Institute, ACP, adénocarcinome canalaire du pancréas ; ACC, tumeur à cellules acineuses ; LS, syndrome de Lynch

2. Cancer du pancréas et syndrome de Lynch

Henry Lynch a rapporté la présence de l'ACP lors d'une de ses premières publications sur les familles atteintes de multiples cancers (Lynch 1966). Néanmoins, l'évidence scientifique pour inclure le cancer du pancréas dans les cancers du spectre SL a été difficile à interpréter et les études peu convaincantes (Watson & Lynch 1993 ; Aarnio 1999; Vasen 2001; Goecke 2006; Aarnio 1995; Watson 2008). En effet, la plupart des études examinant le risque de cancer dans le SL se sont basées sur des familles avec une histoire de CCR dans un âge précoce. Cette méthode présente un biais de sélection et le risque de surestimation de l'incidence des cancers. De plus, de nombreux rapports publiés rapportent un petit nombre de cas avec histoire familiale incomplète. Les analyses effectuées exclusivement sur les génotypes n'ont pas le pouvoir d'estimer avec précision des événements peu communs, tels les cancers avec une faible prévalence (Kastrinos 2009).

Win et al. ont évalué le risque de cancer non-colorectal chez les patients SL ayant déjà été opérés d'un CCR. Le suivi de 764 patients a retrouvé un risque augmenté en comparaison avec la population générale de cancer de l'endomètre (40x), urothélial (12x), de l'intestin grêle (72x), de l'estomac (5x), de l'ovaire (4x), hépatobiliaire (6x) et de la prostate (2x). Trois patients ont développé un cancer du pancréas (0.4%), soit une incidence deux fois supérieure à celle attendue sans pour autant être statistiquement significative (Win 2012).

En 2015, Sallo-Mullen et al. ont publié la prévalence de mutations germinales des gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PALB2* et *FAMMM* chez 159 patients opérés de façon consécutive d'un cancer du pancréas et ayant bénéficié d'une consultation d'oncogénétique (les critères pour la proposition d'une consultation d'oncogénétique n'ont malheureusement pas été décrits). Quatre patients (2.5%) avaient une mutation d'un gène MMR (Salo-Mullen 2015).

L'article de référence reste celui de Kastrinos et al. qui ont publié les résultats d'une analyse de 6342 individus provenant de 147 familles avec mutation germinale connue d'un des gènes MSI. Trente et une familles (21.1%) présentaient au moins 1 patient atteint d'un cancer du pancréas. Ils ont retrouvé un risque cumulé de cancer du pancréas de 1.31% à

l'âge de 50 ans et de 3.68% à l'âge de 70 ans ce qui correspond à un risque 8.6 fois supérieur à celui de la population générale (Kastrinos 2009).

3. Variantes histologiques du cancer du pancréas associées au phénotype MSI

Deux variantes histologiques de cancer du pancréas ont été associées au phénotype MSI : i) le carcinome médullaire et ii) l'adénocarcinome à cellules acineuses.

Le carcinome médullaire est une néoplasie maligne épithéliale caractérisée par une faible différentiation, une formation glandulaire limitée, la présence des bords tumoraux bien délimités à l'interface avec le tissus non-tumoral et un aspect proéminant syncytial de croissance. Il est fréquemment observé un nombre élevé de lymphocytes intratumoraux (CD3+) (Wilentz 2000). En fonction de la présence de certaines caractéristiques histologiques communes à l'adénocarcinome à cellules acineuses, la différentiation acineuse doit être exclue par IHC. Au niveau moléculaire, ces tumeurs ne comportent en général pas de mutation du gène *KRAS*, contrairement aux adénocarcinomes canalaires classiques, mais peuvent présenter mutations des gènes *BRAF*, *ACVR2* et *TGFBR2*. Ils sont classiquement associés à une instabilité des microsatellites, avec 28% de cas MSI dans la série de Wilentz et al. (Wilentz 2000).

L'adénocarcinome à cellules acineuses est une néoplasie épithéliale maligne composée de cellules morphologiquement semblables aux cellules acineuses (mais avec des signes de différentiation acineuse plus ou moins nets en histologie). Il s'agit d'une néoplasie très cellularisée avec absence du strome desmoplasique caractéristiquement associé à l'ACP. L'IHC montre une expression caractéristique d'enzymes pancréatiques, en particulier trypsine et chymotrypsine (>95%) (Abraham 2002b). Ce type représente 1 à 2% des tumeurs exocrines du pancréas chez l'adulte, mais environ 15% des tumeurs pancréatiques chez l'enfant (Monges & Fléjou 2010). Il existe un sexe ratio prononcé avec 3.6 hommes : 1 femme. Il s'agit souvent de tumeurs volumineuses, mais généralement moins fermes et mieux limitées que les adénocarcinomes canalaires. Entre 10-15% des patients (le plus souvent atteints de métastases hépatiques) peuvent présenter le syndrome d'hypersécrétion de lipase, par libération intravasculaire de grandes quantités de lipase

produites par la néoplasie. Du point de vu moléculaire, l'adénocarcinome à cellules acineuses contraste avec l'ACP classique par la rareté de mutations *KRAS*, *SMAD4* ou *CDKN2A*.

L'association entre l'adénocarcinome à cellules acineuses et le phénotype MSI n'a été démontrée que récemment par Liu et al. Ils ont analysé une série de 36 adénocarcinomes à cellules acineuses opérés au Sloan-Kettering de New York et ont retrouvé une perte d'expression des protéines MMR chez 5 (14%) tumeurs (Liu 2014).

Concernant la relation du phénotype MSI et l'ACP développé à partir d'une TIPMP, il n'existe que très peu de littérature. Deux cas ont été rapportés chez des patients atteints de SL (Sparr 2009 ; Flanagan 2015). Une étude allemande a retrouvé 1 patient (8.3%) dans une série de 12 tumeurs mucineuses non kystiques (TIPMP et carcinome colloïde) (Lüttges 2003). Une étude japonaise a étudié la présence de MSI chez 26 TIPMPs opérés, dont 10 présentaient au moins un carcinome *in situ*. Aucune de 16 TIPMP bénignes n'avait de profil MSI. Un patient (10%) avec une TIPMP invasive a été considéré MSI-H, cependant l'analyse moléculaire utilisée n'était pas une des pentaplex recommandées (Boland 1998 ; Suraweera 2002) et lors de l'analyse IHC l'expression des protéines MMR était conservée (Nakata 2002a). Il est intéressant de citer l'article d'Abraham et al. concernant les néoplasies intraductales et papillaires des voies biliaires. Ils ont retrouvé 2 (11.8%) tumeurs MSI-H parmi les 17 étudiées. Aucun de deux cas ne présentait une methylation du promoteur *hMLH1* (Abraham 2002a).

D. Immunologie et cancer

Le lien entre système immunitaire et cancer a été suggéré depuis plus d'un siècle suite aux travaux originaux de Rudolph Virchow il y a plus de 150 ans (Adams 2015). Les bases de cette relation entre cancer et immunité implique trois principes fondamentaux selon le mode dont le système immunitaire agit pour défendre et protéger un individu: i) la détection d'antigènes du non-soi présents dans les agents pathogènes, mais aussi dans les cellules infectés ou cancéreuses ; ii) la possibilité d'employer des fonctions effectrices pouvant cibler spécifiquement et détruire les pathogènes ou les cellules infectées ou cancéreuses tout en

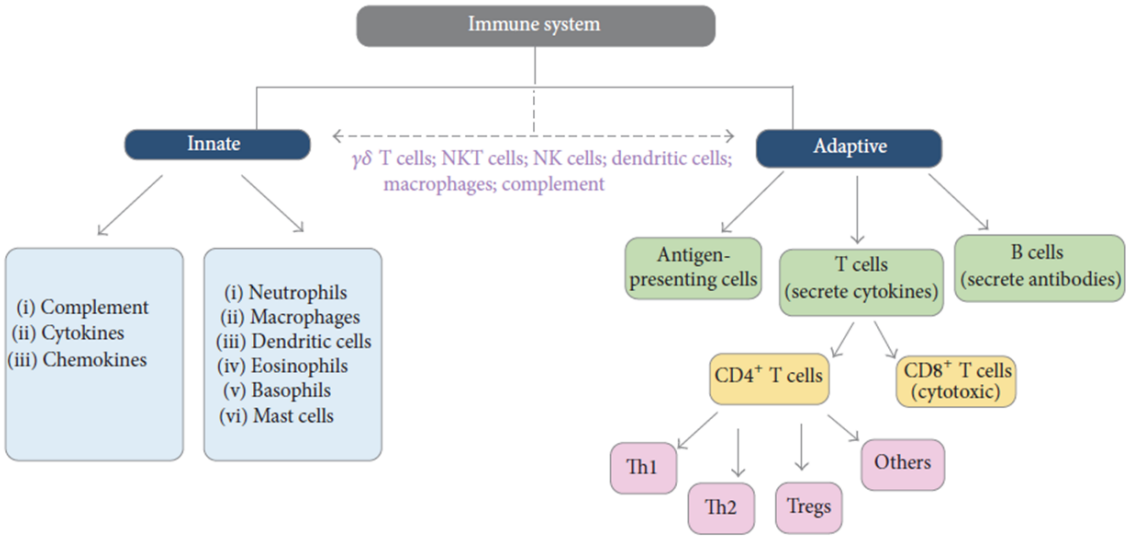
préservant l'hôte et iii) le développement d'une mémoire immunologique à travers des réponses immunitaires adaptatives pour permettre une défense ultérieure rapide et efficace (Murphy 2008b). C'est grâce à ce processus complexe que le système immunitaire acquiert les caractéristiques qui donnent naissance au paradigme connu, dans le domaine de l'oncologie, sous le nom d'« immunoediting », responsable de l'équilibre entre la surveillance immunologique et la progression tumorale (Pandya 2016 ; Hoos & Britten 2012 ; Vesely 2011).

1. Le système immunitaire

Le système immunitaire constitue un réseau complexe de processus biochimiques qui reconnaissent et défendent l'individu contre les protéines ou antigènes du non-soi (Murphy 2008b). Il est constitué de deux formes distinctes de réponse immunitaire : la réponse innée et la réponse adaptative (Pandya 2016 ; Murphy 2008b) (**Figure 7**). Les réponses immunitaires immédiates et peu spécifiques sont classées comme innées en fonction de leur activation non-spécifique et rapide contre divers antigènes, tels les microbes pathogènes, les antigènes allergéniques, ou encore de molécules ou protéines du non-soi (Murphy 2008a ; Murphy 2008b). Bien que l'immunité innée ait une durée d'action courte et ne soit pas capable de créer une mémoire immunologique, elle est toujours capable de distinguer entre soi et non-soi. Les réponses immunitaires innées et adaptées travaillent en tandem (Chaplin 2010).

Les principaux acteurs cellulaires de la réponse immunitaire innée sont les phagocytes et les cellules « natural killers » (NK) (Sun & Lanier 2009). Les phagocytes (neutrophiles, monocytes et macrophages) participent à la protection immédiate de l'hôte en engloutissant les cellules qui expriment des antigènes du non-soi ou des antigènes du soi altérés et finissent pour les tuer à travers l'action d'enzymes lysosomales (**Figure 7**). Les cellules NK confèrent une protection immunitaire à l'aide de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), qui sont exprimées de façon universelle à la surface de toutes les cellules eucaryotes (Sun & Lanier 2009).

Figure 7. Le système immunitaire inné et adaptatif. La réponse immunitaire innée comprend des cellules et des molécules solubles non spécifiques d'activation rapide présentes dès le début de l'inflammation. En revanche, l'immunité adaptative englobe des agents immunitaires plus spécifiques à certains antigènes, capables de créer une mémoire immunologique. **D'après Pandya 2016**.



Contrairement à la réponse immunitaire innée, l'immunité adaptative implique la création d'une mémoire immunologique (**Figure 7**) (Murphy 2008b). Cette forme d'immunité survient progressivement avec le temps et ne se caractérise pas par une réponse rapide, car elle implique la transformation de lymphocytes naïfs, telles les cellules T et B qui acquièrent également des capacités effectrices T particulières ou des cellules B sécrétrices d'anticorps (Murphy 2008c). Il existe deux types de cellules T différentes dans le système immunitaire qui se distinguent par le type de récepteur présent en surface : cellules T alpha beta (αβ) et les cellules T gamma delta (γδ) (Chien 1996). Seule une minorité de lymphocytes est Tγδ. Ils ont la particularité de ne pas avoir besoin que l'antigène leur soit présenté par les molécules du CMH afin de le reconnaître. Ces lymphocytes T reconnaissent une très grande variété d'antigènes (peptidique, lipidique, glyco-lipidique, « soi » ou « non-soi ») (Chien 1996). Les lymphocytes Tαβ sont quant à eux divisés en deux sous-types supplémentaires : les lymphocytes T CD4+, et les lymphocytes T CD8+ (**Figure 7**) (Koretzky 2010 ; Luckheeram 2012). La transformation des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes T CD4+ effecteurs impliquent une co-stimulation entre les molécules du CMH de classe II (qui ne sont

présentes que sur les cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules B, les macrophages et cellules dendritiques) et le récepteur des lymphocytes T (Koretzky 2010 ; Luckheeram 2012). En fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement et de la présence de certains facteurs de transcription durant le temps où les signaux de co-stimulation se produisent, les lymphocytes T CD4+ peuvent se différencier en plusieurs sous-types de lymphocytes effecteurs, comme par exemple : lymphocyte T auxiliaire 1 (Th1, T helper), Th2, ou encore les lymphocytes régulateurs (Treg). Ces derniers sont une sous-population de lymphocytes T CD4+ ayant la propriété d'inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Ils sont donc nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et participent au maintien de l'homéostasie (Luckheeram 2012).

Les cellules T CD8+ naïves ont également besoin des molécules du CMH de classe I pour leur transformation en cellules T cytotoxiques effectrices (Koretzky 2010). Les cellules T CD8+ se lient, via le récepteur spécifique des lymphocytes T, au complexe antigène/CMH de classe I présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène (cellule cible) et il s'ensuit une libération de perforines et granzymes par les cellules T CD8+ et, par conséquent, la mort de la cellule cible (Koretzky 2010).

Le système immunitaire surveille en continu les différentes cellules de notre organisme à la recherche de cellules cancéreuses (concept d'immunosurveillance). Cette surveillance se fait grâce aux antigènes associés aux tumeurs qui comprennent essentiellement des antigènes de différentiation, des antigènes provenant de mutations et des antigènes cellulaires surexprimés (Ileana 2013).

2. Système immunitaire et cancer

Durant la carcinogenèse, plusieurs processus de l'immunité innée sont activés afin de réduire l'inflammation induite par le cancer, mais également déclencher la réponse immune adaptative pour cibler le cancer *via* des mécanismes immunitaires plus spécifiques (Chen & Mellman 2013 ; Dunn 2006).

L'immunité adaptative joue un rôle important dans la régulation de la cancérogenèse grâce à ses fonctions effectrices qui peuvent entraîner l'éradication ou le contrôle de l'évolution tumorale ou bien la laisser proliférer librement (Dunn 2006 ; Vesely 2011). Cette forme de

réponse immunitaire est capable de cibler des antigènes tumoraux spécifiques en employant les fonctions effectrices des anticorps, des lymphocytes T, des cellules B et des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Warrington 2011).

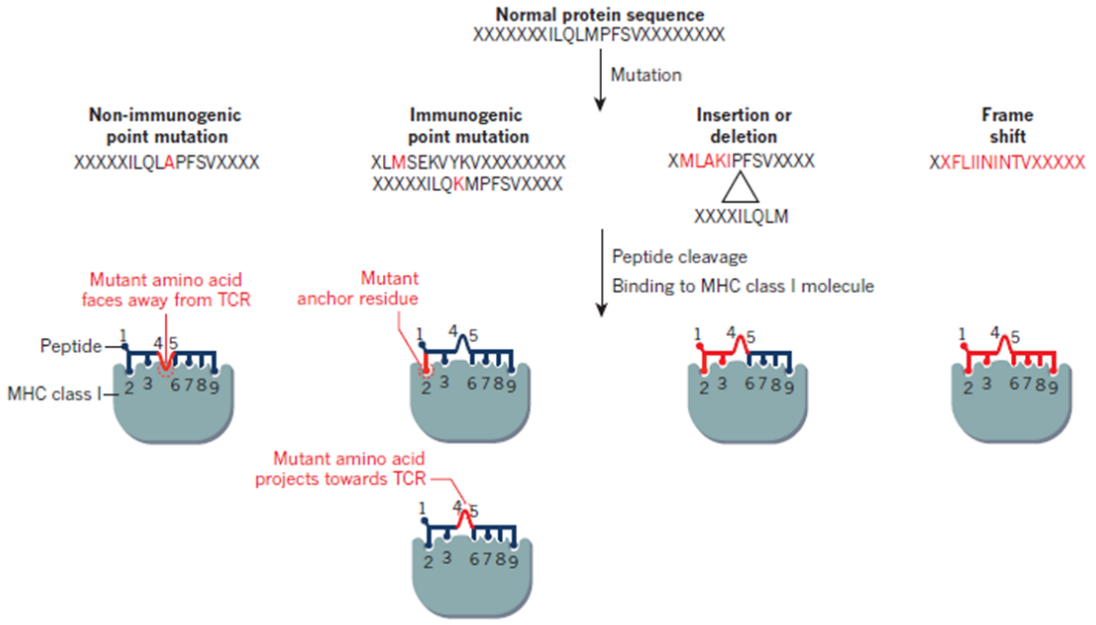
Le concept selon lequel les cellules T peuvent reconnaître des épitopes issus de mutations ou d'aberrations transcriptionnelles (neoépitopes) lors du processus de carcinogénèse a vu le jour au début des années 1980 (De Plaen 1988 ; Stauss 1986 ; Coulie 2014). Les peptides immunogéniques incluent des peptides contenant des mutations qui sont exposées aux récepteurs des cellules T ou des peptides avec résidus qui augmentent l'affinité de liaison des molécules du CMH de classe I (Chen & Mellman 2017) (**Figure 8**). Il est fort probable que la charge mutationnelle d'une tumeur contribue à son profil immunitaire. Ainsi, plus grand est le nombre de mutations, plus probable est le fait que des mutations immunogéniques aient lieu, offrant ainsi des cibles potentielles pour l'attaque par les cellules T (Rizvi 2015 ; Le 2015 ; Schumacher & Schreiber 2015). De même, les mutations ayant lieu au début du processus d'oncogenèse (et de ce fait) partagées par la plus part des cellules tumorales (« truncal mutations ») doivent générer de réponses anti-tumorales de la part de cellules T plus prononcées que celles induites par les mutations d'apparition tardive et limitées à un nombre moindre de cellules tumorales (« branch mutations ») (McGranahan 2016).

a) L'immuno-editing

Le système immunitaire a un rôle ambivalent, puisqu'il protège notre organisme des cellules cancéreuses, mais façonne également l'immunogénicité de la cellule tumorale (concept d'immuno-editing). Des travaux récents ont permis de mettre en évidence un équilibre délicat entre dormance et progression. Le processus d'immuno-editing comprend 3 phases distinctes : l'élimination, l'équilibre, et l'échappement (les 3 « E ») (Dunn 2006 ; Mittal 2014 ; Schreiber 2011) (**Figure 9**).

La phase d'élimination, première étape du processus d'immuno-editing, est en effet une composante de la théorie d'immunosurveillance et fait référence à la capacité du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif à reconnaître et à éliminer les cellules cancéreuses avant même qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes (Dunn 2006 ; Mittal 2014 ; Schreiber 2011).

Figure 8. Mutations, néoantigènes et immunogénéicité. L'apparition de types différents de mutations au cours de l'oncogenèse peut générer de nouvelles protéines ou séquences peptidiques (les néoantigènes)**. D'après Chen & Mellman 2017**



Dans le cas où ces tumeurs ne sont pas éliminées aura lieu l'étape suivante, l'équilibre, au cours de laquelle le système immunitaire adaptatif (essentiellement) empêche la croissance tumorale tout en façonnant l'immunogénéicité des cellules tumorales. Cette étape fait référence aux modifications dynamiques mises en œuvre par les cellules cancéreuses pour réguler négativement le système immunitaire avec l'objectif d'arrêter la phase d'élimination et d'atteindre l'équilibre. En effet, durant la phase d'équilibre, les différentes réponses immunitaires contre le cancer sont toujours actives ; les cellules immunitaires participent à la régulation et au contrôle de la croissance tumorale et du processus de dissémination à distance tout en gardant les cellules tumorales dans un état de dormance. C'est bien durant la période d'équilibre que le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules tumorales, favorisant ainsi l'émergence de clones faiblement immunogéniques (processus d'immuno-sélection) (Sengupta 2010 ; Ileana 2013). Cette phase est donc la plus longue du processus d'immuno-editing (Dunn 2004 ; Dunn 2006 ; Schreiber 2011).

Malgré la présence de ces différents mécanismes de contrôle modulés par le système immunitaire, l'hétérogénéité des clones et les variations génétiques possibles au sein des

cellules tumorales permettent l'acquisition, par ces mêmes cellules, de la capacité de détourner la reconnaissance et/ou la destruction par le système immunitaire et ainsi d'échapper à la phase d'équilibre pour disséminer et devenir délétère pour l'hôte (Dunn 2004 ; Dunn 2006 ; Schreiber 2011). Cet échappement peut être lié à plusieurs mécanismes d'immunosuppression favorisés, entre autre, par l'instabilité génétique associée à la cancérogénèse (Sengupta 2010 ; Ileana 2013).

Au niveau de la cellule tumorale, la reconnaissance immunitaire peut-être diminuée par la perte d'expression du CMH, la diminution de l'expression d'antigènes tumoraux et l'induction de voies anti-apoptotiques pour résister à la cytotoxicité (Dunn 2004 ; Dunn 2006 ; Schreiber 2011) (**Figure 9**). Trois profils immunitaires distincts en fonction des caractéristiques de la cellule tumorale mais aussi du microenvironement ont été recémment décrits (Kim & Chen 2016 ; Hedge & Wilson 2016 ; Herbst 2014 ; Chen & Mellman 2017) (**Figure 10**).

Figure 9. Le processus d'immuno-editing avec ces 3 phases : élimination, équilibre et échappement. Durant la phase d'élimination le système immunitaire utilise ses fonctions effectrices pour cibler et anéantir le cancer. Puis, une forme d'équilibre entre progression tumorale et élimination par le système immun est atteinte. Finalement, les cellules cancéreuses « accablent » les mécanismes de contrôle immunitaire, échappent à l'équilibre et progressent vers d'autres organes. **D'après Pandya 2016.**

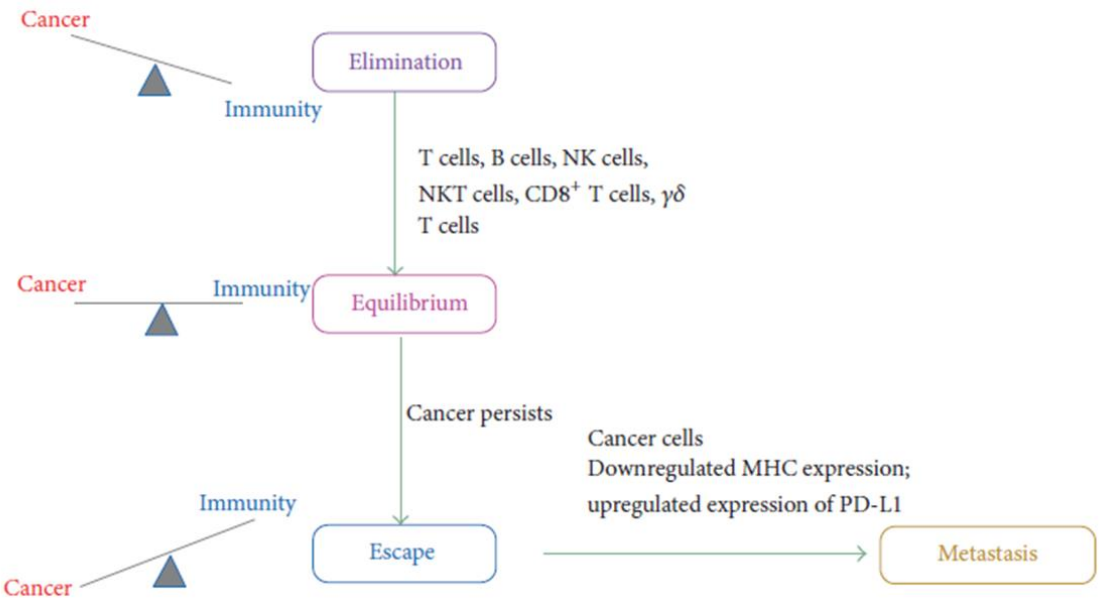
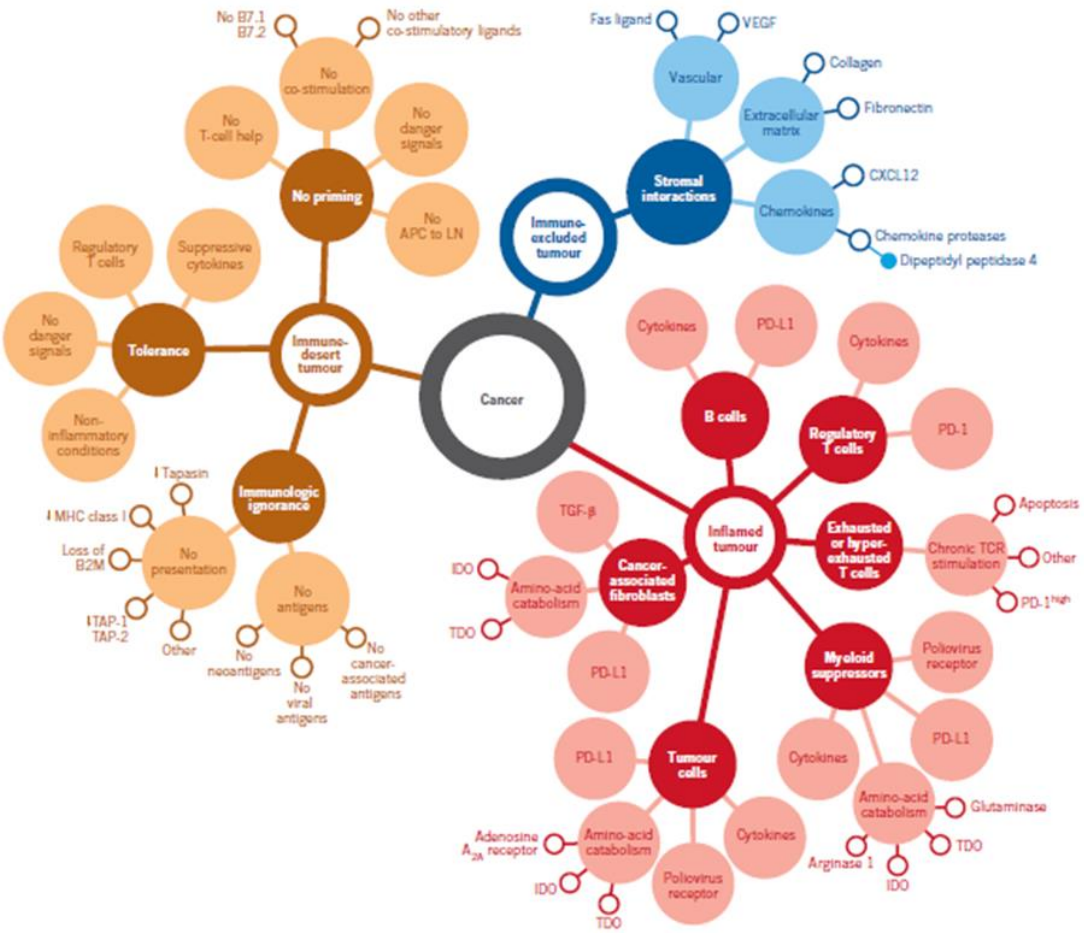


Figure 10. L'immunité antitumorale chez l'homme. L'immunité antitumorale chez l'homme peut être séparée en 3 phénotypes principaux : phénotype d'exclusion immunitaire (bleu), phénotype d'inflammation-immunitaire (rouge) et phénotype de désert immunitaire. **D'après Chen & Mellman 2017.**



Le premier profil correspondrait au phénotype d'exclusion immunitaire (« immune-excluded phenotype »). Dans ce profil, malgré la présence abondante de cellules immunitaires, ces dernières sont exclues du contact avec les cellules tumorales par la présence d'un stroma péri-tumoral dense. En effet, les cellules tumorales n'arrivent pas à pénétrer le parenchyme tumoral et restent « retenues » par la capsule tumorale (Vonderheide & Bayne 2013 ; Hedge & Wilson 2016 ; Herbst 2014 ; Joyce & Fearon 2015). La migration des cellules T à travers le stroma tumoral est donc le facteur limitant de l'action immunitaire pour ce phénotype tumoral qui correspondrait à l'ACP classique (pMMR). L'étude de Hiraoka et al. a montré la présence d'une infiltration inflammatoire riche en cellules T CD8+ dans des lésions

pancréatiques pré-malignes avec réduction progressive durant la progression tumorale (Hiraoka 2006) et donne support à cette dernière affirmation.

Le deuxième profil correspondrait au phénotype d'inflammation-immunitaire (immune-inflammed phenotype ») caractérisé par la présence, au sein du parenchyme tumoral, de cellules TCD4+ et TCD8+, souvent accompagnées de cellules myéloïdes et monocytaires. Ces cellules se localisent à la proximité de cellules tumorales (Herbst 2014 ; Gajewski 2015 ; Tumeh 2014 ; Fehrenbacher 2016 ; Rosenberg 2016). Les échantillons tumoraux peuvent exhiber en IHC l'expression de PD-L1 (Herbst 2014 ; Fehrenbacher 2016 ; Rosenberg 2016 ; Taube 2014). Aussi, l'analyse de mARN permet l'identification de la présence de cytokines pro-inflammatoires et de cytokines effectrices (Herbst 2014 ; Fehrenbacher 2016 ; Rosenberg 2016). Ce profil serait donc le résultat d'une réponse immunitaire anti-tumoral préexistante estompée par les mécanismes d'immunosuppression mis en action par la tumeur. Cela serait probablement une des explications à la réponse clinique aux thérapies anti-PD1/PD-L1 souvent observée chez ces patients (Herbst 2014 ; Tumeh 2014 ; Rosenberg 2016 ; Garon 2015). La corrélation de ce deuxième phénotype avec l'ACP dMMR/MSI nous paraît intéressante.

Le troisième profil serait corrélé au phénotype de désert immunitaire (« immune-desert phenotype ») et est caractérisé par la rareté de cellules T (Kim & Chen 2016 ; Herbst 2014). Quand bien même quelques cellules myéloïdes peuvent être présentes, ce phénotype est constitué essentiellement d'un microenvironnement tumoral sans inflammation avec l'absence ou rareté de cellules TCD8+ (Chen & Mellman 2017).

b) Les check-points immunologiques

La myriade d'altérations génétiques et épigénétiques caractéristiques de toutes formes de cancers offre un ensemble diversifié d'antigènes que le système immunitaire utilise pour distinguer les cellules tumorales des cellules normales (Pardoll 2012). Dans le cas particulier des cellules T, l'amplitude et la qualité de la réponse (qui est initiée par la reconnaissance antigénique par les TCR) est façonnée, voire régulée, par l'équilibre entre les signaux co-stimulateurs et les signaux inhibiteurs (ou checkpoints immunologiques) (Greenwald 2005 ; Zou & Chen 2008). Dans un contexte de réponse immune adaptative, ces nombreux facteurs de régulation peuvent participer à la progression ou à la régression du cancer (Pandya 2016).

En effet, pendant la formation de la structure antigène/CMH de classe II, deux signaux doivent être délivrés entre la CPA et le lymphocyte T : l'interaction du récepteur TCR avec le complexe antigène/CMH de classe II, et des signaux co-stimulateurs (Sharpe 2009). Si les signaux co-stimulateurs ne sont pas présents lors de l'activation des cellules T naïves, alors elles ne se différencieront pas ou ne proliféreront pas (Podojil & Miller 2009). Ainsi, l'absence d'un signal co-stimulateur approprié entraîne l'anergie des cellules T et une situation de tolérance immunitaire aux néoantigènes tumoraux. Dans ce scénario, l'immunité adaptative est bloquée et le cancer peut progresser (Crespo 2013). Un exemple est la tolérance immunitaire déclenchée par l'expression de l'immune checkpoint CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4) lors de la liaison des lymphocytes T aux protéines CD80/CD86 présentes sur les CPA (Podojil & Miller 2009 ; Sharpe 2009).

Un autre mécanisme important implique un récepteur de surface cellulaire présent sur les lymphocytes T et connu sous le nom de PD-1 (Programmed-cell Death). Ce dernier se lie à son ligand PD-L1 sur les CPA et induit l'immunosuppression (Podojil & Miller 2009). Il est important de signaler que l'expression de PD-1 a été rapportée en plusieurs autres types de cellules immunitaires telles que les cellules B, les cellules NK, les monocytes, les cellules dendritiques et les Tregs. Aussi, tout comme la protéine CTL-4, PD-1 peut être exprimée par divers types de cancers afin d'échapper au système immunitaire (Podojil & Miller 2009 ; Contardi 2005).

Dans des conditions physiologiques normales, les checkpoints immunitaires sont cruciaux pour le maintien de la tolérance de soi, c'est-à-dire la prévention d'une auto-immunité disproportionnée, et aussi pour protéger les tissus hôtes contre les dommages induits par le système immunitaire lorsqu'il répond à une infection.

Deux grandes familles de checkpoints immunologiques ont été identifiées : la superfamille des immunoglobulines (Ig) et la superfamille du récepteur TNF (TNFR) (Yao 2013). Le CTLA-4 et le PD-1 font partie des récepteurs de la superfamille des Ig. La famille des TNF récepteurs contient essentiellement des récepteurs co-activateurs. Ils interviennent dans la différenciation des lymphocytes T et B, la modulation de leurs fonctions effectrices et la formation des lymphocytes T mémoires (Ileana 2013).

Les mécanismes d'inhibition des différents checkpoints sont très divers. Les deux checkpoints immunitaires les plus étudiés dans le cadre des immunothérapies utilisées dans le traitement des cancers, à savoir CTLA-4 et PD-1, sont en effet des récepteurs d'inhibition qui régulent la réponse immunitaire à des niveaux différents et par des mécanismes différents (Pardoll 2012).

(1) CTL-4

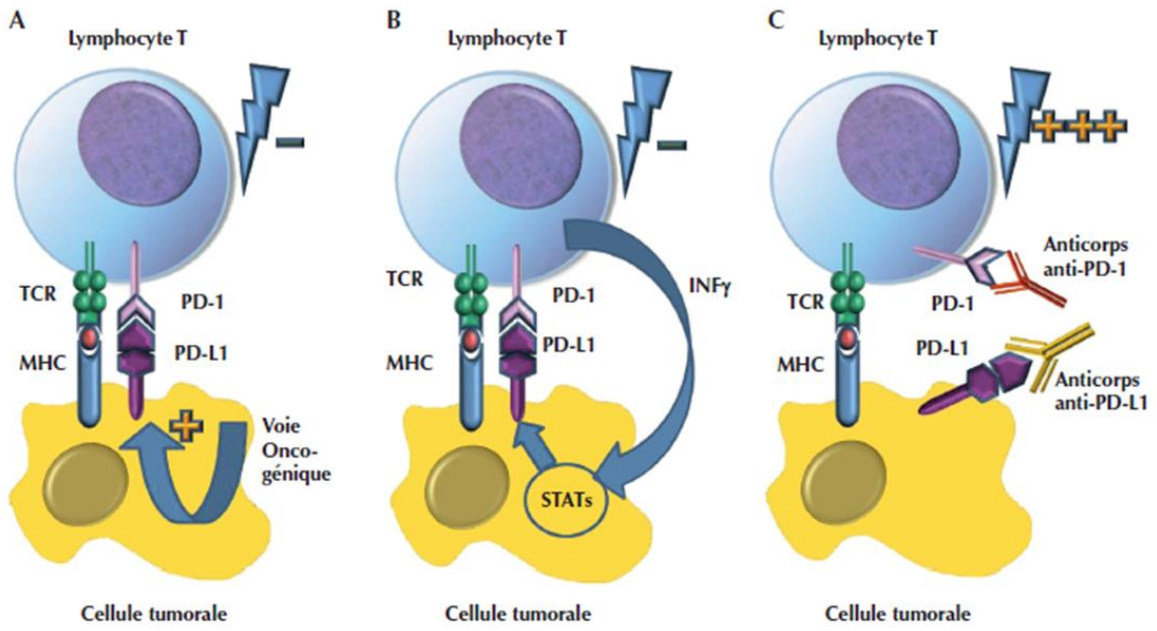
Le CTLA-4 est le premier récepteur des checkpoints immunologiques à avoir été ciblé. Il est exprimé uniquement à la surface des lymphocytes T où il régule l'amplitude des premières étapes de l'activation des cellules T. Le CTLA-4 contrebalance l'activité du CD28 qui est un co-récepteur activateur des lymphocytes T (Schwartz 1992 ; Rudd 2009). Pour que le CD28 active le lymphocyte T, il faut que celui-ci ait préalablement reconnu son antigène spécifique. Une fois que cette reconnaissance antigénique a lieu, le CD28 amplifie le signal d'activation du TCR ce qui aboutit à l'activation du lymphocyte T. Le CD28 et le CTLA-4 partagent les mêmes ligands : le CD80 (aussi connu sous le nom de B7.1) et le CD86 (aussi connu sous le nom de B7.2) (Freeman 1993 ; Azuma 1993; Linsley 1991). Même si les mécanismes exacts d'action du CTLA-4 ne sont pas complétement élucidés, il a été proposé que l'expression de CTLA-4 à la surface du lymphocyte T empêche son activation car le CTLA-4 a une affinité plus forte pour ces ligands que le CD28, ce qui aboutit à l'inhibition du lymphocyte T (Schneider 2006 ; Egen & Allison 2002; Parry 2005). Le CTLA-4 est exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ activés, mais également à la surface des lymphocytes T CD4+ helpers et régulateurs (Treg). Son action permet d'inhiber les lymphocytes T cytotoxiques et helpers et de renforcer l'activité immunosuppresive des Tregs. En revanche, les lymphocytes T naïfs et mémoires expriment à leur surface de grandes quantités de CD28 mais pas de CTLA-4 (Wing 2008 ; Peggs 2009 ; Ileana 2013).

(2) PD-1

Le PD-1 possède deux ligands identifiés : PD-L1 (aussi nommé B7-H1 et CD274) et PD-L2 (B7-DC et CD273) (Dong 1999 ; Latchman 2001 ; Tseng 2001). Contrairement au CTLA-4, le rôle de la voie PD-1 n'est pas d'intervenir à la phase initiale d'activation du lymphocyte T, mais plutôt de réguler dans les tissus les réponses inflammatoires liées aux cellules T effectrices et limiter l'auto-immunité (Freeman 2000 ; Keir 2006; Nishimura 1999 ; Okazaki & Honjo 2007 ;

Keir 2008). Les cellules T une fois activées vont augmenter l'expression de PD-1 ce qui permet de diminuer l'activation des lymphocytes T et donc de limiter les dommages collatéraux liés à une réponse immunitaire excessive (**Figures 11A** et **11B**). Ce mécanisme d'immunorésistance est aussi utilisé par les cellules tumorales pour échapper à l'action des lymphocytes. En effet, la cellule cancéreuse peut surexprimer les ligands du PD-1 que ce soit de façon induite par les signaux pro-inflammatoires produits lors de la réponse immunitaire antitumorale ou de façon innée via l'activation d'une voie de signalisation oncogénique (Ileana 2013).

Figure 11. Mécanisme d'expression des ligands du PD-L1 et mécanisme d'action des anticorps anti PD-1 et anti PD-L1. A. Résistance constitutive au système immunitaire : l'activation de voies de signalisations oncogéniques entraîne la surexpression de PD-L1 à la surface de la cellule tumorale et empêche l'activation lymphocytaire. **B.** Résistance acquise au système immunitaire: l'expression de PD-L1 est induite à la surface de la cellule tumorale par des signaux inflammatoires (IFN) produits par la réponse immunitaire antitumorale qui activent les facteurs de transcriptions STAT (Signal transducer and activator of transcription) et empêchent l'activation lymphocytaire. **C.** En bloquant le récepteur (PD-1) ou son ligand (PD-L1), les anticorps vont empêcher l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 et permettre l'activation du lymphocyte T. **D'après Ileana 2013.**



Par rapport à CTLA-4, PD-1 est exprimé sur un plus grand nombre de types de cellules immunitaires : il est induit non seulement sur les lymphocytes T, mais également sur les lymphocytes B et les cellules NK (Terme 2011 ; Fanoni 2011). Ainsi le blocage de PD-1 résulte en une activation potentiellement plus large de l'immunité antitumorale via l'action renforcée des lymphocytes T effecteurs et des cellules NK dans les tissus et l'environnement tumoral mais aussi via la production d'anticorps par les lymphocytes B (Velu 2009).

C'est l'observation que PD-1 soit exprimé de façon importante à la surface des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) de nombreux cancers et que les ligands de PD-1 soient souvent surexprimés à la surface de la cellule cancéreuse qui ont conduit à cibler la voie PD-1/PD-L1 (Dong 2002 ; Ileana 2013).

3. L'immunologie des tumeurs MSI

La déficience du système MMR induit un grand nombre d'évènements mutationnels. Les mutations frameshifts, tout comme les insertions et délétions, peuvent générer, à l'instar des mutations ponctuelles, de nouvelles protéines ou de nouvelles séquences de peptides encore plus immunogéniques du fait de leur divergence nucléotidique plus marquée (Chen & Mellman 2017) (**Figure 8**). Des expérimentations *in vitro* ont montré que les peptides dérivés des mutations frameshift des séquences cMS sont immunogéniques et provoquent une intense réponse régulée par les cellules T (Linnebacher 2001 ; Saeterdal 2001a ; Ripberger 2003). C'est en effet la découverte du phénotype dMMR/MSI qui a fourni l'évidence scientifique nécessaire pour confirmer le profil hypermutateur de certains cancers (Yamamoto 2003 ; Perucho 2003).

Bien qu'il soit maintenant connu que des antigènes exprimés dans un microenvironnement non-inflammatoire peuvent induire une tolérance immunitaire au lieu de déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale (Kammertoens & Blankenstein 2009), l'existence d'une réponse cellulaire T dirigée directement contre une pléthore d'antigènes dMMR-spécifiques a été démontré (Schwitalle 2008 ; Saeterdal 2001b) confirmant que des structures antigéniques sont générées à partir de mutations frameshifts de séquences codantes de

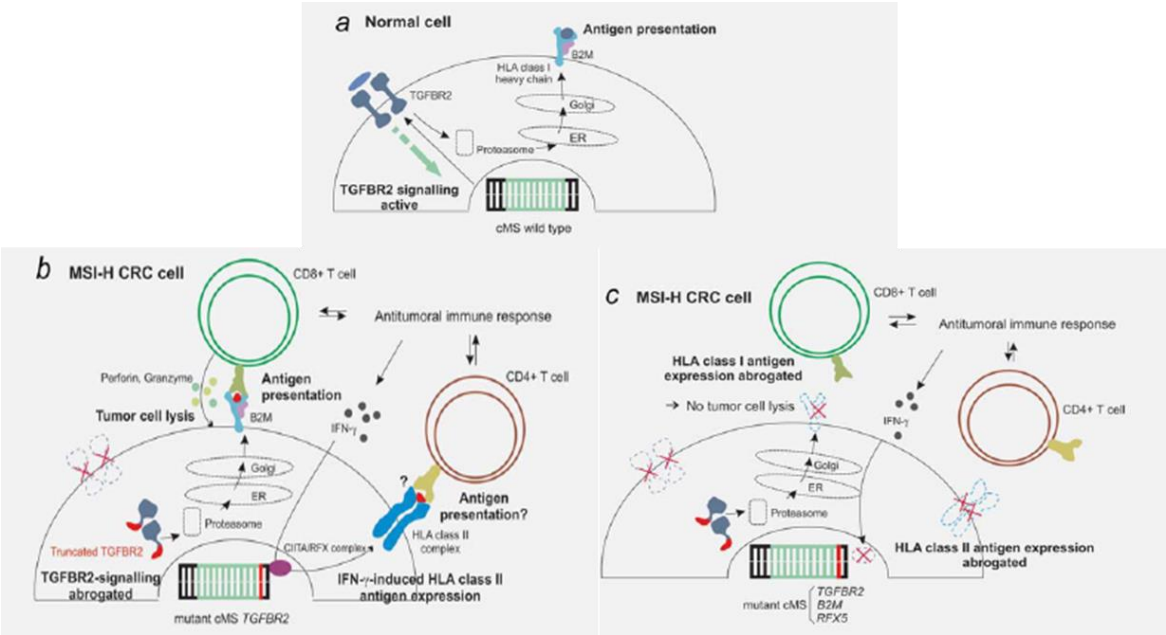
l'ADN en quantité suffisante pour déclencher une réponse cellulaire T antigène-spécifique (Kloor 2010).

Le principal mécanisme de déficience de la présentation antigénique par le CMH de classe I dans le CRC MSI correspond à des mutations affectant le cMS du gène *B2M* (beta2-microglobuline), qui sont retrouvées sur environ 30 à 60% des lésions (Yamamoto 2001b ; Cabrera 2003 ; Kloor 2005). Quand bien même la déficience du système MMR provoque une forte réponse immunitaire en induisant des mutations cMS (qui produisent ensuite des antigènes peptidiques), elle contribue à l'évasion immunitaire de la tumeur (suite, entre autres, à une inactivation du gène *B2M*) (**Figure 12**). En même temps que l'infiltration lymphocytaire prononcée observée dans les adénomes MSI (Meijer 2009), les mutations du gène *B2M* ont lieu durant les premiers stades de la tumorigénèse MSI (avec une fréquence de mutation décrite dans les adénomes MSI de 16% (Kloor 2007), suggérant un début précoce de la pression immunosélective (Kloor 2010).

Par ailleurs, l'environnement des cytokines rencontré dans les tumeurs MSI est essentiellement pro-inflammatoire et favorise la réponse Th1 au lieu de contribuer à une induction de la tolérance (Banerjea 2004 ; Alexander 2001). Cela veut dire qu'en même temps qu'elles facilitent le développement tumoral, les mutations cMS rendent, par elles-mêmes, la tumeur vulnérable à la reconnaissance et à la tentative de destruction par le système immunitaire (**Figure 12**).

Enfin, on peut dire que la croissance et la progression des cellules de cancer colorectal MSI se fait en présence d'une forte pression immunitaire anti-tumorale ce qui implique une adaptation et une sélection des cellules tumorales capables d'échapper au contrôle immunitaire.

Figure 12. Immunogénéicité et évasion immunitaire secondaires aux mutations de cMS. A. Schéma d'une cellule pMMR avec le processus de traitement d'antigène intègre et fonctionnel. Le système immunitaire est « tolérant » envers les peptides normaux présentés par le CMH de classe I. **B.** Schéma d'une cellule dMMR avec TGFβR2 mutant mais présence d'un processus de traitement d'antigène intègre. Les neoantigènes dérivés des mutations frameshifts (rouge) présentent un potentiel immunogénique et peuvent inciter une réponse immunitaire antitumorale. Aussi, de façon subséquente la libération d'IFNɣ induit la synthèse de CIITA et en conséquence l'hyperrégulation de l'expression d'antigènes du CMH de classe II. **C.** Schéma d'une cellule dMMR avec TGFβR2 mutant et altération de la fonction du processus de traitement d'antigène. Comme conséquence de la pression de sélection immunitaire qui résulte de la présentation de neoantigènes tumoraux par les CMH, les cellules dMMR qui ont acquis de défauts dans la présentation (intermédiée par le CMH) des neoantigènes sont sélectionnées durant le développement tumoral. Les mutations frameshift intéressant les cMS des gènes *B2M*, *CIITA* ou *RFX5* peuvent avoir comme conséquence l'abrogation complète de la présentation antigénique par le CMH. **D'après Kammertoens & Blankenstein 2009.**



a) Différences entre les cancers MSI sporadiques et héréditaires (SL)

Les CCR MSI associées au SL semblent être plus densément infiltrées par les TIL par rapport aux CCR MSI sporadiques (Shia 2003). Une explication possible des différents degrés d'infiltration par les TIL serait liée à la pathogénie moléculaire différente entre les CCR MSI sporadiques et héréditaires. Tandis que les CCR MSI sporadiques se développent sur la base de la méthylation du promoteur du gène *MLH1* dans les cellules somatiques, les CCR MSI associées au syndrome de Lynch acquièrent une déficience du système MMR en raison d'une mutation germinale d'un allèle des gènes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*) et d'un second « hit » somatique dans l'autre allèle (Lynch & de la Chapelle 1999). Ainsi, chez les patients atteints du syndrome de Lynch, la prédisposition génétique présente dans toutes les cellules de l'organisme pourrait contribuer à une réponse immunitaire plus prononcée due à la pré-sensibilisation du système immunitaire envers des antigènes induits par la déficience MMR. Cela pourrait être le résultat d'épisodes d'« haploinsufficiency » transitoire (condition qui survient lorsque le phénotype normal nécessite le produit protéique des deux allèles, et la réduction de 50% de la fonction génétique résulte en un phénotype anormal) ou de l'apparition répétée de cellules dMMR qui n'évoluent pas vers de tumeurs détectables (Alazzouzi 2005). Cette hypothèse qui correspondrait à une sorte « d'autovaccination » est corroborée par la découverte d'une prévalence importante des cellules T spécifiques aux peptides dérivés de mutations frameshift détectées chez les patients atteints du SL mais qui n'ont pas développé de tumeurs détectables (Schwitalle 2008). Dans le contexte décrit ci-dessus, il est concevable que les tumeurs MSI associées au SL subissent un long processus d'immunosélection pendant le développement tumoral (Kloor 2010). Aussi, les mutations du gène *B2M* sont plus fréquentes dans les cas MSI héréditaires par rapport aux CCR MSI sporadiques (Kloor 2007 ; Dierssen 2007). Prises ensemble, ces observations suggèrent que les cancers associés au SL représentent un sous-groupe de cancers MSI où la surveillance immunitaire influence le développement de la tumeur à un stade très précoce (Kloor 2010).

4. Immunothérapie

Une des approches thérapeutiques prometteuses développée durant ces dernières années consiste à activer la réponse immunitaire antitumorale en bloquant les checkpoints immunologiques (Pardoll 2012). Or, une grande partie des ces check-points immunologiques se fait grâce à des interactions ligand-récepteur permettant d'utiliser des anticorps monoclonaux pour les bloquer ou moduler.

Le CTLA-4 est le premier récepteur des checkpoints immunologiques à avoir été ciblé. Les premiers essais cliniques d'anti-CTLA-4 chez l'homme ont été réalisés dans les années 2000 avec deux molécules : l'ipilimumab et le tremelimumab (Phan 2003 ; Ribas 2005 ; Hodi 2003). Toutes les deux sont des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le CTLA-4. La toxicité observée est essentiellement liée à l'auto-immunité induite. Après une étude convaincante (Hodi 2010) l'ipilimumab a été approuvé par la FDA en mars 2011 pour le traitement des mélanomes avancés et métastatiques et par l'EMA en juillet 2011. Un élément surprenant chez certains patients répondeurs est la durée de la réponse : 18 % des patients traités par ipilimumab étaient vivants à 2 ans du traitement. Cette réponse persistante, malgré la fin du traitement, suggère que ces nouvelles immunothérapies permettent de rééduquer le système immunitaire et de maintenir un contrôle antitumoral durable (Ileana 2013).

Autre récepteur des checkpoints immunologiques, le PD-1, apparaît comme une cible prometteuse (**Figure 11C**). La première étude de phase 1 conduite par Brahmer et al. a été réalisée avec un anticorps IgG anti PD1, le Nivolumab (BMS-936558), administré toutes les deux semaines (Brahmer 2010). Cette première étude a mis en évidence des réponses objectives dans différents types tumoraux : CCR, rénal, pulmonaire et mélanome. Le suivi des patients répondeurs a montré, comme observé avec les anti-CTLA4, que les réponses observées sous anti-PD-1 sont durables. En effet, la plupart des patients présentant une réponse objective continue d'être en rémission à un an.

Plusieurs autres anticorps pour un blocage de PD-1/PD-L1 ont été développés et cette approche est testée dans de nombreux essais cliniques en monothérapie, ou en association avec une chimiothérapie, une radiothérapie, ou bien même d'autres types d'immunothérapie (Topalian 2015 ; Jiang & Zou 2015 ; Ma 2016a). Des taux de réponse

objective remarquables ont été observés pour le mélanome avancé, les tumeurs rénales à cellules claires, le cancer de la vessie et le cancer du poumon à petites cellules (Topalian 2015 ; Ma 2016b).

En résumé, la modulation du système immunitaire peut intervenir au moment de l'initiation de la réponse (avec un anti-CTLA4) ou lors de l'activation lymphocytaire (avec un anti-PD1/PDL-1 par exemple). Aussi, d'autres ligands et récepteurs impliqués dans les checkpoints immunologiques ont été identifiés. Cela ouvre la perspective de thérapies ciblant à différents niveaux ces imune checkpoints afin de stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, durable et avec une toxicité acceptable. Contrairement aux anticorps monoclonaux classiques qui neutralisent directement la protéine exprimée par la cellule tumorale, les traitements immunomodulateurs agissent indirectement en modulant la réponse immunitaire antitumorale.

Le 23 mai 2017 l'agence américaine de régulation des médicaments FDA a, pour la première fois dans son histoire, autorisé l'utilisation d'un traitement anti-cancéreux en fonction de sa signature moléculaire et non en fonction de l'organe atteint. L'efficacité et la sécurité du pembrolizumab (Keytruda®) a été étudiée chez les patients MSI ou dMMR. Au total, il a été analysé le résultat du traitement pour 15 types différents de cancer, chez 149 patients inclus en 5 études différents. Les types de cancers principalement étudiés ont été le CCR, le cancer de l'endomètre et les cancers digestifs non-colorectaux. C'est le pourcentage de patients avec une réponse complète ou partielle et la durée de la réponse qui a incité l'agence à valider avec une rapidité sans précédent ce traitement. Parmi les 149 patients, 39.6% ont eu une réponse partielle ou complète et chez 78% d'entre eux la réponse était toujours présente au-delà des 6 premiers mois (https://www.fda.gov/).

Au total, ces nouvelles immunothérapies vont probablement révolutionner la prise en charge des cancers. Elles commencent à être évaluées dans de nombreux cancers et au-delà même du potentiel thérapeutique espéré, l'étude détaillée de la réponse immunitaire chez les patients répondeurs permettra peut-être de mieux comprendre quels sont les acteurs essentiels pour une réponse immunitaire anti-tumorale efficace et de mieux intégrer les immunothérapies dans la stratégie de prise en charge.

a) Immunothérapie et cancer du pancréas

L'observation de la maladie chez l'homme et la modélisation murine du cancer du pancréas ont suggéré que ce type de cancer est presque invariablement associé à une importante infiltration inflammatoire pouvant avoir des influences divergentes sur la progression de la maladie, en empêchant la croissance du cancer par une réponse immunitaire tumoricide antigène-spécifique dépendante ou en favorisant la progression tumorale à travers l'induction d'une suppression immunitaire (Guo 2017). En effet, le cancer du pancréas est considéré comme une tumeur riche en cellules T, à l'instar du cancer colorectal MSI. Alors même que les réponses immunes innée et adaptative sont présentes, le cancer du pancréas lui-même induit un dysfonctionnement immunitaire local et systémique afin d'éviter l'éradication tumorale par les cellules immunitaires effectrices (Chang 2016).

L'environnement immunitaire de l'ACP peut être considéré comme étant particulièrement hostile (Chau 2017). Celui-ci est en effet caractérisé par i) une faible quantité intratumorale de cellules TCD8+ cytotoxiques effectrices ; ii) un programme inflammatoire déterminé par l'oncogène RAS; iii) l'action des cellules TCD3+ préférentiellement à la marge tumorale ; et iv) la présence d'une quantité excessive de leucocytes immunosuppresseurs dans le microenvironnement tumoral (Kunk 2016). Dans une récente analyse conjointe du TCGA et de l'ICGC (International Cancer Genome Consortium) il a été retrouvé que dans l'adénocarcinome pancréatique les cellules T sont présentes mais inactives (Bailey 2016). Cela veut dire que malgré la présence d'un infiltrat lymphocytaire tumoral robuste, les signatures d'une activation des cellules T étaient absentes. Par ailleurs, contrairement aux autres types de tumeurs, la charge mutationnelle élevée dans l'adénocarcinome pancréatique était inversement liée à l'activité des cellules T (Bailey 2016).

Les cellules cancéreuses pancréatiques expriment également des ligands des checkpoints immunologiques, comme le PD-L1, ce qui constitue encore un autre mécanisme à travers duquel les cellules effectrices sont supprimées (Basso 2013).

Les premiers essais cliniques avec tentative de blocage des checkpoints immunologiques en utilisant des agents anti-CTLA-4 ou anti-PD-1/anti-PD-L1 ont été globalement décevants (Brahmer 2012 ; Winograd 2015; Royal 2010). Dans une étude de phase 1 utilisant un anticorps anti-PD-L1, aucune réponse n'a été observée chez les 14 patients porteurs d'adénocarcinome pancréatique (Le 2013). En outre, dans une étude de phase II avec

l'ipilimumab en 23 patients en situation métastatique, aucune réponse objective n'a été observée (Royal 2010).

Cependant, une étude de phase II (NCT01876511) présentée l'année dernière à l'ASCO sur l'utilisation d'un anti-PD-1 (pembrolizumab) chez les patients porteurs d'un cancer MSI/dMMR non-colorectal avancé a montré un résultat très significatif. L'étude a inclus dix-sept patients avec des tumeurs primitives diverses au stade métastatique : péri-ampullaire (N=4), pancréas (N=4), biliaire (N=3), grêle (N=3), estomac (N=3). Le taux de réponse objective était de 50% (Le 2016). Cette même étude a été poursuivie et les résultats concernant 86 patients (dont 78 évalués) ont été publiés en juin de cette année. Les taux de réponse objective, complète, et de stabilité de la maladie ont été respectivement de 53%, 21%, et 77%. Concernant uniquement les adénocarcinomes pancréatiques, 8 (9%) patients ont été inclus dans cette étude. Les taux de réponse objective et de stabilité de la maladie ont été de 62% et 75% respectivement et sont superposables à ceux observés pour le CCR (Le 2017).

II. RESULTATS

L'article ici présenté est la version modifiée après les commentaires des reviseurs et les suggestions de l'éditeur de *Gastroenterology*.

PREVALENCE OF MICROSATELLITE INSTABILITY IN INTRADUCTAL PAPILLARY MUCINOUS NEOPLASMS OF THE PANCREAS

Short title: MSI AND PANCREATIC DUCTAL CANCER

Lupinacci RM[1,2,3,#], Goloudina A[1,4#], Buhard O[1], Bachet JB[2,5], Maréchal R[6], Demetter P[7], Cros J[8,9], Bardier-Dupas A[10], Collura A[1,2], Cervera P[1,2,11], Scriva A[11], Dumont S[2], Hammel P[9,12], Sauvanet A[9,13], Louvet C[14], Delpéro J-R[15], Paye F[2,16], Vaillant J-C[2,17], André T[2,18], Closset J[6], Emile J-F[19], Van Laethem J-L[6], Jonchère V[1], Abd Alsamad I[20], Antoine M[2,21], Rodenas A[2,21], Fléjou JF[1,2,11], Dusetti N[22], Iovanna J[22], **Duval A[1,2*£], Svrcek M[1,2,11*£]**

[1] INSERM, UMR S 938 – Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe « Instabilité des Microsatellites et Cancers », Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012, Paris, France;

[2] Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Paris, France;

[3] Groupe Hospitalier Diaconesses – Croix Saint-Simon, Service de Chirurgie Digestive, Viscérale et Endocrinienne;

[4] Inovarion F – 75013, Paris, France;

[5] AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Hépato-Gastro-Entérologie, Paris, France;

[6] Department of Gastroenterology and Digestive Oncology, Erasme Hospital, Brussels, Belgium;

[7] Department of Pathology, Erasme Hospital, Brussels, Belgium;

[8] AP-HP, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, , hôpital Beaujon, Clichy, France;

[9] Université Paris Diderot – Paris 7, Paris, France;

[10] AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;

[11] AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;

[12] AP-HP, Hôpital Beaujon, Department of Gastroenterology, Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif (PMAD), Clichy, France;

[13] AP-HP, Hôpital Beaujon, Department of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, Pôle des Maladies de l'Appareil Digestif (PMAD), Clichy, France;

[14] Department of Oncology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France;

[15] Department of Digestive Surgical Oncology, Paoli Calmettes Institute, Comprehensive Cancer Centre, Marseille, France;
[16] AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Saint-Antoine, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Paris, France;
[17] AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Chirurgie Digestive et Hépato-bilio-pancréatique, Paris, France;
[18] Department of Oncology, Hôpital Saint Antoine, Paris, France;
[19] EA4340 and Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, , hôpital Ambroise Paré, AP-HP and Versailles University, Boulogne, France;
[20] Hôpital Intercommunal de Créteil, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Créteil, France ;
[21] AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Tenon, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;
[22] Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS UMR 7258, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Aix-Marseille Université and Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

[#] Equal contribution, co-first authors

* Equal contribution, co-last authors

Grant support: This work was supported by the Ligue Contre le Cancer. AD group has the label de « La Ligue Contre le Cancer ». This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (to A.D; PRTK 14056).

Abbreviations: CTL, cytotoxic T-cell lymphocyte; DFS, disease-free survival; dMMR, mismatch repair deficiency; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; ICK, immune checkpoint; IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasms; LS, Lynch syndrome; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stable; OS, overall survival; PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasms; PCR, polymerase chain reaction; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; PDX, patient-derived xenografts; TMA, tissue microarray

£ **Corresponding authors:** Magali Svrcek and Alex Duval

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 49 28 21 79 and +33 1 49 28 66 80 ; Fax: +33 1 49 28 28 78

Email: magali.svrcek@aphp.fr

alex.duval@inserm.fr

Disclosures: The authors have no conflicts of interest to declare.

Author Contributions: RML (study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); **AG** (collection, analysis and interpretation of data; revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); **OB** (analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); **JBB** (conception of the study; collection and assembly of data; approval of the final version of the manuscript;); **RM** (collection and assembly of data; approval of the final version of the manuscript); **PD**, **JC**, **AB-D**, **PC**, **AS**, **CL**, **JRD**, **FP**, **JCV**, **TA**, **JFE**, **JLVL, VJ** (revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); **PC**, **IS**, **IAA, MA** (generation, analysis and interpretation of data; approval of the final version of the manuscript); **AS** and **SD** (collection of data, approval of the final version of the manuscript); **JFF** (analysis of data; approval of the final version of the manuscript); **ND** and **JI** (generation, collection and assembly of data; approval of the final version of the manuscript); **AD** (conception and design of the study; analysis and interpretation of data; revision of the manuscript; approval of the final version of the manuscript); **MS** (conception and design of the study; generation, analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; approval of the final version of the manuscript).

ABSTRACT

Microsatellite instability (MSI) occurs at a low frequency in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), being associated with response to immune checkpoint (ICK) inhibitors in metastatic tumors including PDAC. Here, by investigating a large series of PDACs for MSI (n=445), this phenotype (1.6%) was found to be more common in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN)-associated PDACs (4/58, 6.9%) compared to non-IPMN PDAC (5/385, 1.3%. *P*=.02). PDACs with MSI harbored immunogenic mutations, a trend for increased density of CD8 T-cells at the invasive front (*P*=.08) and higher levels of PD-L1 expression (*P*=.05). These findings could improve the identification and treatment of MSI PDAC.

Keywords: Pancreatic cancer; Microsatellite Instability; Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm; Immunohistochemistry; Immune checkpoint; Lynch syndrome.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a leading cause of cancer mortality worldwide [1]. PDACs are derived from two precursor lesions: pancreatic intraepithelial neoplasms (PanIN) and intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) [2]. Approximately 30% of resected IPMN have an associated invasive carcinoma. Amongst the molecular abnormalities described in PDAC is the MicroSatellite Instability (MSI) phenotype due to a defective DNA Mismatch Repair (dMMR) system (see **Supplementary Table 1** for review). The MSI phenotype was first described in the familial cancer condition known as Lynch syndrome (LS), where the MMR genes *MLH1, MSH2, MSH6* or *PMS2* harbor germline mutations. It is also observed in sporadic cancers due to epigenetic methylation of the *MLH1* promoter [3]. In PDAC, Humphris et *al*. recently identified dMMR/MSI in 1% of tumors [4].

The MSI-driven cancer pathway leads to the synthesis of aberrant and potentially immunogenic neo-antigens by the tumor cells. A likely consequence is that MSI tumors become highly infiltrated with CD8+ cytotoxic T-cell lymphocytes (CTLs). Recent studies have highlighted the concomitant expression of multiple active immune checkpoint (ICK) markers including PD-1 and PD-L1 [5]. The emergence of immunotherapy with ICK inhibitors has recently constituted a source of personalized treatment for MSI cancer patients [6] and support the evaluation of MSI phenotype in PDAC. In the present study we examined the prevalence of dMMR/MSI in a large, retrospective and multicentric series of PDACs and compared the clinical and biological features of pancreatic tumors with or without MSI.

Overall, a total of 428 cases derived from an initial multicentric series of 602 cases of resected PDAC available (see **Supplementary Methods** for further information about this cohort) gave interpretable results by immunohistochemistry (IHC) and were considered for the study (**Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 2**), including 41 (9.57%) IPMN-associated PDAC (**Supplementary Table 3**). Among these cases, 363 showed clear expression of all 4 MMR proteins, whereas 56 showed possible loss of expression of one or more MMR proteins. The latter were further tested using full-face sections, whereupon it was concluded that 6 samples showed a clear dMMR profile, one remained uncertain and the

other 49 were MMR proficient (**Supplementary Figure 2A**). Multiplex PCR was then performed to test for MSI in PDACs that were clearly dMMR or that displayed an uncertain dMMR status identified. This was carried out successfully in only 37 samples, with the remaining 19 samples having insufficient DNA quality and/or quantity following extraction from the paraffin-embedded tissue samples. PCR analysis identified one additional MSI case that was previously classified as having an uncertain MMR status. However, MSI was detected in only 3 of the 6 dMMR tumor samples identified by IHC, presumably due to the high degree of contamination of the samples with stromal cells (**Supplementary Figure 2A**). Thus, the dMMR/MSI phenotype was present in 7 PDACs (7/428, 1.6%). Six of these 7 cases were dMMR as revealed by IHC, but only 3/7 cases showed concordant dMMR and MSI status. This frequency was confirmed by Multiplex (pentaplex and HSP110 T17) PCR in an additional non-overlapping independent patient-derived PDAC xenografts series (1/68, 1.5%) (**Supplementary Figure 2A**).

Because a trend was observed for dMMR/MSI PDACs to arise in the setting of IPMNs (2/41 IPMNs *vs*. 5/385 non-IPMNs; Fisher's exact test, *P*=.14), we next further evaluate this putative association, the expression of MMR proteins being tested on full face sections of an independent, monocentric series of 17 IPMN-associated PDACs (**Supplementary Table 4)**. Of these 17 IPMN-related tumors, 2 (11.7%) were shown to be dMMR **(Supplementary Figure 2A)**. Due to the strong contamination of these samples with stromal cells, the MSI status was confirmed by PCR (Pentaplex and HT17 PCR) in only one case **(Supplementary Figure 2A)**. Taking into account these additional results, we therefore observed a significantly higher frequency of dMMR/MSI in IPMN-associated PDACs (4/58, 6.9%) compared to non-IPMN PDAC (5/385, 1.3%; Fisher's exact test, *P*=.02) **(Table 1).** Three of the 4 dMMR/MSI IPMN-associated PDACs exhibited loss of MMR protein expression both in the dysplastic and carcinomatous components. Concerning the fourth patient, no dysplastic component (corresponding to IPMN) was present so that it was not possible to conclude on its MMR status by IHC (data not shown and **Table 2**).

Overall, amongst the 8 tumors that displayed dMMR by IHC, MLH1 deficiency was observed in 4 cases, MSH2 deficiency in 3 cases and MSH6 deficiency in one case. Methylation of the *MLH1* promoter was not found in any of the 4 MLH1 deficient cases. Review of the clinical data available for 8 patients was suggestive of LS in 3 cases, based on the Revised Bethesda Criteria (**Table 2**). Of notice, the DFS and OS of dMMR/MSI patients was not significantly different to that of pMMR/MSS patients (*P*=.703 and *P*=.663, respectively) (**Supplementary Table 5**). Survival analysis among IPMN patients (n=58) showed no differences in survival between dMMR/MSI (n=4) and pMMR/MSS patients (*P*=.272 and *P*=.448, for DFS and OS respectively). Sixteen target genes containing repeat sequences in their coding DNA were analyzed for somatic mutations in 4 MSI PDAC samples for which DNA was available (**Supplementary Figure 2B** and **Supplementary Methods)**. Seven of these genes were altered in this small series (**Supplementary Figure 2C**) including recurrent frameshift mutations in *MBD4* that are rarely observed in other MSI primary tumors. Positive PD-L1 immunostaining in tumoral cells was observed in 8/9 MSI PDAC compared to 4/10 MSS PDAC (*P*=.05) **(Supplementary Figure 3A and 3B**; see also our analysis of PD-L1 in MSI/MSS PDA cell lines in **Supplementary Figure 3C**). In contrast, no difference was observed for PD-L1 immunostaining in immune cells between MSI and MSS PDAC (*P*=0.58, Fisher's exact test; data not shown). The pattern of PD-L1 expression was heterogeneous, both in tumour and inflammatory cells, being either focalized or diffuse in positive samples (data not shown). Finally, MSI PDAC also showed a higher density of CD8 T-cells at the invasive front compared to MSS PDAC (*P*=.08) (Supplementary **Figure 3D and 3E**). CD8 positive immune infiltrates were usually observed both at the invasive front and intra-tumoral compartments, with however a reinforcement of both these stainings at the invasive front when compared to intra-tumoral compartment (data not shown).

In this study, our results confirm the dMMR/MSI phenotype is rare in PDAC (1.6%), in line with data from a recent multi-omic platform study [4]. In addition, we demonstrate a statistically significant positive association between dMMR/MSI and IPMNs in PDAC. This

phenotype occurs in about 7% of IPMNs, thus accounting for around half of all dMMR/MSI cases in PDAC. Our results also indicate that dMMR was likely to occur early in IPMN, *e.g.* already in dysplastic lesions, in line with its initiating role in tumor development. dMMR/MSI PDACs, including IPMN-related PDACs, showed Lynch-related features. In addition, the relationship between IPMN and LS has been already reported [7,8]. However, because we have no information concerning the presence of germline MMR defects, our results do not allow us to conclude definitively on this association. Based on our findings, we recommend systematic screening of PDACs for dMMR/MSI using IHC, and obviously in IPMN-related cases. We also propose to send patients with dMMR/MSI PDAC, especially in the setting of IPMN, for genetic counseling. Finally, in the present study we also found a positive association between PD-L1 expression and MMR status in PDAC samples, similar to observations in other primary tumor types that display dMMR/MSI [9]. Systematic screening of PDACs for dMMR/MSI using IHC will allow to further establish whether this phenotype could be a predictive factor for positive response to ICK blockade treatment in PDAC.

REFERENCES

1. Ferlay J et al. Int J Cancer 2015; 136:E359-386.
2. Hruban RH et al. Am J Surg Pathol 2001; 25:579-586.
3. Veigl ML et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:8698-8702.
4. Humphris JL et al. Gastroenterology 2017; 152:68-74.
5. Llosa NJ et al. Cancer Discov 2015; 5:43-51.
6. Le DT et al. Science 2017;357:409-413.
7. Sparr JA et al. Am J Surg Pathol 2009; 33:309-312.
8. Flanagan MR et al. World J Gastroenterol 2015; 21:2820-2825.
9. Ma C et al. Am J Surg Pathol 2016; 40: 1496-1506.
10. Maréchal R et al. Gastroenterology 2012; 143:664-674.
11. Delpero JR et al. HPB (Oxford) 2014; 16:20-33.
12. Molejon MI et al. Oncotarget 2015; 6:7408-7423.

13. Buhard O et al. J Med Genet 2016; 53: 377-384.

14. Svrcek M et al. J Clin Oncol 2007; 25:4231-4238.

15. Dahlin AM et al. Mod Pathol 2011; 24:671-682.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Flowchart of patients evaluated in this study.

Supplementary Figure 2: (A) dMMR and/or MSI (dMMR/MSI) identified in primary PDACs, patient-derived xenograft and single centre IPMN-associated PDACs cohort. For patients 1, 4, 5 and PSA09, and for the xenograft, cases are referred to as MLH1/PMS2 deficient. For patients 2, 3 and 6, cases are referred to as MSH2/MSH6 deficient. For patient PSA01, the case is referred to as MSH6 deficient. For patient 7, uncertain expression of MSH2 and MSH6 in tumor cells (x200 magnification) was observed. This case displayed MSI both by Pentaplex and HSP110 T17 PCR testing; (B) Target gene frameshift mutations in dMMR/MSI PDAC, with corresponding profiles (C).

Supplementary Figure 3: (A) Schematic representation of PD-L1 immunostaining. A significant association was observed for higher levels of PD-L1 expression in MSI PDAC (*P*=.05). (B) Examples of PD-L1 positive (a) and negative (b) cases (x100 magnification); (C) Flow cytometry analysis with PD-L1, PD-L2, Galectin-3 and B7-H3 in cell lines; (D) Schematic representation of CD3+ and CD8+ cell densities at the invasive front and in the intra-tumoral compartment; (E) T-cell distribution in tumor-associated immune infiltrates: H&E stain (a and c) and a representative example of PDAC (with MSI phenotype) with highly abundant occurrence of CD8+ cells both at the invasive front (b); a representative example of PDAC (with MSS phenotype) with sporadic CD8+ cells at the invasive front (x100 magnification). T: tumor; IF: invasive front.

Table 1. Patient's Clinical Characteristics Comparison in Function of dMMR/MSI Status (pooled multicentric retrospective cohort and Saint-Antoine's IPMN-associated PDACs cohort)

Characteristics (n)	pMMR/MSS	dMMR/MSI	P value*
Age (445) median, range	63,04 (34-85,6)	69,94 (50,4-87,6)	.059
Sex (444)			.180
male	251	3	
female	184	6	
Tumor size (mm) (430)			.494
≥30mm	253	4	
<30mm	168	5	
Lymph nodes (440)			.056
Negative, N0	320	4	
Positive, N+	111	5	
Recurrence (444)			.743
yes	284	5	
no	151	4	
IPMN (443)			**.020**
yes	54	4	
no	380	5	

* T-test, Chi^2 or Fisher's exact text when appropriate

Table 2. Patients' Characteristics (dMMR/MSI pancreatic tumors)

Patient	Age	Sex	IPMN-associated PDAC	Revised Bethesda Guidelines	Size (mm)	UICC (6th ed.)	Surgical Margins	Recurrence	Dead	DFS (months)	OS (months)	Histology	Lost MMR protein	MLH1	Biomolecular analysis
1	74	female	no	no	60	pT3N1	R0	local	yes	11	15	PDAC	MLH1/PMS2	U	MSS
2	**68**	**female**	**yes**	**yes[a]**	**10**	**pT2N0**	**R0**	**no**	**no**	**26**	**26**	**PDAC**	**MSH2/MSH6***	**ND**	**MSI (pentaplex and HT17)**
3	68	male	no	no	35	pT3N0	R0	local	yes	21	21	PDAC	MSH2/MSH6	ND	unsuccessful amplification
4	**70**	**female**	**no**	**yes[b]**	**25**	**pT2N1**	**R0**	**distal**	**yes**	**9**	**16**	**PDAC**	**MLH1/PMS2**	**U**	**MSS**
5	88	male	no	no	90	pT3N0	R0	no	no	8	35	Medullary carcinoma	MLH1/PMS2	U	MSI (pentaplex and HT17)
6	72	female	yes	NA	20	pT1N1	R0	no	no	22	22	PDAC	MSH2/MSH6	ND	MSI (HT17)
7	50	male	no	no	30	pT3N1	R0	local	no	25	25	PDAC	doubtful (MSH2/MSH6)	ND	MSI (pentaplex and HT17)
PSA01	**83**	**female**	**yes**	**yes[c]**	**is**	**pTisN0**	**R0**	**no**	**no**	**26**	**26**	**In situ adenocarcinoma**	**MSH6***	**ND**	**MSI (HT17)**
PSA09	56	female	yes	no	10	pT3N0	R0	local + distal	yes	9	27	Mucinous adenocarcinoma	MLH1/PMS2*	U	MSS

NA: not available; ND: not done ; U: unmethylated; is: in situ

[a] personal history of urothelial cancer, breast cancer, and endometrial cancer (<50 years)

[b] family history: grand-father: rectal cancer; father : pancreatic cancer; sister: breast cancer; brother: several colonic adenomatous polyps (<50 years)

[c] personal history of colonic polyps; and family history: grand-father: colon cancer; uncle: colon cancer; aunt: colon cancer; brother1: colon cancer; brother2: colon cancer; sister: endometrial cancer.

* For these three dMMR IPMN-associated PDACs, loss of MMR protein expression was observed both in the dysplastic and carcinomatous components.

Supplementary methods

Patient Cohorts and Tumor Samples

This study was approved by the institutional review boards/ethics committees of the participating centers. Informed consent was recorded in each case. Patient selection, clinicopathological data and demographic information have been described previously [10]. Briefly, we included patients from three different cohorts. The first cohort comprised a retrospective series of patients with primary PDAC who underwent curative surgical resection between September 1996 and August 2009 in five European university centers with high volume and expertise in pancreatic cancer management [10]. Subjects were excluded if they had underwent preoperative treatment (chemotherapy or radiotherapy), macroscopically incomplete resection (R2), or had tumor histology other than ductal adenocarcinoma. The second cohort included patients from a prospective French multicenter study (NCT00918853) which determined the impact of a standardized pathological protocol on resection margin status after pancreatico-duodenectomy for PDAC [11]. Patients were enrolled between August 2008 and May 2010. Exclusion criteria included R2 resections, non-ductal adenocarcinoma, and margin analysis performed without using the predefined criteria. An aggregated clinical database (referred to as the “Multicentric Retrospective Cohort”) was created with standardized clinicopathological variables including sex, age at diagnosis, tumor site, type of operative procedure, tumor stage according to the Union for International Cancer Control, TNM classification, and maximal tumor size. The third cohort was comprised of 17 consecutive patients operated at the Saint-Antoine Hospital for IPMN-associated PDAC from 1998 to 2015 and is referred to as the “Monocentric IPMN Cohort”.

Patient-derived xenograft (PDX) mouse model

In addition to clinical tumor samples, DNA samples from 68 human PDAC xenografts were available for dMMR/MSI testing. These xenografted tumors were all derived from samplesthat were not included in the formalin-fixed, paraffin-embedded tumor specimens (FFPE) cohorts. In brief, two types of samples were included in the PDX cohort as previously

described 12: endoscopic ultrasound - guided fine - needle aspiration (EUS - FNA) biopsies from patients with unresectable tumors and tumor tissue samples from patients undergoing surgery. All the samples were anonymized, and postsurgical anatomopathology reports were provided. Histopathologic evaluation was performed on 5 - µm hematoxylin and eosin stained sections of patient tumors and xenografts and examined under a light microscope. These sections were compared with the original human tumor when available. Tumor specimens (100 mm^3) from resected PDAC patients were then mixed with Matrigel (BD Biosciences) and implanted subcutaneously on the upper right flank of 5- to 6-week-old nude mice (Swiss Nude Mouse Crl: NU(lco)-Foxn1nu, Charles River Laboratories). Tumor size and body weights of all animals were measured weekly. When tumors reached 1 cm^3, the mice were sacrificed and tumors removed. Mice were cared for and manipulated in accordance with National and European legislation on animal experimentation. The experimental design was approved by the Aix-Marseille University Institutional Animal Care and Use Committee (CE2A-14).

Construction and Processing of Tissue Microarrays and Determination of Tumor MMR status Using Immunohistochemistry

Tissue microarrays (TMA) were constructed from 0.6-mm diameter tissue cores obtained from (FFPE tumor specimens. A total of 602 cases of resected PDAC (collected from the Multicentric Retrospective Cohort) were placed into 21 TMA blocks, with each tumor represented by 3–5 cores. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was performed on each TMA slide to confirm the presence of tumor tissue.

PDACs are usually inflamed and highly contaminated with stromal cells. MSI testing by PCR has poor sensitivity in this context and hence we first screened for dMMR in these tumors using IHC. Assessment for loss of expression of the 4 MMR proteins (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2) in tumor tissue is a more appropriate method in these conditions [13].

The expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 was assessed as described previously [14]. The cores were independently examined by at least three observers (RML, MS,

J-FF) who were blinded to both clinicopathological and outcome data for the patients. Samples showing clear loss of MMR protein expression or uncertain MMR expression (defined by less intense expression in tumor cells compared to normal epithelial cells or controls) in the TMAs were further tested by IHC using full face sections. These slides were reviewed by two experienced pathologists (MS and J-FF).

MSI Testing

PCR was used to screen for MSI only in samples that were suspected to be MMR-deficient by IHC or that displayed an uncertain dMMR status. PCR was also used to screen the additional series of PDACs derived from PDXs, since these were clear of any human contaminating inflammatory cells.

MSI Using Pentaplex PCR

The same paraffin blocks were used for DNA extractions and for IHC analyses. DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded neoplastic tissue that had been macrodissected with reference to the H&E–stained section. DNA was extracted after deparaffinization by treatment with sodium dodecyl sulfate–proteinase K and phenol-chloroform-isoamyl alcohol. To evaluate MSI, 5 quasimonomorphic mononucleotide markers (BAT-25, BAT- 26, NR-21, NR-22, and NR-24) were coamplified in a single pentaplex PCR mix (mononucleotide repeat pentaplex [MRP] assay) and then analyzed for amplicon size in an automated DNA sequencer [13]. Because the date of fixation and the treatment and conservation of tissues were highly variable due to the different origins of paraffin-embedded tissues, it was not always possible to amplify all markers, particularly the longer ones. Samples in which results were available for only one or two of the 5 markers were considered as uninterpretable. For all other samples, tumors showing instability at two or more markers were defined as MSI, whereas those with instability at only one marker or showing no instability were defined as microsatellite stable (MSS).

MSI Testing Using HSP110 T17 PCR

HT17 status was determined as previously published [13]. Briefly, PCR products were run on an ABI 3100 Genetic Analyzer with GS400HD ROX size standard and POP-7 polymer (Applied Biosystems). GeneMapper (V4.0) software (Applied Biosystems) was used to analyze the HT17 traces. HT17 traces were considered to be acceptable when the amplitudes of the major peaks were between 100 and 6000 fluorescence units. Height ratios between peaks were also calculated, especially between T14 and T16 (R1) and between T15 and T16 (R2). The HT17 DNA repeat is remarkably monomorphic, with the size of normal alleles ranging from 145 bp (T16) to 147 bp (T18). Tumors were classified as MSI when the extent of stuttering by Taq polymerase observed for HT17 was ≥2bp, or when the height ratios between the T14 and T15 stutter peaks and the T16 peak in germline DNA exceeded 0.15 (R1) and/or 0.5 (R2).

Determination of MLH1 promoter methylation

The DNA methylation pattern of the *MLH1* promoter region was determined by methylation-specific PCR of bisulfite-treated DNA (1 µg) [14]. This was performed only for cases that showed loss of MLH1 protein expression by IHC.

Mutation analysis at target genes for MSI

Sixteen genes containing repeat sequences were chosen for study because they are either frequent targets for MSI-driven mutations in MSI tumors, or because they play key roles in the maintenance of genome integrity (*ACVR2A, ATR, BAX, BLM, CBF2, CDX2, GRB14, GRK4, IGF2R, MBD4, MSH3, MSH6, RAD50, RECQL, TCF7L2* and *TGFBR2*). PCR was performed with primers specific for each selected target gene (sequences available upon request).

Characterization of PD-L1 staining and characterization of T cells in immune infiltrates in MSI PDAC and controls

An IHC study using antibodies to CD3, CD8 and PD-L1 was performed on MSI PDAC (n=9) and on a series of MSS PDAC controls (n=10). For PD-L1, slides were incubated with the clone SP263 (Ventana) on unstained tissue sections (4 µm) using the Ventana

Benchmark Ultra platform automated stainer according to the manufacturers' recommendations. Positive PD-L1 expression was defined as any membranous staining, in either tumor cells or infiltrating inflammatory cells. The percentage of tumor cells demonstrating membranous PD-L1 staining was also scored in 5% increments [9].

T cells in the tumor-associated immune infiltrates were assessed by semi-quantitative estimation of CD3-positive (CD3: Thermo Scientific, clone SP7, 1:300 dilution) and CD8-positive (CD8: DAKO, clone C8/144B, 1:30 dilution) cell densities. They were scored as follows: 0, no positive cells; 1, scattered positive cells; 2, moderate number of positive cells; 3, abundant occurrence of positive cells. In each tumor, the density of T-cell infiltration was examined at the invasive front (cells localized in stroma adjacent to the invasive tumor margin) and in the intra-tumoral compartment [15].

Cell lines

Primary PDAC cell lines (3 MSS cell lines: 01.001, B-TIM and L-IPS; and 1 MSI cell line: 01.004) were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 5% NuSerum, ITS+ (Corning), PSA, BPE, EGF, nicotinamide, glucose, gentamicin, T3, dexamethasone and cholera toxin (Sigma).

For flow cytometry analysis, cells were blocked in 5% BSA in PBS, then stained with corresponding antibodies and analyzed by a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). FlowJo Software (TreeStar, Ashland, USA) was used for data analysis.

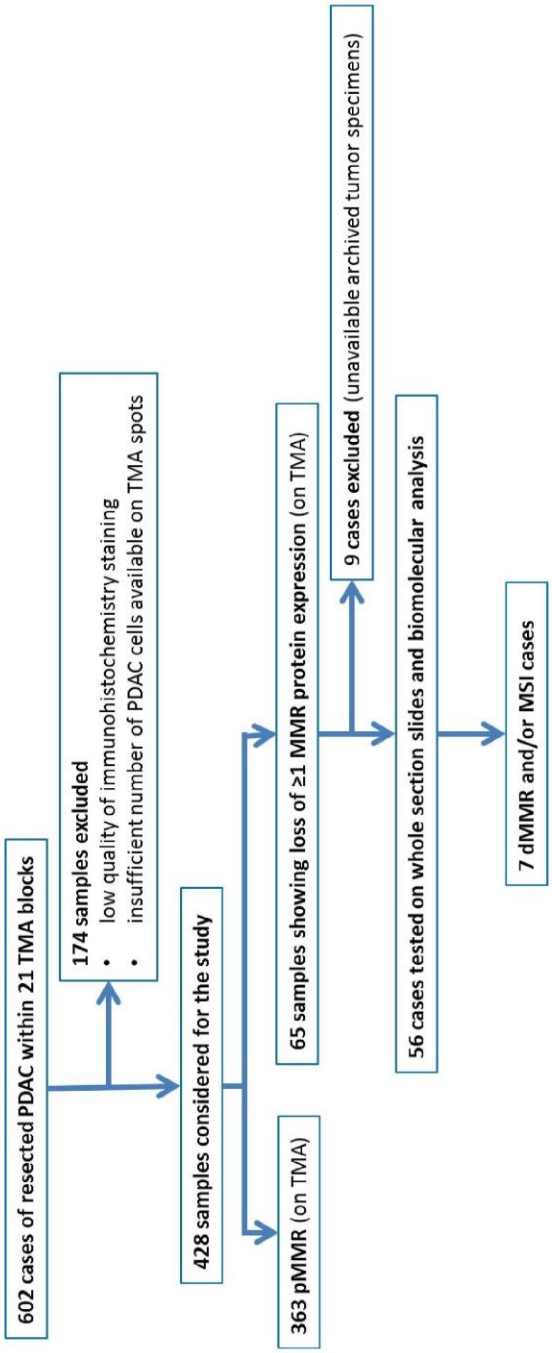
For flow cytometry analysis the following antibodies were used: Gal-3 FITC mouse anti-human clone 9M1-3, PD-L2 PE mouse anti-human clone 24F.10C12 and B7-H3 PE mouse anti-human clone DCN.70 (all from BioLegend). PD-L1 FITC mouse anti-human clone MIH1 was purchased from BD Pharmingen.

Statistical Analysis

Descriptive statistical analysis used χ^2 tests and *t* tests. Two-by-two table contingency analyses were performed using a two-tailed Fisher's exact test because some numerical values were less than five. A *P* value of <0.05 was considered significant. Overall survival

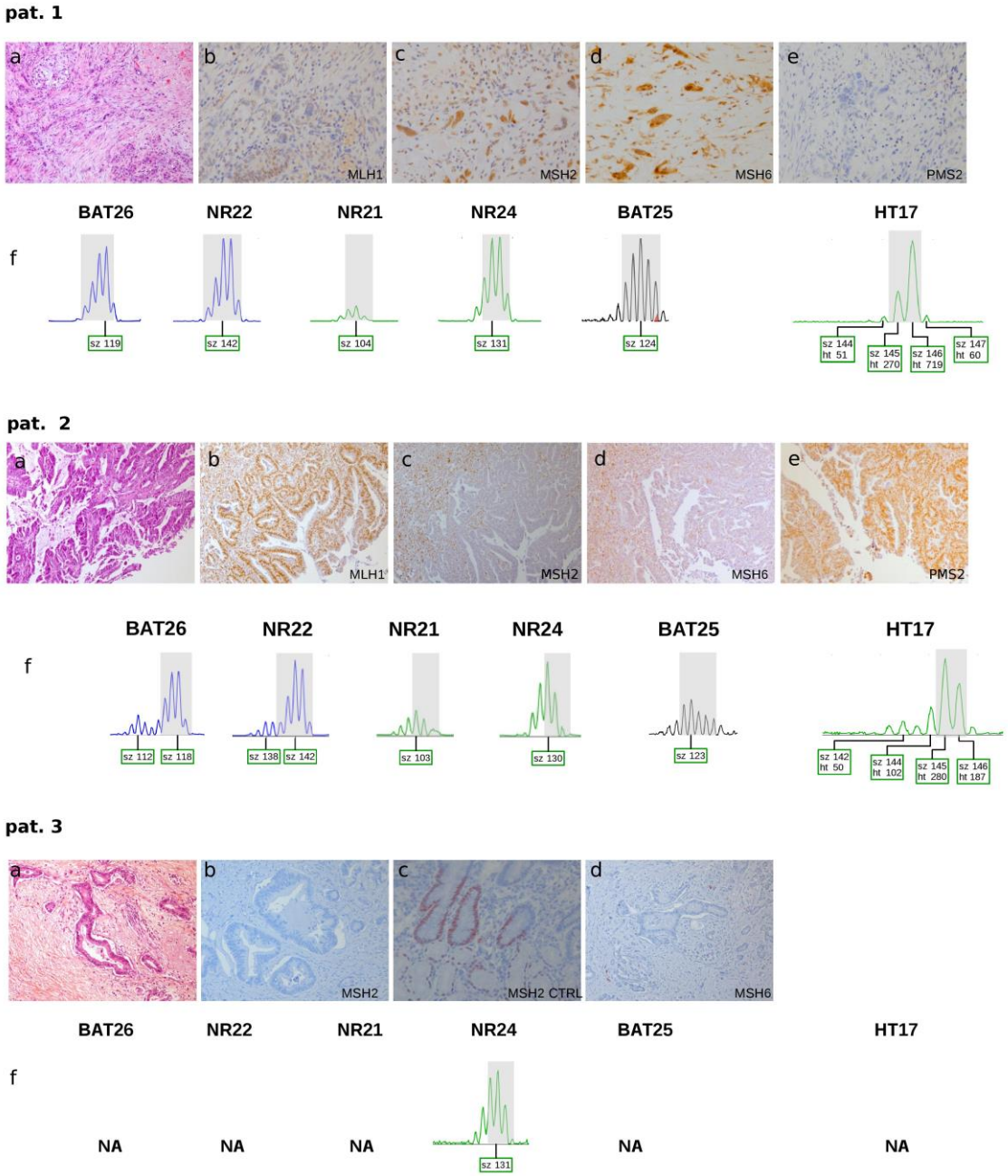
was measured from the date of surgery to the date of death (all causes). Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier technique and compared using the log-rank test. For each test, statistical significance was set at a two-sided P value of <0.05. Statistical analyses were performed using SPSS 20 software.

Supplementary Figure 1.

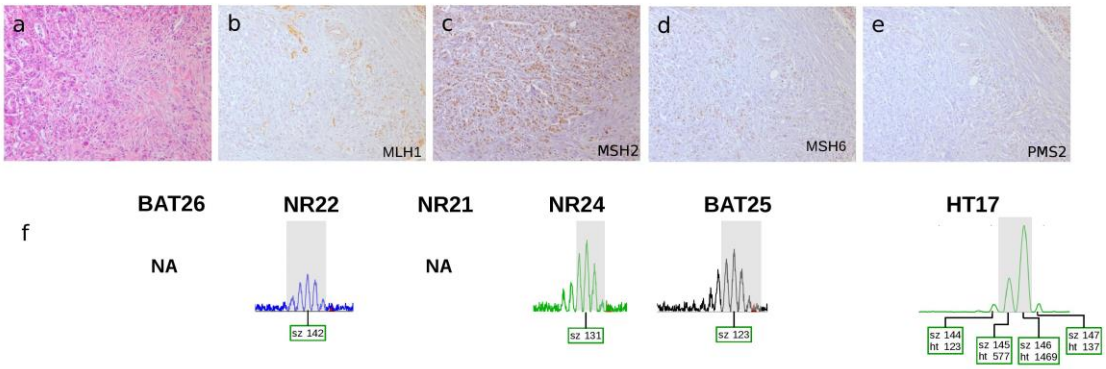


Supplementary Figure 2.

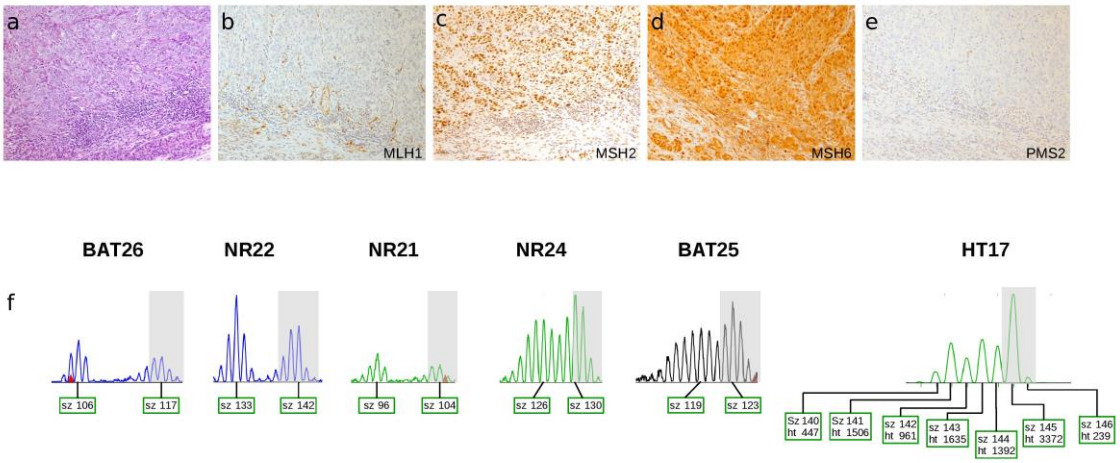
A



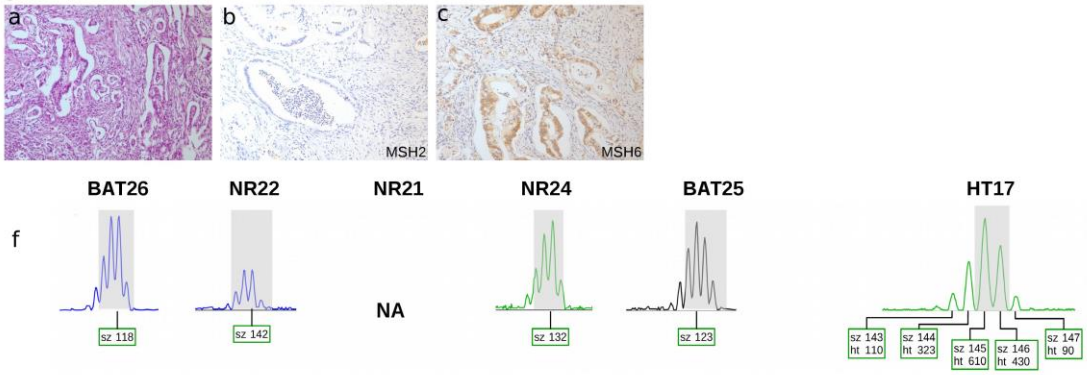
pat. 4



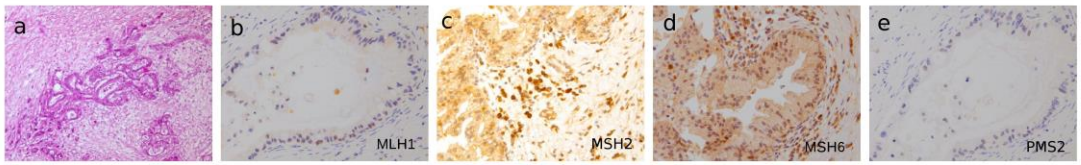
pat. 5

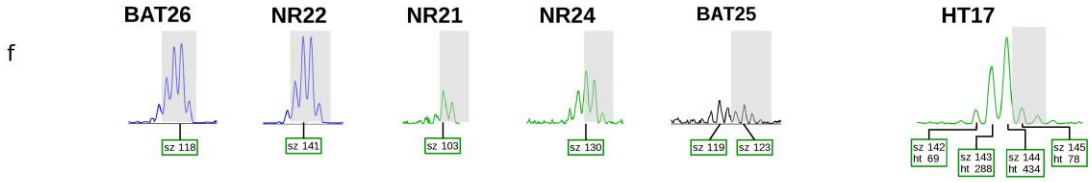


pat. 6

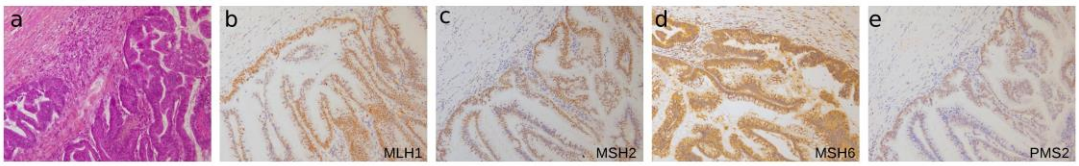


pat. 7



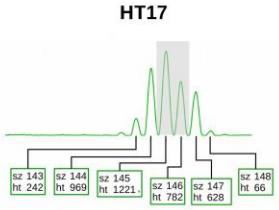


PSA01

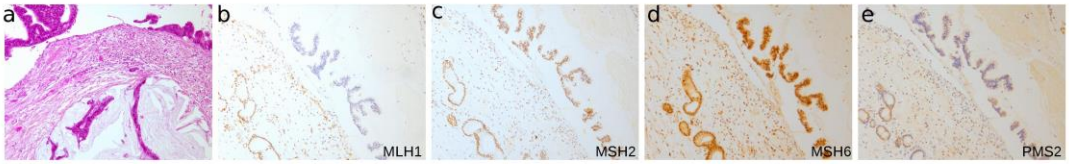


f

No data available for pentaplex

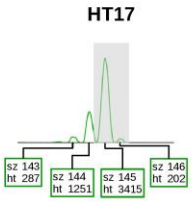


PSA09

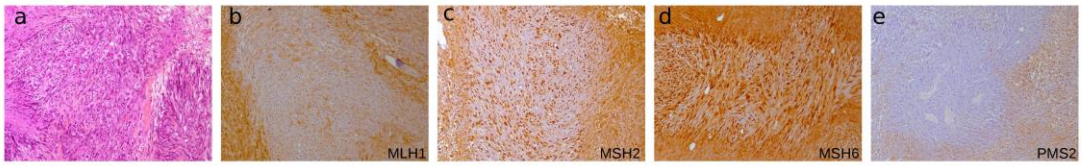


f

No data available for pentaplex

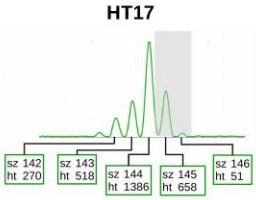


PX 1

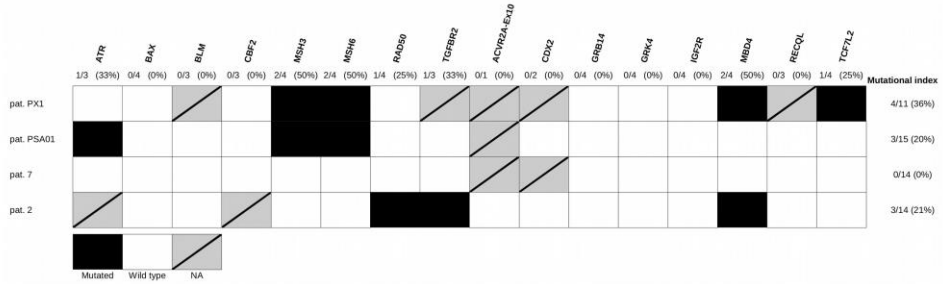


f

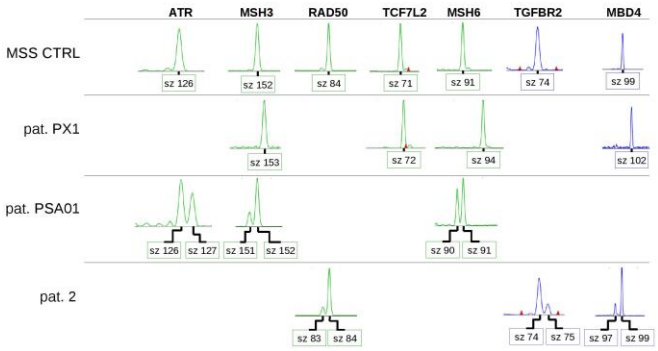
No data available for pentaplex



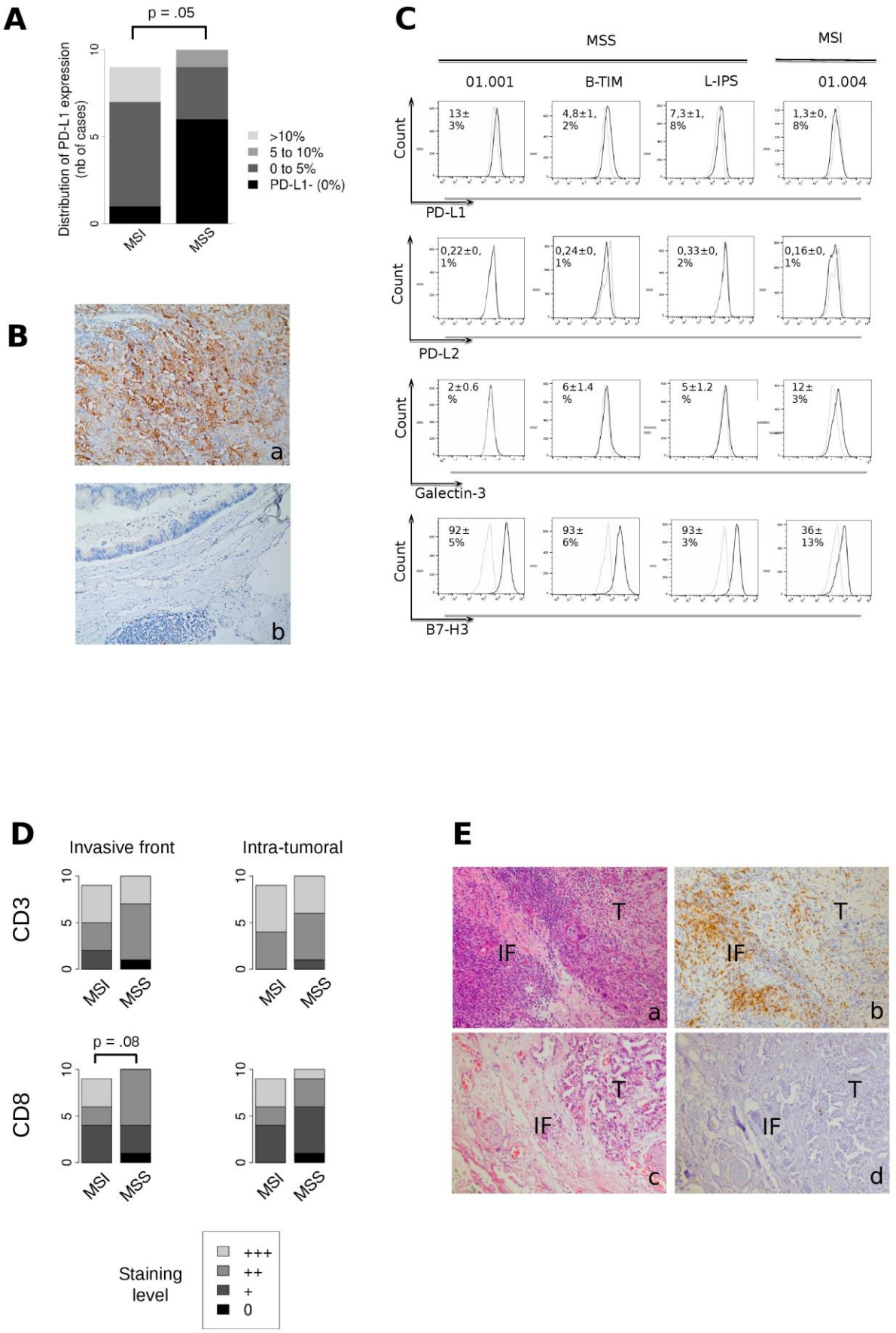
B



C



Supplementary Figure 3.



Reference	Country	Type	n	MSI-H and/or MMRd n(%)	NCI panel included[a]	Markers used		MSI-H cutoff	MMR protein IHC (markers used)	MMR protein IHC n	Survival analysis
						MN[b]	total				
Abe T, 1996 [1]	Japan	pancreatic carcinoma[c]	44	7 (15.9%)[d]	No	0	5	≥2[d]	No	---	Not performed
Venkatasubbarao K, 1998 [2]	USA	pancreatic carcinoma[c]	14	4 (28.6%)[d]	No	0	6	≥2[d]	No	---	Not performed
Ouyang H, 1997 [3] Ouyang H, 1998 [4]	Japan	pancreatic carcinoma[c]	60	9 (15%)[d]	No	0	5	≥2[d]	No	---	Not performed
Goggins M, 1998 5	USA	PDAC	82	3 (3.7%)[d]	No	1	6	≥2[d]	No	---	Not performed
Ghimenti C, 1999 [6]	Italy	pancreatic carcinoma[c]	21	0 (0%)[e]	No	0	10	≥40%	No	---	---
Wilentz RE, 2000 [7]	USA & Netherlands	medullary pancreatic carcinoma[f,g]	18[g]	4 (22.2%)[g]	No	3	3	≥2[d]	MLH1[g, h] MSH2	4/4 MLH1[i]	Not performed
Ueki T, 2000 [8]	USA	pancreatic adenocarcinoma[c]	36[j]	4 (11.1%)[j]	No	Not stated	Not stated	Not stated	No	No	Not performed
Yamamoto H, 2001 [9]	Japan	pancreatic carcinoma[c]	100 & 3LS	13/100 (13%) 3/3 (100%)	Yes	2	5	≥2	No[k]	No	Not performed
Abraham SC, 2002 [10]	USA	ACC	13	1 (7.7%)[l]	Yes	2	5	≥2	No	No	Not performed
Nakata B, 2002 [11]	Japan	pancreatic carcinoma[c]	46	8 (17.4%)	No	0	8	≥3	No	No	*MSI patients had significantly longer survival*
Tomaszewska R, 2003 [12]	Poland	pancreatic carcinoma[c]	30	0 (0%)	---	---	---	---	MLH1[h] MSH2	0	---

Lüttges J, 2003 [13]	Germany	pancreatic carcinoma[m]	23	1 (4.3%)	Yes	2	5	≥2	MLH1[h] MSH2, MSH6	1/23 MLH1[m]	Not performed
Nakata B, 2003 [14]	Japan	pancreatic carcinoma[c]	55	4 (7.2%)	---	---	---	---	MLH1[h] MSH2	4/55 MSH2[n]	*median survival time of hMSH2-neg patients was longer*
Maple JT, 2005 [15]	USA	pancreatic carcinoma[c,o]	35[o]	3 (8.6%)[o]	No	5	10	≥30%	MLH1[h] MSH2 MSH6	3/35 2/3 MLH1 1/3 MSH2	Not performed
Fujii K, 2009 [16]	Japan	PDAC[p]	21	0 (0%)	No	0	5	Not stated	No	---	---
Laghi L, 2012 [17]	Italy & Germany	PDAC[q]	338	1 (0.3%)	No	5	5	Not stated[q]	MLH1[h,r] MSH2	1/182	Not performed
Ottenhof NA, 2012 [18]	Netherlands	PDAC	78	9 (12.8%) if we consider loss of expression ≥ 1 MMR protein[s]	---	---	---	---	MLH1[h] MSH2 MSH6 PMS2	2/78 MSH2 2/78 MSH2/MSH6 1/78 MLH/PMS2 5/78 PMS2	Not performed
Liu W, 2014 [19]	USA	ACC and mixed-ACC	36[v]	5 (13.8%)[t]	---	---	---	---	MLH1[h] MSH2 MSH6 PMS2	2/36 MSH2/MSH6 2/36 MLH1/PMS2[t] 1/36 MSH6[t]	*Loss of MMR proteins did not correlate with survival*
Mitsuhashi K, 2015 [20]	Japan	PDAC	283	0 (0%)	No	2	2	Not stated	---	---	---

Riazy M, 2015 [21]	Canada	PDAC[u]	265[x]	41 (15.4%)[u]	---	---	---	---	MLH1[h] MSH2 MSH6 PMS2	64% MSH2/MSH6 29% MLH1/PMS2 5% MSH2 2% MLH1/MSH2/ PMS2	*No survival difference but MMRd had no survival advantage from gemcitabine or 5-FU adjuvant chemotherapy*

Supplementary Table 1: Literature review of the frequency of MSI in pancreatic cancers.

This table summarises main and recent studies with a focus on larger series (>10 patients) that were investigated for MSI and/or MMRd. This table is not intended to be a comprehensive list of all available literature on MSI or MMR in pancreatic carcinoma

[a] Studies that included the NCI panel used at least the following microsatellite markers: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250.

[b] Unless otherwise indicated mononucleotide markers included any of : BAT-25, BAT-26, BAT-34C4, BAT-40, TGFßRII, NR-21, NR-22, NR- 24, NR-27, MONO-27, and MYCL.

[c] Pancreatic carcinoma non specified otherwise.

[d] Only microsatellite instability was reported (MSI-H was not specifically defined).

[e] 14/21 with low unstable phenotype (≤40% markers).

[f] Series of medullary pancreatic carcinomas, 3 of the 4 MSI tumors were previously reported by Goggins M, *et al*.

[g] Also included 77 pancreatic carcinomas. None (0/77) of them were MSI nor MMRd.

[h] Loss of expression was defined as total absence of staining in tumor cells.

[i] MSH2 (0,0%).

[j] Thirty-five pancreatic cancer xenografts and 1 primary carcinoma; 3 of the 4 MSI tumors were previously reported by Goggins M, *et al*.

[k] IHC not performed (immunoblotting for MLH1 expression “hardly detectable” in 5/10 sporadic MSI-H cases & negative in 3/3 LS cases).

[l] Series of acinar cell pancreatic carcinoma; 2/13 were MSI-low with allelic shifts only in one marker.

[m] Series of 12 PDAC, 3 IPMN-associated adenocarcinoma and 8 mucinous noncystic carcinomas; the MSI case was unstable at all NCI markers and showed loss of hMLH1 expression on IHC (MSH2 and MSH6 status unclear).

[n] One tumor (1.8%) was considered hMLH1 negative and also demonstrated hMSH2 hegative staining.

[o] Defined population of long term survivors (>3 years) of pancreatic carcinoma; 2/3 MMRd were MSI-high, the third could not be tested.

[p] All tumors were PDAC with the exception of one mucinous noncystic carcinoma.
[q] Only 1/338 was a medullary pancreatic carcinoma that was the single MSI case; it was unstable at all markers tested, remaining 337 cases were stable at all 5 markers tests.
[r] IHC for MLH1 and MSH2 were tested in 182 patienst. The MSI patient also showed loss of MLH1 expression.
[s] Data obtained after personal contact with the senior author. MMRd were most probably 3/78 (2 MSH2/MSH6 and 1 MLH1/PMS2).
[t] The MSH6 deficient case and ½ MSH2/MSH6 deficient case had a known history of LS.
[u] 2/41 MMRd patients presented medullary-like features on histology.

MSI, microsattelite instable; MMR, mismatch repair; MN, mononucleotide marker; NCI, National Cancer Institute, PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; ACC, acinar cell pancreatic carcinoma

1. Abe T, Ouyang H, Migita T, et al. The somatic mutation frequency of the transforming growth factor beta receptor type II gene varies widely among different cancers with microsatellite instability. Eur J Surg Oncol 1996; 22(5):474-477.
2. Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Swiderski C, et al. Novel mutations in the polyadenine tract of the transforming growth factor beta type II receptor gene are found in a subpopulation of human pancreatic adenocarcinomas. Genes Chromosomes Cancer 1998; 22(2):138-144.
3. Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, et al. The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. Cancer Res 1997; 57(10):1851-1854.
4. Ouyang H, Furukawa T, Abe T, et al. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. Clin Cancer Res 1998; 4(4):1071-1074.
5. Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, et al. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. Am J Pathol 1998; 152(6):1501-1507.
6. Ghimenti C, Tannergård P, Wahlberg S, et al. Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. Br J Cancer 1999; 80(1-2):11-16.
7. Wilentz RE, Goggins M, Redston M, et al. Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. Am J Pathol 2000; 156(5):1641-1651.
8. Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 2000; 60(7):1835-1839.
9. Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, et al. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. Cancer Res 2001; 61(7):3139-3144.
10. Abraham SC, Wu TT, Hruban RH, et al. Genetic and immunohistochemical analysis of pancreatic acinar cell carcinoma: frequent allelic loss on chromosome 11p and alterations in the APC/beta-catenin pathway. Am J Pathol 2002; 160(3):953-962.
11. Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, et al. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2002; 8(8):2536-2540.

12. Tomaszewska R, Okoń K, Stachura J. Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. Pol J Pathol 2003; 54(1):31-37.
13. Lüttges J, Beyser K, Pust S, et al. Pancreatic mucinous noncystic (colloid) carcinomas and intraductal papillary mucinous carcinomas are usually microsatellite stable. Mod Pathol 2003; 16(6):537-542.
14. Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, et al. Negative hMSH2 protein expression in pancreatic carcinoma may predict a better prognosis of patients. Oncol Rep 2003; 10(4):997-1000.
15. Maple JT, Smyrk TC, Boardman LA, et al. Defective DNA mismatch repair in long-term (> or =3 years) survivors with pancreatic cancer. Pancreatology 2005; 5(2-3):220-227.
16. Fujii K, Miyashita K, Yamada Y, et al. Simulation-based analyses reveal stable microsatellite sequences in human pancreatic cancer. Cancer Genet Cytogenet 2009; 189(1):5-14.
17. Laghi L, Beghelli S, Spinelli A, et al. Irrelevance of microsatellite instability in the epidemiology of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. PLoS One 2012; 7(9):e46002.
18. Ottenhof NA, Morsink FH, Ten Kate F, et al. Multivariate analysis of immunohistochemical evaluation of protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma reveals prognostic significance for persistent Smad4 expression only. Cell Oncol (Dordr) 2012; 35(2):119-126.
19. Liu W, Shia J, Gönen M, et al. DNA mismatch repair abnormalities in acinar cell carcinoma of the pancreas: frequency and clinical significance. Pancreas 2014; 43(8):1264-1270.
20. Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, et al.Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. Oncotarget 2015; 6(9):7209-7220.
21. Riazy M, Kalloger SE, Sheffield BS, et al. Mismatch repair status may predict response to adjuvant chemotherapy in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Mod Pathol 2015; 28(10):1383-1389.

Supplementary Table 3. Patients' Characteristics (multicentric retrospective cohort)

Variables	**N** (%)
Sex (427)	
male	244 (57%)
female	183 (43%)
Age (median, range)	63.8 years (34-87)
IPMN-associated PDAC (426)	
yes	41 (9%)
no	385 (91%)
Tumor size (mm) (413)	
≥30	253 (61%)
<30	160 (39%)
Lymph nodes (423)	
Negative, N0	105 (25%)
Positive, N1	318 (75%)
Resection Margins (423)	
R0	318 (76%)
R1	105 (24%)
Preoperative treatment (424)	
yes	26 (6%)
no	398 (94%)
Postoperative treatment (302)	
yes	102 (33%)
no	210 (67%)
Local recurrence (397)	
yes	172 (43%)
no	225 (57%)
Distal recurrence (397)	
yes	195 (49%)
no	202 (51%)
Recurrence (427)	
yes	285 (66%)
no	142 (34%)

Supplementary Table 4. Patient's Clinical and Pathological Characteristics of the Saint-Antoine's IPMN-associated PDACs cohort

Patient	Sex	Age	UICC (7th ed.)	Recurrence	Dead	DFS (months)	OS (months)	IPMN location	Size of the invasive component (mm)
PSA01	female	83	TisN0	no	no	26	26	main duct	NA
PSA02	male	59	T2N0	no	no	15	15	main duct	>20
PSA03	female	55	T2N0	no	no	155	155	main duct	>20
PSA04	male	55	T3N1	no	no	95	95	mixed	60
PSA05	female	60	T2N0	no	no	96	96	side branch	10-20
PSA06	male	55	T3N0	no	no	2	2	main duct	60
PSA07	male	73	T3N1	no	no	2	2	main duct	20
PSA08	female	69	T3N1	yes	yes	16	40	mixed	20
PSA09	female	56	T3N0	yes	no	9	27	mixed	10
PSA10	female	80	T1N0	no	no	34	34	mixed	10
PSA11	male	47	T3N1	yes	yes	19	34	Main duct	40
PSA12	male	58	T3N1	no	no	71	71	side branch	25
PSA13	male	63	T3N0	yes	yes	28	32	mixed	20
PSA14	male	76	T3N0	no	no	107	107	side branch	22
PSA15	female	53	T3N1	no	no	77	77	side branch	30
PSA16	male	73	T1N0	no	no	3	3	mixed	6 mm
PSA17	male	58	T1N0	no[d]	no	223	223	mixed	<1

Supplementary Table 5. Survival Analysis (pooled multicentric retrospective cohort and Saint Antoine's IPMN-associated PDACs cohort)

	DFS				OS			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
Variables	median survival (months)	*P* value	95% CI	*P* value	median survival (months)	*P* value	95% CI	*P* value
Sex		.1	0,93-1,54	.16		.237		
female	17,6±1,9				33,2±3			
male	14,2±1,2				26,4±3,2			
Tumor size		<.0001	1,15-1,96	.002		<.0001	1,33-2,33	<.0001
≥30mm	13,4±0,7				21,8±1,6			
<30mm	24±4				36,9±3,3			
Margins		<.0001	1,22-2,16	.001		<.0001	1,12-2,04	.007
R0	17,6±2,2				33,2±2,2			
R1	11,0±1,1				18,4±2,3			
Lymph Nodes		<.0001	1,47-2,90	<.0001		<.0001	1,36-2,78	<.0001
positive, N+	13±0,7				22,9±1,9			
negative, N0	42,7±7,8				57,7±13			
IPMN		.039	0,48-1,25	.301		.025	0,35-1,10	.105
yes	38,5±15,8				44,9±11,3			
no	14,7±1				27,4±2,6			
dMMR/MSI		.703				.663		
yes	21,4±10,5				35,1±0,1			
no	15,6±1,1				29,9±2,4			

III. DISCUSSION

Notre étude avait pour objectif principal de mieux caractériser le phénotype MSI dans l'ACP. Nous voulions tout d'abord connaître sa fréquence réelle. Pour cela, nous avons eu la possibilité de colliger les données cliniques et des échantillons tumoraux de plus de 600 patients atteints d'un ACP et opérés à but curatif. Cette importante série de patients avait l'avantage d'être multicentrique, consécutive et de provenir de centres experts dans la prise en charge médico-chirurgicale de l'ACP.

Nous avons également pu investiguer la fréquence du phénotype MSI dans une série unique de 68 échantillons tumoraux issus de xénogreffes (PDX) d'ACP obtenus auprès de Juan Iovanna et Nelson Dusetti du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (INSERM UMR1068, CNRS UMR 7258). Les PDX ont été obtenus à partir d'autres échantillons tumoraux que ceux de la série de plus de 600 patients, et provenaient de biopsies par cytoponction (de la tumeur primitive ou de métastases hépatiques) ou de pièces opératoires de patients opérés dans des centres experts de la région PACA. Nous avons privilégié, pour notre screening, une approche par immunohistochimie et non une double approche systématique associant immunohistochimie et biologie moléculaire. Les PDX, parce qu'elles sont dépourvues de stroma inflammatoire, sont plus facilement accessibles à une étude par biologie moléculaire. Nous avons pu confirmer, grâce à cette série de PDX, qu'une approche par immunohistochimie afin de déterminer le phénotype dMMR était tout à fait pertinente puisque la fréquence du phénotype dMMR/MSI était strictement la même dans les deux série de malades (prélèvements fixés en formol et screenés par tissue micro-array (TMA) et PDX).

L'exploration récente, à grande échelle, des tumeurs de phénotype MSI a permis de redéfinir leur paysage clinique. Nous avons par conséquent voulu savoir, à partir de cette importante série de malades, s'il existait des caractéristiques anatomo-pathologiques et/ou cliniques de l'ACP de phénotype dMMR/MSI. De même, nous avons voulu voir si ce phénotype pouvait avoir un intérêt pronostique.

En raison des résultats impressionants des immunothérapies dans les cancers de phénotype dMMR/MSI, nous avons cherché à mieux caractériser les cas d'ACP identifiés comme étant dMMR/MSI d'un point de vue moléculaire et phénotypique. Pour cela, nous avons (i)

recherché une série de gènes cibles ; ii) caractérisé l'infiltrat lymphocytaire des ACP MSI (lymphocytes T CD3+ et CD8+) ; et iii) étudié l'expression de l'immune checkpoint PD-L1, afin d'établir l'intérêt d'un traitement par ICK dans l'ACP de phénotype MSI.

A. Fréquence du phénotype MSI dans l'ACP

Nous sommes partis d'une série de 602 patients analysés par IHC à l'aide des 4 protéines MMR sur TMA et n'avons finalement pu retenir que 428 patients, parmi lesquels nous avons identifié 7 patients dMMR/MSI, soit une fréquence de 1.6%. Cette fréquence a été confirmée par la suite, à travers l'analyse de l'ADN tumoral, par PCR multiplex (pentaplex et Hsp110 HT17) de 68 xénogreffes d'ACP, dont seulement 1 (1.5%) était MSI.

Depuis 25 ans, plusieurs études ont essayé de déterminer la fréquence du phénotype MSI dans l'ACP avec des résultats très hétérogènes. Cela s'explique notamment par les différentes méthodes employées (IHC et/ou biologie moléculaire), les biais dans la sélection des patients et le faible nombre de patients inclus dans la plupart des séries. Laghi et al. ont étudié par biologie moléculaire (PCR pentaplex) 338 ACP opérés consécutivement dans 3 centres experts d'Italie et d'Allemagne. Un seul patient (0.3%) ayant une tumeur de phénotype MSI a été identifié. Il s'agissait d'un carcinome médullaire avec méthylation du promoteur de *hMLH1* (Laghi 2012). Riazy et al. ont analysé par IHC une série de 265 patients opérés entre 1995 et 2014. Ils ont utilisé une approche qui ressemble à la nôtre, c'est-à-dire avec l'utilisation première de l'IHC sur TMA et confirmation de la perte d'expression par l'analyse sur grande coupe. Les 4 protéines MMR ont été étudiées à chaque fois. Quarante et une (15.4%) tumeurs ont été considérées comme dMMR, dont deux tiers par perte de l'expression du tandem MSH2/MSH6 (Riazy 2015).

Au début de cette année, Humphris et al. ont publié leur résultats après analyse multi-omique complexe (par séquençage génomique, séquençage exonomique, PCR, méthylation et IHC) de 385 ACP consécutifs ; 4 (1%) ont été considérés comme MSI (Humphris 2017). Ainsi, au vu de ces résultats et de ceux que nous avons obtenus, Il nous semble licite de conclure que la fréquence du phénotype MSI dans l'ACP se situe entre 1 et 2%.

B. Quelle est la meilleure méthode pour diagnostiquer le phénotype MSI dans l'ACP ?

Nous avons vu que le phénotype MSI peut être déterminé par biologie moléculaire, avec un panel de 5 marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphes (PCR Pentaplex) ou par l'analyse de la perte d'expression des protéines du complexe MMR par IHC. La PCR peut avoir sa sensibilité mise à mal par une importante contamination des échantillons par de l'ADN non tumoral (Boland 1998), comme cela peut être le cas pour des tumeurs riches en stroma desmoplasique tel l'ACP. Par ailleurs, la présence de multiples mécanismes génétiques d'inactivation des gènes MMR (mutations ponctuelles, délétions ou hyperméthylation) est considérée comme un facteur confondant pouvant compromettre les résultats de la biologie moléculaire (Humphris 2017). L'IHC présente l'intérêt d'être peu onéreuse et peu consommatrice de temps ; par ailleurs, l'IHC est surtout une technique morphologique et garde donc une bonne sensibilité même si l'on dispose de peu de matériel tumoral. En revanche, l'IHC nécessite d'être réalisée dans des centres experts (Overbeek 2008). Par ailleurs, l'IHC permet d'identifier la protéine MMR déficiente et ainsi orienter la recherche de la mutation chez les patients suspects d'être SL (Hampel 2005).

Actuellement, il n'existe pas de recommandation concernant la meilleure méthode pour le diagnostic du phénotype dMMR/MSI dans de nombreux types tumoraux incluant l'ACP. L'essentiel des données de la littérature concernent le CCR, type tumoral pour lequel les deux méthodes sont considérées comme équivalentes, avec une concordance supérieure à 90% (Hampel 2005) quand les 4 protéines MMR sont utilisées. Nos résultats, malgré une interprétation parfois difficile, sont en faveur de l'utilisation de l'IHC comme méthode de choix pour la recherche du phénotype dMMR/MSI dans l'ACP, à condition que le centre possède une bonne expérience. Les résultats de l'étude multi-omique réalisée par Humphris et al. sont similaires aux nôtres quant à l'intérêt de l'IHC pour l'analyse de ces tumeurs à faible contenu cellulaire (Humphris 2017). Il nous semble également pertinent de signaler que, dans la pratique clinique courante (et cela de plus en plus), les prélèvements sont très souvent issus de cytoponctions (de la tumeur primitive par écho-endoscopie et/ou des métatases hépatiques guidées par échographie ou scanner). Or, sur ces prélèvements, souvent pauci-cellulaires et de petite taille, l'analyse moléculaire est un défi du fait de la très faible quantité des cellules analysables.

C. L'ACP de phénotype MSI présente-t-il des caractéristiques morphologiques particulières?

Des caractéristiques anatomo-cliniques particulières ont été largement décrites à la fois dans les CCR, les cancers gastriques, de même que dans les cancers de l'endomètre de phénotype dMMR/MSI. Les carcinomes médullaires du pancréas, à l'instar d'autres localisations, ont également été rapportés comme pouvant être de phénotype dMMR/MSIMSI (Goggins 1998 ; Wilentz 2000). Parmi les 7 tumeurs dMMR/MSI identifiées dans notre série, 2 présentaient un sous-type histologique particulier, à savoir un carcinome de type médullaire et un adénocarcinome mucineux.

De manière intéressante, sur le plan clinique nous avons retrouvé une relation entre ACP développés sur TIPMP et phénotype dMMR/MSI (P=.14). Cela a pu être confirmé par l'analyse supplémentaire d'une série monocentrique (Hôpital Saint-Antoine) de 17 TIPMPs dégénérées opérées de façon consécutive. Au total, nous avons retrouvé une fréquence significativement supérieure de dMMR/MSI dans les ACP développés sur TIPMP (4/58, 6.9%) en comparaison avec les ACP non développés sur TIPMP (5/385, 1.3% ; Fisher's exact test, P=.02). Toutefois, même si un phénotype dMMR/MSI a été observé dans la moitié des cas associé à une TIPMP, cela ne représentait que 7% de l'ensemble des TIPMP analysées. Cette association demande donc à être investiguée sur une plus grande série de malades.

1. Syndrome de Lynch et l'ACP

Les 9 ACP dMMR/MSI identifiés (7 issus de la série multicentrique et 2 provenants de la série de TIPMP dégénérée de l'Hôpital Saint Antoine) présentaient des caractéristiques biologiques évocatrices d'un syndrome de Lynch, i.e perte d'expression hétérogène des protéines MMR (4 MLH1/PMS2, 4 MSH2/MSH6 et 1 MSH6) et absence de méthylation du promoteur de *MLH1* (en cas de perte d'expression de MLH1). Parmi les 8 malades dont les dossiers cliniques étaient consultables, 3 présentaient les critères de Bethesda. De manière intéressante, 2 de ces 3 patients avaient un ACP développé sur TIPMP. La relation entre TIPMP et SL a déjà été rapportée dans la littérature (Sparr 2009 ; Flanagan 2015), mais il s'agissait de deux cas cliniques. Même si nos données sont très évocatrices d'une telle

association, le fait que nous ne disposons pas d'analyse constitutionnelle ne nous permet pas de conclure de manière définitive à cette association.

Ainsi, en nous basant sur nos constatations, nous recommandons un screening dMMR/MSI des ACP en privilégiant une approche par IHC, spécialement en cas de TIPMP. Nous proposons d'envoyer en consultation d'oncogénétique les malades ayant un ACP de phénotype dMMR/MSI, et tout particulièrement ceux développés dans un contexte de TIPMP.

D. Le phénotype MSI est-il un critère pronostique pour l'ACP ?

Un phénotype MSI est classiquement associé, à stade TNM égal, à un meilleur pronostic dans plusieurs types tumoraux, incluant notamment le CCR, le cancer gastrique ou encore le cancer de l'endomètre (Bae 2015 ; McMeekin 2016 ; Cohen 2015). Les données de la littérature concernant un éventuel meilleur pronostic des ACP de phénotype MSI sont discordantes : en effet, si les premières études publiées avaient montré une corrélation, quoique souvent non significative statistiquement, entre phénotype MSI et un meilleur pronostic, cela n'a pas été confirmé par les études plus récentes, jusqu'à la publication très récente de l'étude de Cloyd et al. (voir l'Introduction, partie C) qui montre une survie à 5 ans de 100% pour les patients MSI opérés. Cette étude doit cependant être analysée avec précaution, car la population étudiée est issue de familles suivies activement pour leur risque accru de cancer digestif, facteur susceptible d'être un réel biais de sélection.

Dans notre série, aucune différence de survie n'a été observée entre les ACP MSI et MSS. Ces résultats s'ont cependant portés sur l'analyse d'un très petit nombre de malades (n=7) MSI. Cela est encore plus vrai pour l'analyse de survie en fonction du statut MSI chez les TIPMP dégénérées.

E. Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire et de l'environnement tumoral

L'inhibition du checkpoint PD-1/PD-L1 semble être plus effective pour les tumeurs solides qui presentent une réponse anti-tumorale pré-existante, notamment riche en cellules T CD8+ (Peltomäki 2004 ; Herbst 2014). Aussi, il a été demontré en modèles murins de cancer du pancréas que le blocage combiné par des anticorps anti-IL-6 et anti-PD-L1 permet de limiter la progression tumorale (Taube 2014). Nous avons analysé, de façon semi-quantitative, la présence de cellules T CD3+ et TCD8+ à la fois dans le compartiment intra-tumoral et au niveau du front d'invasion. Nous avons retrouvé une plus grande densité de cellules TCD8+ au niveau du front d'invasion dans les ACP dMMR/MSI (comparé aux ACP de phénotype MSS). Cela est en accord avec les études ayant déjà démontré, pour le CCR, que la réponse immunitaire est plus prononcée au niveau du front d'invasion (Shunyakov 2004 ; Titu 2002).

Dans l'ACP classique, les cellules T effectrices sont rares à l'exception des ACP développés sur pancréatite chronique (De Monte 2011 ; Tassi 2008 ; Gabitass 2011). La plupart des cellules T ont un phénotype naïf, et ne sont pas activées (Vonderheide & Bayne 2013). L'absence de cellules T effectrices dans l'ACP classique peut, en effet, être un indice de la faible participation de l'immunoediting lors de l'évolution de la surveillance immunitaire (Clark 2009). De même, dans l'ACP, l'oncogène *RAS* (dont la mutation est un phénomène pratiquement toujours observé dans ce type tumoral) semble générer une inflammation favorisant l'immunosuppression et ensuite le privilège immun au niveau du microenvironnement tumoral (Vonderheide & Bayne 2013). L'oncogenèse particulière aux ACP MSI semble expliquer les résultats surprenants obtenus avec les inhibiteurs de PD-1 dans les ACP MSI en contraste nette avec les résultats décevants des premières études où le phénotype MSI n'était pas pris en considération. L'explication résiderait, au moins en partie, du fait que dans l'ACP classique l'absence de cellules T effectrices ne soit pas la conséquence de l'immunoediting (soit de l'équilibre entre la réponse immunitaire et les mécanismes d'échappement utilisés par les cellules tumorales) (voir la description du phénotype d'exclusion immunitaire proposé par Chen et Mellman dans l'introduction, partie D). Or, cela semble être le cas pour l'ACP MSI et, de ce fait, la libération du frein immunologique (imposé par les cellules tumorales à travers de la surexpression des ICK) par l'utilisation des inhibiteurs de PD-1 permettrait l'action du système immunitaire.

F. Analyse mutationnelle des gènes cibles

Plus grand est le nombre de mutations, plus probable est le fait que des mutations immunogéniques aient lieu, offrant des cibles potentielles pour l'attaque de cellules T (Rizvi 2015 ; Le 2015 ; Schumacher & Schreiber 2015). Afin de confirmer l'association du phénotype dMMR/MSI avec un profil mutateur, nous avons choisi seize gènes contenant des séquences répétées : *ACVR2A*, *ATR*, *BAX*, *BLM*, *CBF2*, *CDX2*, *GRB14*, *GRK4*, *IGF2R*, *MBD4*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50*, *RECQL*, *TCF7L2* et *TGFBR2*. Ceux-ci ont été choisis car ils sont des cibles fréquentes des mutations lors du processus de carcinogenèse associé à une instabilité de microsatellite ou parce qu'ils ont un rôle clé dans la maintenance de l'intégrité du génome.

Nous avons retrouvé une altération chez 7 des 16 gènes étudiés. Trois parmi les 4 échantillons MSI analysés avaient au moins une mutation. Si ces résultats confirment la présence d'un processus de carcinogenèse MSI immunogénique, il est intéressant de signaler que les mutations retrouvées ne correspondent pas à celles communément associées au phénotype dMMR/MSI du CCR. Ce fait suggère que des évènements somatiques issus de l'instabilité microsatellitaire sont, peut-être, spécifiques à l'organe d'origine du cancer (Duval 2004).

Même si les mutations sont généralement considérées comme pourvoyeuses d'une immunité anti-tumorale à travers les cellules T, certaines (et tout particulièrement celles concernant des mécanismes qui favorisent le développement tumoral) peuvent agir en atténuant la réponse immunitaire. Nous pouvons citer les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* ou encore d'autres mutations responsables de l'activation de la voie MAP kinase dont le résultat est une diminution de la transcription de molécules du CMH de classe I bien comme d'autres mutations concernant des gènes codants de molécules essentielles à la présentation des peptides (Seliger 1996 ; Seliger 1998 ; Atkins 2004 ; Bradley 2015). Nous n'avons malheureusement pas caractérisé de façon extensive le statut mutationnel de certains gènes importants de la carcinogenèse de l'ACP (exemple, *KRAS*, *TGF-β*, *TP53*, *CDKN2A/p16*, *SMAD4/DPC4*), ou encore associé au phénotype MSI (exemple, le gène *BRAF* pour les MSI sporadiques).

G. Expression des checkpoints immunologiques

Parmi les potentiels marqueurs de réponse clinique aux traitements anti-PD-1/PD-L1, celui qui a suscité la plus grande attention est le PD-L1, car il est considéré refléter l'activité des cellules T effectrices (Mellman 2011 ; Pardoll 2012). Dans un nombre grandissant de data set cliniques il devient progressivement de plus en plus évident que l'expression de PD-L1 dans les biopsies (avant traitement) permet l'inclusion des patients les plus susceptibles de bénéficier d'un traitement anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (Herbst 2014 ; Taube 2014 ; Garon 2015 ; Topalian 2012 ; Brahmer 2012 ; Fehrenbacher 2016 ; Rosenberg 2016).

Pour cela, nous avons exploré, *in vivo* et *in vitro*, l'expression de PD-L1 au niveau de prélèvements d'ACP MSI et MSS, ainsi qu'au niveau de lignées cellulaires. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression endogène des ICK et le statut MSI dans les lignées cellulaires. En revanche, la quasi-totalité (89%) des échantillons MSI/dMMR exprimait PD-L1, tandis que moins de la moitié (40%) des échantillons MSS/pMMR l'exprimait (P=.05). Ce résultat est conforme à ceux observés pour des tumeurs MSI/dMMR d'autres organes primitifs (Ma 2016a ; Mace 2017 ; Marisa 2017).

Néanmoins, l'utilisation de l'immunohistochimie soulève plusieurs questions concernant l'interprétation de l'expression de PD-L1 : i) parmi les divers clones disponibles, lequel doit-on choisir? ; ii) si l'expression de PD-L1 peut être observée dans les cellules tumorales, mais aussi dans les cellules inflammatoires du stroma, où doit-on regarder? et iii) à partir de quel pourcentage de cellules marquées décide-t-on que l'expression est présente?

Dans notre étude nous avons utilisé le même clone (clone SP263, Ventana) que celui de l'étude de Ma et al. publiée en 2016 sur des adénocarcinomes gastriques dMMR/MSI. Les auteurs ont considéré toute expression membranaire au niveau des cellules tumorales comme expression positive et ont montré une association entre l'expression de PD-L1 et MSI (Ma 2016a).

Si notre analyse s'est focalisée sur l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales, nous avons aussi evalué l'expression de PD-L1 au niveau de l'infiltrat inflammatoire stromal en utilisant le même score de Ma et al. Cette fois-ci, aucune différence n'a été observée entre les tumeurs MSI et MSS. Il nous semble difficile de conclure à l'existence d'un modèle d'expression de PD-L1 en fonction de nos résultats.

Nous avons aussi utilisé un autre clone anti-PD-L1 (clone UEL3N, Cell Signaling). Avec ce deuxième clone seulement 1 parmi les 10 cas MSI présentait l'expression de PD-L1, tandis qu'aucun des cas MSS ne l'exprimait (résultats non montrés).

Si l'expression de PD-L1 par IHC a été utilisée dans d'autres tumeurs solides pour détérminer la réponse aux inhibiteurs d'ICK (Beckers 2016 ; Aguiar 2017), cela n'a pas encore été demontré pour les cancers digestifs. L'étude de l'expression de PD-L1 *à posteriori* dans la tumeur des patients atteints d'ACP ayant bénéficé d'un protocole d'immunothérapie permettra de mieux élucider cette question importante. Car, pour l'instant, le meilleur marqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs d'ICK semble être la détermination du phénotype dMMR/MSI (Le 2017).

IV. PERSPECTIVES

Notre travail suggère plusieurs pistes, qui demandent à être mieux explorées. Les deux principales sont la relation entre TIPMP et phénotype dMMR/MSI et le lien probable entre TIPMP et syndrome de Lynch. Pour cela, nous souhaitons constituer une cohorte prospective multicentrique européenne des TIPMP opérées (en dysplasie ou dégénérée). Les blocs seront centralisés dans le laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Saint-Antoine et screenés par IHC pour les 4 protéines MMR. En parallèle, nous constituerons une base de données cliniques exhaustive. Une consultation d'oncogénétique pour tous les malades présentant un ACP de phénotype dMMR/MSI doit être proposée, ainsi qu'une analyse constitutionnelle le cas échéant. Cette dernière permettra de confirmer le lien qui semble exister entre ACP de phénotype dMMR/MSI et syndrome de Lynch, voire entre TIPMP et syndrome de Lynch. Une demande de financement en ce sens est actuellement en cours.

L'obtention d'échantillons contenant des lésions à différents stades de la progression tumorale (de la lésion dysplasique jusqu'à la lésion localement avancée) pourrait permettre une analyse approfondie des altérations spécifiques induites par la voie de carcinogénèse MSI, qui semble précoce comme notre étude le suggère puisque nous avons observé la perte d'expression des protéines MMR à la fois dans les lésions adénocarcinomateuses, mais également dans la lésion dysplasique (*carcinome in situ*). En ce sens, il serait intéressant de réaliser des analyses génomiques à haut débit afin de mieux caractériser les altérations moléculaires sous-tendant la carcinogenèse pancréatique MSI, en particulier à sa phase très précoce.

Comme nous l'avons vu, l'analyse du microenvironement immunitaire des cancers apparaît comme l'un des principaux mécanismes pour comprendre la relation entre le système immunitaire d'un patient et son cancer (Llosa 2015). Dans le CCR, il a récemment été proposé d'appliquer le test Immunoscore®, qui quantifie, par IHC, précisément les lymphocytes T CD3+ et CD8+ en intra-tumoral et au niveau du front d'invasion de la tumeur (Hermitte 2016). Ce nouveau paramètre immunologique a démontré dans une série d'études rétrospectives qu'il permettait un pronostic précis, indépendamment de tout autre paramètre clinique, et même supérieur à celui fourni par le standard que constitue la

classification TNM (Galon 2006 ; Mlecnik 2011). Toutefois, le laboratoire d'accueil a publié cette année (Marisa 2017) une étude (technique de NanoString) démontrant l'intérêt d'intégrer dans les études des composants du microenvironnement tumoral, les marqueurs d'ICK. Cette étude suggère que le pronostic du CCR serait, en fait, déterminé par un équilibre entre lymphocytes T et ICK. C'est pourquoi il nous semble pertinent de réaliser une étude similaire sur les ACP.

Aussi, nos résultats semblent suggérer que les ACP ddMMR/MSI pourraient être des candidats aux inhibiteurs des ICK. Ces résultats demandent évidemment à être validés sur de plus grandes séries de malades. La mise en place de plusieurs protocoles (incluant le protocole UNICANCER n° UC-0105/1611) permettant l'accès à l'anticorps anti PD-1 (Nivolumab) aux patients (entre 150 et 300) atteints de certaines tumeurs rares (dont fait partie les ACP dMMR/MSI) nous permettent d'en envisager. Cela nous permettrait également de répondre à la question de pourquoi certains malades, alors même que leurs tumeurs expriment PD-L1 ne répondent pas aux inhibiteurs des ICK.

Aussi, et pourquoi pas, nous aimerions donner suite à l'étude d'Abraham et al. concernant l'étude du phénotype dMMR/MSI dans les néoplasies intraductales et papillaires des voies biliaires (Abraham 2002a). Le fait qu'en France la plupart des centres spécialisés dans la prise en charge du cancer pancréatique soit aussi une référence pour les pathologies hépatiques et biliaires facilitera la constitution d'une deuxième cohorte prospective qui partagera avec celle des TIPMPs pancréatiques les mêmes objectifs.

V. CONCLUSION

La première partie de nos résultats présentés dans ce manuscrit nous a permis de confirmer que le phénotype dMMR/MSI avait une fréquence faible dans l'ACP (environ 1-2%). L'immunohistochimie semble être une méthode de screening plus adaptée que les techniques de biologie moléculaire. De manière intéressante, le phénotype dMMR/MSI semble plus fréquemment observé dans un contexte de TIPMP. Nos résultats suggèrent également que les TIPMP pourraient être une lésion du spectre du SL. L'implication clinique potentielle de ces constatations est évidente car bien que notre étude n'ait porté que sur un nombre limité de cas (et sans la réalisation d'analyse constitutionnelle), il nous paraît raisonnable, à la lumière de nos résultats, de proposer la recherche du statut dMMR par IHC chez tous les patients opérés d'une TIPMP dégénérée, ainsi qu'une recherche approfondie des antécédents personnels et familiaux permettant de suspecter d'un SL. Cela justifierait, par la suite, la proposition d'un conseil génétique, ainsi qu'un dépistage aux apparentés.

Les autres résultats obtenus et présentés dans ce manuscrit nous ont permis de montrer l'implication du mécanisme d'instabilité de microsatellites au cours de la cancérogenèse et l'acquisition d'un phénotype mutateur des ACP dMMR/MSI avec, de ce fait, l'incitation à une réponse immunitaire plus prononcée caractérisée par un TIL riche en TCD8+ et exprimant PD-L1. Ces données, à défaut de ne pas avoir pu traiter les patients, permettent de supposer une probable réponse clinique de l'ACP dMMR/MSI à l'immunothérapie anti-PD1/PD-L1, comme cela a été, au moins partiellement, confirmé par le dernier essai clinique publié (Le 2017).

Les réserves énoncées durant les dernières pages de ce manuscrit rendent indispensables la poursuite des recherches pour la confirmation et l'amplification des résultats obtenus.

VI. REFERENCES

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular testing for the disease. N Engl J Med. **338**:1481-87.

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al (1995) Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. Int J Cancer. **64**:430–3.

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al (1999) Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. Int J Cancer. **81**:214–8.

Abe T, Ouyang H, Migita T, et al (1996) The somatic mutation frequency of the transforming growth factor beta receptor type II gene varies widely among different cancers with microsatellite instability. Eur J Surg Oncol. **22**(5):474-7.

Abraham SC, Lee JH, Boitnott JK, et al (2002a) Microsatellite instability in intraductal papillary neoplasms of the biliary tract. Mod Pathol. **15**:1309-17.

Abraham SC, Wu TT, Hruban RH, et al (2002b) Genetic and immunohistochemical analysis of pancreatic acinar cell carcinoma: frequent allelic loss on chromosome 11p and alterations in the APC/beta-catenin pathway. Am J Pathol. **160**(3):953-62.

Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, Hoos A (2015) Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. Nat Rev Drug Discov. **14**(9):603–21.

Adsay NV, Fukushima N, Furukawa T, et al (2010) Intraductal neoplasms of the pancreas. In : Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds.) WHO Classification of tumors of the digestive system. Lyon : IARC :304-13.

Aguiar PN Jr, De Mello RA, Hall P, et al (2017) PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: updated survival data. Immunotherapy. **9**(6):499-506.

Akiyama Y, Iwanaga R, Saitoh K, et al (1997b) Transforming growth factor beta type II receptor gene mutations in adenomas from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology. **112**:33-9.

Akiyama Y, Sato H, Yamada T, et al (1997a) Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. Cancer Res. **57**:3920-3.

Alazzouzi H, Domingo E, Gonzalez S, et al (2005) Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis. Hum Mol Genet. **14**:235-9.

Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al (2001) Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. Am J Pathol. **158**:527–35.

Al-Sukhni W, Aronson M, Gallinger S (2008) Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. Surg Clin North Am. **88**:819–44.

Al-Sukhni W, Borgida A, Rothenmund H, et al (2012) Screening for pancreatic cancer in a high-risk cohort: an eight-year experience. J Gastrointest Surg. **16**:771–83.

Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE, et al (2004) MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. Int J cancer. **109**:265-73.

Azuma M, Ito D, Yagita H, et al (1993) B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. Nature. **366**:76–9.

Bae YS, Kim H, Noh SH, Kim H (2015) Usefulness of Immunohistochemistry for Microsatellite Instability Screening in Gastric Cancer. Gut Liver. **9**(5):629-35.

Bailey P, Chang DK, Forget MA, et al (2016) Exploiting the neoantigen landscape for immunotherapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. Scientific reports. **6**:35848.

Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, et al (2004) Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. Mol Cancer. **3**:21.

Banerjea A, Bustin SA, Dorudi S (2005) The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. World J Surg Oncol. **3**:26.

Basso D, Fogar P, Falconi M, et al (2013) Pancreatic tumors and immature immunosuppressive myeloid cells in blood and spleen: role of inhibitory co-stimulatory molecules PDL1 and CTLA4. An in vivo and in vitro study. PLoS One. **8**:e54824.

Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, et al (2016) Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. Histopathology. **69**(1):25-34.

Behrens G, Jochem C, Schmid D, et al (2015) Physical activity and risk of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. Eur J Epidemiol. **30**:279-98.

Bellizzi AM, Frankel WL (2009) Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. Adv Anat Pathol. **16**:405-17.

Berek JS, Chalas E, Edelson M, et al (2010) Prophylactic and risk-reducing bilateral salpingo-oophorectomy: recommendations based on risk of ovarian cancer. Obstetr Gynecol. **116**:733–43.

Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, et al (1996) Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. Curr Biol. **6**:1695–7.

Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF (1994) Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. Proc Natl Acad Sci USA. **91**:4751–5.

Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology. **138**(6):2073-87.

Boland CR, Lynch HT (2013) The history of Lynch syndrome. Fam Cancer. **12**:145-57.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. **58**:5248-57.

Boland CR, Troncale FJ (1984) Familial colonic cancer without antecedent polyposis. Ann Intern Med. **100**:700-1.

Borg A, Sandberg T, Nilsson K, et al (2000) High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. J. Natl Cancer Inst. **92**:1260–6.

Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, et al (2012b) Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. Mol Carcinog. **51**(1):3-13.

Bosetti C, Bravi F, Turati F, et al (2013) Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. Ann Epidemiol. **23**:124-8.

Bosetti C, Filomeno M, Riso P, et al (2012a) Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. Ann Oncol. **23**:1880-8.

Bosetti C, Rosato V, Li D, et al (2014) Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. Ann Oncol. **25**:2065-72.

Bradley SD, Chen Z, Melendez B, et al (2015) BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma. Cancer Immunol Res. **3**:602-9.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al (2010) Phase I study of singleagent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. Journal of Clinical Oncology. **28**:3167-75.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med. **366**:2455-65.
Breast Cancer Linkage Consortium (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. **91**:1310–16.

Brentnall TA, Chen R, Lee JG, et al (1995) Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. Cancer Res. **55**(19):4264-7.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature. **368**:258-61.

Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, et al (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. Br J Cancer. **92**:1746–53.

Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al (2006) Multi-population analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. J Clin Oncol. **24**:241-51.

Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al (2016) HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. J Med Genet. **53**(6):377-84.

Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, et al (2003) Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. Tissue Antigens. **61**:211–9.

Campoli M, Chang CC, Ferrone S (2002) HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. Vaccine. **20**:A40–A45.

Capel E, Fléjou JF, Hamelin R (2007) Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. Oncogene. **26**(54):7596-600.

Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, et al (1999) Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. Gut. **45**:409-15.

Chang CC, Ferrone S (2007) Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. Cancer Immunol Immunother. **56**:227–36.

Chang JH, Jiang Y, Pillarisetty VG (2016) Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application An updated review. Medicine. **95**:49(e5541).

Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. (2010) J Allergy Clin Immunol. **125**(2):S3–S23.

Chapusot C, Martin L, Puig PL, et al (2004) What is the best way to assess microsatellite instability status in colorectal cancer? Study on a population base of 462 colorectal cancers. Am J Surg Pathol. **28**:1553-59.

Chau I (2017) Clinical development of PD-1/PD-L1 immunotherapy for gastrointestinal cancers: facts and hopes. Clin Cancer Res. (In Press)

Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. **39**(1):1–10.

Chen DS, Mellman I (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature. **541**:321-31.

Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, et al (2004) Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. Br J Cancer. **9**: 1711-17.

Chien YH, Jores R, Crowley MP. (1996) Recognition by gamma/delta T cells. Ann Rev Immunol. **14**:511–32.

Clark CE, Beatty GL, Vonderheide RH (2009) Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma : insights from genetically engineered mouse models of cancer. Cancer Lett. **279**:1-7.

Claverys JP, Lacks SA (1986) Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. Microbiol Rev. **50**(2):133-65.

Cloyd JM, Katz MHG, Wang H, et al (2017) Clinical and genetic implications of DNA mismatch repair deficiency in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. JAMA Surg. (in press)

Cohen R, Cervera P, Svrcek M, et al (2015) Status MMR et BRAF dans les cancers colorectaux : intérêts pour la prise en charge thérapeutique? Bull Cancer. **102**:572-81.

Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al (2014) Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil – Based Chemotherapy. Gastroenterology. **146**:401-11.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med. **364**(19):1817-25.

Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, et al (2005) CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. Int J Cancer. **117**(4):538–50.

Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T (2014) Tumour antigens recognized by T lymphocytes : at the core of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. **14**:135-46.

Crespo J, Sun H, Welling TH, et al (2013) T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. Curr Opin Immunol. **25**(2):214–21.

Cress RD, Yin D, Clarke L, et al (2006) Survival among patients with adenocarcinoma of the pancreas: a population-based study (United States). Cancer Causes Control. **17**:403-9.

Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, et al (2008) Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: lessons from 163 resected patients. Ann Surg. **247**:571-9.

Cunningham JM, Kim CY, et al (2001) The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. Am J Hum Genet. **69**(4):780-90.

de Jong AE, Hendriks YM, Kleibeuker JH, et al (2006) Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. Gastroenterology. **130**:665-71.

de Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, et al (2004) The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. Gastroenterology. **126**:42-8.

De Martel C, Franceschi S, Partensky C (2010) Epidémiologie du cancer du pancréas. In Delpero JR, Paye F, Bachellier P. Cancer du Pancréas, pp 12-30. Monographies de l'AFC (Ed. Arnette). ISBN: 978-2-7184-1240-5

De Monte L, Reni M, Tassi E, et al (2011) Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. J Exp Med. **208**:469-78.

De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, et al (1988) Immunogenic (tum) variants of mouse tumor P815 : cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. Proc Natl Acad Sci USA. **85**:2274-8.

de Wilde RF, Ottenhof NA, Jansen M, et al Analysis of LKB1 mutations and other molecular alterations in pancreatic acinar cell carcinoma. Mod Pathol. **24**(9):1229-36.

Delpero JR, Sauvanet A (2010) Duodénopancréatectomie céphalique pour adénocarcinome pancréatique. In Delpero JR, Paye F, Bachellier P. Cancer du Pancréas, pp. 112-127. Monographies de l'AFC. (Ed. Arnette). ISBN: 978-2-7184-1240-5

Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, et al (2011) Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and role of MSI. Cancer Microenvironment. **4**:377-92.

Devaud N, Gallinger S (2013) Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. Fam Cancer. **12**:301-6.

Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S, et al (2007) HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. BMC Cancer. **7**:33.

Dinarello CA (2007) Historical review of cytokines. Eur J Immunol. **37**:S34–S45.

Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, et al (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. Am J Pathol. **154**:1805–13.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med. **8**(8):793-800.

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

Duffy A, Capanu M, Allen P, et al (2009) Pancreatic adenocarcinoma in a young patient population--12-year experience at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. J Surg Oncol. **100**(1):8-12.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al (1997) Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. Hum Mol Genet. **6**:105-10.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol. **6**(11):836–48.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. Ann Rev Immunol. **22**:329–60.

Duval A, Hamelin R (2002) Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair deficient human cancers: towards a new concept of target genes for instability. Cancer Res. **62**:2447–54.

Duval A, Raphael M, Brennetot C, et al (2004) The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(14):5002-7.

Duval A, Rolland S, Compoint A, et al (2001) Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. Hum Mol Genet. **10**:513–8.

Egen JG, Allison JP (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. Immunity. **16**:23–35.

Espenschied CR, LaDuca H, Li S, et al (2017) Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. J Clin Oncol. **35**(22):2568-75.

Fanoni D, Tavecchio S, Recalcati S, et al (2011) New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas. Immunol Lett. **134**:157–60.

FDA: press announcements. Disponible à l'adresse: https://www.fda.gov/

Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al (2016) Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. Lancet. **387**:1837-46.

Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, et al (2007) Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. J Hepatobiliary Pancreat Surg. **14**:224-32.

Fernandez-Del Castillo C, Adsay NV (2010) Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Gastroenterology. **139**:708-13.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell. **75**:1027-38.

Flanagan MR, Jayaraj A, Xiong W, et al (2015) Pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm in a patient with Lynch syndrome. World J Gastroenterol. **21**(9):2820-5.

Fogelman DR, Wolff RA, Kopetz S, et al (2011) Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2- associated pancreatic cancer. Anticancer Res. **31**:1417–20.

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, et al (1993) Cloning of B7–2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. Science. **262**:909–11.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. **192**:1027–34.

Fujii K, Miyashita K, Yamada Y, et al (2009) Simulation-based analyses reveal stable microsatellite sequences in human pancreatic cancer. Cancer Genet Cytogenet. **189**(1):5-14.

Furlan D, Casati B, Cerutti R, et al (2002) Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability. J Pathol. **197**:603–9.

Furukawa T, Kloppel G, Adsay NV, et al (2005) Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. Virchows Arch. **447**:794-9.

Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, et al (2011) Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. Cancer Immunol Immunother. **60**:1419-30.

Gajewski TF (2015) The next hurdle in cancer immunotherapy: overcoming the non-T-cell inflamed tumor microenvironment. Semin Oncol. **42**:663-71.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome . Science. **313**:1960–4.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al (2015) Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. **372**:2018-28.

Genkinger JM, Kitahara CM, Bernstein L, et al (2015) Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. Ann Oncol. **26**:2257-66.

Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P (1998) Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. J Biol Chem. **273**(31):19895-901.

Geoffroy-Perez B, Janin N, Ossian K, et al (2001) Cancer risk in heterozygotes for ataxia-telangiectasia. Int J Cancer. **93**:288–93.

Ghimenti C, Tannergård P, Wahlberg S, et al (1999) Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumours. Br J Cancer. **80**(1-2):11-6.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al (2000) Very high risk of cancer in familial Peutz–Jeghers syndrome. Gastroenterology. **119**:1447–53.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al (2006) Genotype-Phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch Syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. J Clin Oncol. **24**:1–8.

Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR (2010) An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. PLoS ONE. **5**:e9393.

Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, et al (1998) Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. Am J Pathol. **152**(6):1501-7.

Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, et al (1995) Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. N Engl J Med. **333**:970–4.

Gologan A, Krasinskas A, Hunt J, et al (2005) Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. Arch Pathol Lab Med. **129**:1390-7.

Grant RC, Selander I, Connor AA, et al (2015) Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer. Gastroenterology. **148**:556-64.

Greene CN, Jinks-Robertson S (1997) Frameshift intermediates in homopolymer runs are removed efficiently by yeast mismatch repair proteins. Mol Cell Biol. **17**(5):2844-50.

Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, et al (2003) Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. Am J Surg Pathol. **27**:563–70.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. Ann Rev Immunol. **23**:515-48.

Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R (1998) Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Mol Cell Biol. **18**(11):6616-23.

Guidoboni M, Gafa` R, Viel A, et al (2001) Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. Am J Pathol. **159**:297–304.

Guo S, Contratto M, Miller G, et al (2017) Immunotherapy in pancreatic cancer: Unleash its potential through novel combinations. World J Clin Oncol. **8**(3):230-40.

Hameed O, Xu H, Saddeghi S, et al (2007) Hepatoid carcinoma of the pancreas : a case report and literature review of a heterogeneous group of tumors. Am J Surg Pathol. **31**:146-52.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al (2005) Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). N Engl J Med. **352**:1851-60.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. J Clin Oncol. **26**:5783-8.

Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, et al (1993) Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. Cancer Res. **53**(21):5087-9.

Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, et al (2014) Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. Gastroenterology. **147**(6):1308-1316.

Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, et al (2001) Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. J Natl Cancer Inst. **93**:1633–7.

Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, et al (2016) The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. Ann Oncol. **27**:926-33.

Hedge J, Wilson DJ (2016) Practical Approaches for Detecting Selection in Microbial Genomes. PLoS Comput Biol. **12**(2):e1004739.

Hemminki K, Li X, Plna K, et al (2001) The nation-wide Swedish family-cancer database-updated structure and familial rates. Acta Oncol. **40**:772-7.

Hempen PM, Zhang L, Bansal RK, et al (2003) Evidence of selection for clones having genetic inactivation of the activin A type II receptor (ACVR2) gene in gastrointestinal cancers. Cancer Res. **63**:994–9.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. **515**:563-7.

Hermitte F (2016) Biomarkers immune monitoring technology primer: Immunoscore® Colon. J Immunother Cancer. **4**:57.

Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. Clin Cancer Res. **12**:5423-34.

Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, et al (2003) Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci USA. **100**:4712-7.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. N Engl J Med. **363**:711-23.

Hoos A, Britten C (2012) The immuno-oncology framework: Enabling a new era of cancer therapy. Oncoimmunology. **1**(3):334-339.

Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, et al (2004) Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. Clin Gastroenterol Hepatol. **2**:252–61.

Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS (2007) Tumors of the pancreas. Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series (Fascicle 6). Armed Forces Institute of Pathology: Washington DC.

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, et al (2004) An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. Am J Surg Pathol. **28**:977-87.

Humphris JL, Patch AM, Nones K, et al (2017) Hypermutation In Pancreatic Cancer. Gastroenterology. **152**(1):68-74.

Ileana E, Champiat S, Soria JC (2013) Immune-Checkpoints : les nouvelles immunotherapies anticancéreuses. Bull Cancer. **100**:601-10.

Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, et al (2000) Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. Proc Natl Acad Sci USA. **97**:10872–7.

Iqbal J, Ragone A, Lubinski J, et al (2012) The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Br J Cancer. **107**:2005–9.

Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, et al (1992) Preoperative indications for extended pancreatectomy for locally advanced pancreas cancer involving the portal vein. Ann Surg. **215**:231-6.

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci USA. **99**:12293–7.

Jacob S, Praz F (2002) DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. Biochimie. **84**(1):27‑47.

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, et al (2001) B-cell activation by armed helper T cells. In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition (Garland Science, NewYork, USA).

Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al (2000) Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology. **118**:829-834.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al (2009) Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. **59**(4):225-49.

Jensen PE (2007) Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol. **8**:1041–8.

Jiang T, Zhou C (2015) The past, present and future of immunotherapy against tumor. Transl Lung Cancer Res. **4**:253–64.

Jiao L, Mitrou PN, Reedy J, et al (2009) A combined healthy lifestyle score and risk of pancreatic cancer in a large cohort study. Arch Inter Med. **169**:764-70.

Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol. **7**:335–46.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancer revealed by global genomics analyses. Science. **321**:1801-6.

Joyce JA, Fearon DT (2015) T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. Science. **348**:74-80.

Julié C, Tresallet C, Brouquet A, et al (2008) Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. Am J Gastroenterol. **103**:2825-35.

Kai M, Nakatsura T, Egami H, et al (2003) Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. Oncol Rep. **10**:1777-82.

Kalady MF, Kravochuck S, LaGuardia L, et al (2013) Adenomas in Lynch syndrome: don't be fooled by the "non" in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Fam Cancer. **12**:S2.

Kammertoens T, Blankenstein T (2009) Making and circumventing tolerance to cancer. Eur J Immunol. **39**:2345–53.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res. **57**:808-11.

Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, et al (2009) Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. JAMA. **302**:1790–5.

Katabi N, Klimstra DS (2008) Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical and pathological features and diagnostic approach. J Clin Pathol. **61**:1303-13.

Katz MH, Pisters PW, Evans DB, et al (2008) Borderline resectable pancreatic cancer: the importance of this emerging stage of disease. J Am Coll Surg. **206**:833-48.

Kawakubo K, Tada M, Isayama H, et al (2011) Incidence of extrapancreatic malignancies in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Gut. **60**:1249-53.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Ann Rev Immunol. **26**:677–704.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al (2006) Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. **203**:883–95.

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol. **145**:148–56.

Kim JM, Chen DS. (2016) Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). Ann Oncol. 27(8):1492-504.

Kleeff J, Korc M, Apte M, et al (2016) Pancreatic cancer. Nat Rev Dis Primers **21**(2):16022.

Klein AP, Brune KA, Petersen GM, et al (2004) Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. Cancer Res. **64**:2634–38.

Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, et al (2015) Prognosis of stage II and III colon cancer treated withadjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. Ann Oncol. **26**:126-32.

Kloor M, Becker C, Benner A, et al (2005) Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. Cancer Res. **65**:6418–24.

Kloor M, Michel S, Buckowitz B, et al (2007) Beta2- microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. Int J Cancer. **121**:454–8.

Kloor M, Michel S, Doeberitz MK (2010) Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. Int J Cancer. **127**:1001-10.

Kloppel G, Hruban RH, Longnecker DS, et al (2004) Ductal adenocarcinoma of the pancreas. In Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Digestive System, pp 221-30. Lyon, France (IARC Press).

Knudson AG Jr (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res. **45**:1437–43.

Kolodner R (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. Genes Dev. **10**(12):1433-42.

Kondo E, Horii A, Fukushige S (2001) The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. Nucleic Acids Res. **29**(8):1695-702.

Koretzky GA (2010) Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. J Immunol. **185**(5):2643– 4.

Kunk PR, Bauer TW, Slingluff CL, Rahma OE (2016) From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. J Immunother Cancer. **4**:14.

Laffan TA, Horton KM, Klein AP, et al (2008) Prevalence of unsuspected pancreatic cysts on MDCT. AJR Am J Roentgenol. **191**:802-7.

Lagerstedt KK, Staaf J, Jönsson G, et al (2007) Tumor genome wide DNA alterations assessed by array CGH in patients with poor and excellent survival following operation for colorectal cancer. Cancer Inform. **3**:341-55.

Laghi L, Beghelli S, Spinelli A, et al (2012) Irrelevance of microsatellite instability in the epidemiology of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. PLoS One. **7**(9):e46002.

Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, Malesci A (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. **96**:1402–3.

Lahue RS, Au KG, Modrich P (1989) DNA mismatch correction in a defined system. Science. **245**(4914):160-4.

Larsson SC, Wolk A (2012) Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. Br J Cancer. **106**:603-7.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nature Immunol. **2** :261–8.

Le DT, Durham JN, Smith KN, et al (2017) Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science. (In Press).

Le DT, Lutz E, Uram JN, et al (2013) Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. J Immunother. **36**(7):382-9.

Le DT, Uram JN, Wang H, et al (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N Engl J Med. **372**(26):2509-20.

Le DT, Uram JN, Wang H, et al (2016) PD-1 blockade in mismatch repair deficient non-colorectal gastrointestinal cancers. ASCO 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract 195. (Presented January 21, 2016).

Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, et al (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3'exons of TACSTD1. Nat Genet. **41**: 112-7.

Lin JC, Wang CC, Jiang RS, et al (2017) Impact of microsatellite alteration in surgical margins on local recurrence in oral cavity cancer patients. Eur Arch Otorhinolaryngol. **274**(1):431-9.

Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, et al (2001) Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumorspecific antigens. Int J Cancer. **93**: 6–11.

Linsley PS, Brady W, Urnes M, et al (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. J Exp Med. **174**:561–9.

Liu W, Shia J, Gönen M, et al (2014) DNA mismatch repair abnormalities in acinar cell carcinoma of the pancreas: frequency and clinical significance. Pancreas. **43**(8):1264-70.

Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al (2015) The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov. **5**(1):43-51.

Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, et al (2005) Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. Neoplasia. **7**:17-23.

Loilome W, Kadsanit S, Muisook K, et al (2017) Imbalanced adaptive responses associated with microsatellite instability in cholangiocarcinoma. Oncol Lett. **13**(2):639-46.

Loose D, Van de Wiele C (2009) The immune system and cancer. Cancer Biother Radiopharm. **3**:369-76.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, et al (1997) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J. Natl Cancer Inst. **89**:442–6.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, et al (2001) Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. JAMA. **286**:169-70.

Lu AL, Clark S, Modrich P (1983) Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. **80**(15):4639-43.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4 +T cells: differentiation and functions. Clin Dev Immunol. ID 925135.

Lüttges J, Beyser K, Pust S, et al (2003) Pancreatic mucinous noncystic (colloid) carcinomas and intraductal papillary mucinous carcinomas are usually microsatellite stable. Mod Pathol. **16**(6):537-42.

Lynch HT, Chapelle A de la (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. J Med Genet. **36**(11):801‑18.

Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. **348**:919-32.

Lynch HT, Krush AJ (1971a) Cancer family “G” revisited: 1895–1970. Cancer. **27**:1505–11.

Lynch HT, Krush AJ (1971b) The cancer family syndrome and cancer control. Surg Gynecol Obstet. **132**:247–50.

Lynch HT, Lynch JF (2004) Lynch syndrome: history and current status. Dis Markers. **20**:181-98.

Lynch HT, Lynch PM (2013) Foreword for “100 years of Lynch syndrome”. Fam Cancer. **12**:143-4.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al (1966) Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. Arch Intern Med. **117**(2):206-12.

Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, et al (2015) Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. Nat Rev Cancer. **15**:181-94.

Ma C, Patel K, Singhi AD, et al (2016a) Programmed Death-Ligand 1 Expression is common in gastric cancer associated with Epstein-Barr virus or microsatellite instability. Am J Surg Pathol. **40**(11):1496-506.

Ma W, Gilligan BM, Yuan J, Li T (2016b) Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy. J Hematol Oncol. **9**:47.

Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, et al (2017) IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. Gut. (In Press).

Maisonneuve P, Marshall BC, Lowenfels AB (2007) Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. Gut. **56**:1327–28.

Malka D, Hammel P, Maire F, et al (2002) Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. Gut. **51**:849-52.

Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, et al (2017) European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. Ann Oncol. **28**(5):1117-23.

Maple JT, Smyrk TC, Boardman LA, et al (2005) Defective DNA mismatch repair in long-term (> or =3 years) survivors with pancreatic cancer. Pancreatology. **5**(2-3):220-7.

Marisa L, Svrcek M, Collura A, et al (2017) The Balance between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression Determines Prognosis in Colon Tumors. J Natl Cancer Inst. (In press)

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science. **268**(5215):1336-8.

Markowitz SD, Roberts AB (1996) Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. Cytokine Growth Factor Rev. **7**:93–102.

Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R (1996) Redundancy of Saccharomyces cerevisiae MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. Genes Dev. **10**(4):407-20.

McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, et al (2004) Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. Fam Cancer. **3**(2):101-7.

McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. Science. **351**:1463–9.

McMeekin DS, Tritchler DL, Cohn DE, et al (2016) Clinicopathologic Significance of Mismatch Repair Defects in Endometrial Cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol. **34**(25):3062-8.

Meijer TW, Hoogerbrugge N, Nagengast FM, et al (2009) In Lynch syndrome adenomas, loss of mismatch repair proteins is related to an enhanced lymphocytic response. Histopathology. **55**:414–22.

Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. Nature. **480**:480-9.

Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, et al (2015) Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. Oncotarget. **6**(9):7209-20.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol. **27**:16–25.

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J Clin Oncol. **29**(6):610-8.

Modrich P (1991a) Mechanisms and biological effects of mismatch repair. Annu Rev Genet. **25**:229-53.

Modrich P (1991b) Methyl-directed DNA mismatch correction. J Biol Chem. **264**(12):6597-600.

Modrich P, Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. Annu Rev Biochem. **65**:101-33.

Monges G, Fléjou JF (2010) Anatomie pathologique du cancer du pancréas. In Delpero JR, Paye F, Bachellier P. Cancer du Pancréas pp. 229-38. Monographies de l'AFC. (Ed. Arnette). ISBN: 978-2-7184-1240-5

Mulder I, Hoogenveen RT, van Genugten ML, et al (2002) Smoking cessation would substantially reduce the future incidence of pancreatic cancer in the European Union. Eur J Gastroenterol Hepatol. **14**(12):1343-53.

Murphy K, Travers P, Walport M (2008a) Pattern recognition in the innate immune system. In Janeway's Immunobiology 7th edition pp. 39–108. (Garland Science/Taylor and Francis Group, NY, USA).

Murphy K, Travers P, Walport M (2008b) Principles of innate and adaptive immunity. In Janeway's Immunobiology 7th edition pp. 1–38. (Garland Science/Taylor and Francis Group, NY, USA).

Murphy K, Travers P, Walport M (2008c) Structural variation in immunoglobulin constant regions. In Janeway's Immunobiology 7th edition pp. 143–213. (Garland Science/Taylor and Francis Group, NY, USA).

Nagasaka T, Rhees J, Kloor M, et al (2010) Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch syndrome colorectal cancers. Cancer Res. **70**:3098-108.

Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, et al (2002a) Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. Clin Cancer Res. **8**(8):2536-40.

Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, et al (2003) Negative hMSH2 protein expression in pancreatic carcinoma may predict a better prognosis of patients. Oncol Rep. **10**(4):997-1000.

Nakata B, Yashiro M, Nishioka N, et al (2002b) Very low incidence of microsatellite instability in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. Int J Cancer. **102**:655-9.

Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, et al (2001) Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. Lancet. **358**:1576-85.

Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al (2017) Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet. **389**:1011-24.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al (2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. N Engl J Med. **350**:1200-10.

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature. **371**:75-80.

Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, et al (2006) Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. Gut. **55**:1781-8.

Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, et al (2009) Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are frequent cause of Lynch syndrome. Genes Chromosomes Cancer. **48**:737-44.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity. **11**:141–51.

Nissim S, Idos GE, Wu B (2012) Genetic markers of malignant transformation in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas : a meta-analysis. Pancreas. **41**:1195-205.

Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, et al (2013) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. JAMA. **310**:1473-81.

Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. JAMA. **297**:267-77.

Okazaki T, Honjo T (2007) PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol. **19**:813–24.

Oliveira C, Pinto M, Duval A, et al (2003) BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. Oncogene. **22**:9192-96.

Ottenhof NA, Morsink FH, Ten Kate F, et al (2012) Multivariate analysis of immunohistochemical evaluation of protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma reveals prognostic significance for persistent Smad4 expression only. Cell Oncol (Dordr). **35**(2):119-26.

Ouyang H, Furukawa T, Abe T, et al (1998) The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. Clin Cancer Res. **4**(4):1071-4.

Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, et al (1997) The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. Cancer Res. **57**(10):1851-4.

Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, et al (2008) Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. Am J Surg Pathol. **32**:1246-51.

Pages F, Berger A, Camus M, et al (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med. **25**:2654-66.

Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL (2016) The immune system in cancer pathogenesis: potential therapeutic approaches. J Immunol Res. **2016**:4273943.

Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nature. **2012**:1-13.

Parkin DM (2011) Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. Br J Cancer. **105**:S6-S13.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al (2005) CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol. **25**:9543–53.

Partenski C, Saurin JC, Gincul R (2015) Epidémiologie, bases génétiques et épigénétiques de la carcinogenèse. In Adham M, Turrini O. Tumeurs Intracanalaires Papillaires et Mucineuses du Pancréas pp. 1-12. Monographies de l'AFC. (Ed. Arnette). ISBN : 978-2-7184-1378-5

Paye F, Micelli Lupinacci R, Bachellier P, et al (2015) Distal pancreatectomy for pancreatic carcinoma in the era of multimodal treatment. Br J Surg. **102**(3):229-36.

Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, et al (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. J Exp Med. **206**:1717–25.

Perucho M (1998) Correspondence to Boland CR. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. **58**:5248-57.

Perucho M (2003) Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. Oncogene. **22**:2223–35.

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, et al (2003) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA. **100**:8372-7.

Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, et al (2004) Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. Br J Surg. **91**:469–75.

Pinho SS, Reis CA (2015) Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nature Rev Cancer. **15**(9):540–55.

Piñol V, Castells A, Andreu M, et al (2005) Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. JAMA. **293**:1986-94.

Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, et al (2013) The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. Fam Cancer. **12**:175–80.

Podojil JR, Miller SD (2009) Molecular mechanisms of T cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. Immunol Rev. **229**(1):337–55.

Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M (2001) Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. Cancer Genet Cytogenet. **126**:85-96.

Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, et al (1999) Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. J Biol Chem. **274**:32368-75.

Riazy M, Kalloger SE, Sheffield BS, et al (2015) Mismatch repair status may predict response to adjuvant chemotherapy in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Mod Pathol. **28**(10):1383-89.

Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, et al (2005) Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. J Clin Oncol. **23**:8968-77.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al (2003) Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. N Engl J Med. **349**:247-57.

Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, et al (2003) Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. J Clin Immunol. **23**:415–23.

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A et al (2015) Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science. **348**:124–8.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al (1997) A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda Guidelines. J Natl Cancer Inst. **89**:1758–62.

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

Rosso T, Malvezzi M, Bosetti C, et al (2016) Cancer mortality in Europe, 1970-2009: an age, period, and cohort analysis. Eur J Cancer Prev. (In Press).

Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al (2010) Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. J Clin Oncol. **28**:466-74.

Royal RE, Levy C, Turner K, et al (2010) Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. J Immunother. **33**:828-33.

Rudd CE, Taylor A, Schneider H (2009) CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunol Rev. **229**:12-26.

Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, et al (2010) TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li–Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. J Med Genet. **47**:421–8.

Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N (2014) Pancreatic adenocarcinoma. N Engl J Med. **371**:1039-49.

Saeterdal I, Bjørheim J, Lislerud K, et al (2001a) Frameshiftmutation-derived peptides as tumorspecific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA. **98**:13255–60.

Saeterdal I, Gjertsen MK, Straten P, et al (2001b) A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8þ T cells. Cancer Immunol Immunother. **50**:469–76.

Salo-Mullen EE, O'Reilly EM, Kelsen DP, et al (2015) Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. Cancer. **121**:4382-88.

Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al (2000) Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. J Clin Oncol. **18** :2193-200.

Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al (2009) EUROCARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. Eur J Cancer. **45**:931-91.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al (2010) Defective Mismatch Repair as a predictive marker for lack of efficacy of Fluorouracil based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol. **28**:3219-26.

Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, et al (2014) Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual patient data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. J Clin Oncol. **32**:5S.

Schneider H, Downey J, Smith A, et al (2006) Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. Science. **313**:1972–75.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. **331**(6024):1565–70.

Schumacher TN, Schreiber RD (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. Science. **348**:69-74.

Schwartz RH (1992) Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell. **71**:1065-8.

Schwarz L, Lupinacci RM, Svrcek M, et al (2014) Para-aortic lymph node sampling in pancreatic head adenocarcinoma. Br J Surg. **101**(5):530-8.

Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al (2008) Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. Gastroenterology. **134**:988–97.

Scoazec JY, Couvelard A (2015) Anatomopathologie. In Adham M et Turrini O. Tumeurs Intracanalaires Papillaires et Mucineuses du Pancréas pp. 81-92. Monographies de l'AFC. (Ed. Arnette). ISBN : 978-2-7184-1378-5

Seliger B, Harders C, Lohmann S, et al (1998) Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. Eur J Immunol. **28**:122-33.

Seliger B, Harders C, Wollscheid U, et al (1996) Suppression of MHC class I antigens in oncogenic transformants: association with decreased recognition by cytotoxic T lymphocytes. Exp Hematol. **24**:1275-9.

Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, et al (2010) Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. Pathol Res Pract. **206**:1-8.

Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al (2008) The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. Gastroenterology. **135**:419-28.

Seymour AB, Hruban RH, Redston M, et al (1994) Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. **54**(10):2761-4.

Sharpe AH (2009) Mechanisms of costimulation. Immunol Rev. **229**(1):5–11.

Shia J, Ellis NA, Paty PB, et al (2003) Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. Am J Surg Pathol. **27**:1407–17.

Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al (2009) Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. Am J Surg Pathol. **33**(11):1639-45.

Shrikhande SV, Kleeff J, Reiser C, et al (2007) Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma. Ann Surg Oncol. **14**:118-27.

Shunyakov L, Ryan CK, Sahasrabudhe DM, Khorana AA (2004) The influence of host response on colorectal cancer prognosis. Clin Colorectal Cancer. **1**:38-45.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics. CA Cancer J Clin. **66**:7–30.

Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al (2011) DNA Mismatch Repair Status and colon cancerrecurrence and survival in clinical trials of 5-Fluorouracil-based adjuvant therapy. J Natl Cancer Inst. **103**:863-75.

Sinicrope FA, Sargent DJ (2009) Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. Curr Opin Oncol. **4**:369-73.

Sinicrope FA, Sargent DJ (2012) Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. Clin Cancer Res. **18**:1506-12.

Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, et al (2009) Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. Oncol Rep. **21**:1235-41.

Slim K, Blay JY, Brouquet A, et al (2009) Cancérologie digestive : pratiques chirurgicales. Recommandations de la SFCD et de l'ACHBT. J Chir (Paris). **146**:S11-80.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds.) (2009) TNM Classification of Malignant Tumours 7th Edition. (Wiley Blackwell).

Spanknebel K, Conlon KC (2001) Advances in the surgical management of pancreatic cancer. Cancer J. **7**:312-23.

Sparr JA, Bandipalliam P, Redston MS, Syngal S (2009) Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas with loss of mismatch repair in a patient with Lynch syndrome. Am J Surg Pathol. **33**(2):309-12.

Stadler ZK, Battaglin F1, Middha S, et al (2016) Reliable Detection of Mismatch Repair Deficiency in Colorectal Cancers Using Mutational Load in Next-Generation Sequencing Panels. J Clin Oncol. **34**(18):2141-7.

Stauss HJ, Van Waes C, Fink MA, et al (1986) Identification of a unique tumor antigen as rejection antigen by molecular cloning and gene transfer. J Exp Med. **164**:1516-30.

Sud A, Wham D, Catalano M, et al (2014) Promising outcomes of screening for pancreatic cancer by genetic testing and endoscopic ultrasound. Pancreas. **43**:458–61.

Sun JC, Lanier LL (2009) Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? Eur J Immunol. **39**(8):2059–64.

Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using 5 quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology. **123**:1804-11.

Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al (2010) Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother. **5**:653-61.

Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin Cancer Res. **20**:5064-74.

Teiblum S, Thygesen LC, Johansen C (2009) Sixty-one years of pancreatic cancer in Denmark from 1943 to 2003: a nationwide study. Pancreas. **38**(4):374-8.

Tempero MA, Jacobs MM, Lynch HT, et al (1984) Serum and hair selenium levels in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Biol Trace Element Res. **6**:51–5.

Terme M, Ullrich E, Aymeric L, et al (2011) IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. Cancer Res. **71**:5393–9.

Titu LV, Monson JR, Greenman J (2002) The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother. **5**:235-47.

Toh J, Chapuis PH, Bokey L, et al (2017) Competing risks analysis of microsatellite instability as a prognostic factor in colorectal cancer. Br J Surg. **104**:1250-9.

Tomaszewska R, Okoń K, Stachura J (2003) Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. Pol J Pathol. **54**(1):31-7.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell. **27**:450–61.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. **366**:2443-54.

Tran B, Moore S, Zogopoulos G, et al (2012) Platinum-based chemotherapy in pancreatic adenocarcinoma associated with BRCA mutations: a translational case series. J Clin Oncol. **30**:Abstract 217.

Truninger K, Menigatti M, Luz J, et al (2005) Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. Gastroenterology. **128**:1160-71.

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al (2001) B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. J Exp Med. **193**:839–46.

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al (2014) PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. **515**:568-71.

Turati F, Edefonti V, Bosetti C, et al (2013) Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case-control studies. Ann Oncol. **24**:2651-56.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al (2000) Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. **60**(7):1835-9.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. **96**:261-8.

Van Laethem JL, Hammel P, Mornex F, et al (2010) Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study. J Clin Oncol. **28**:4450-6.

Vargas R, Nino-Murcia M, Trueblood W, et al (2004) MDCT in pancreatic adenocarcinome : prediction of vascular invasion and resecability using a multiphasic technique with curved planar reformations. Am J Roentgenol. **182**:419-25.

Vasen HF, Möslein G, Alonso A, et al (2007) Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). J Med Genet. **2007** 44(6):353-62.

Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICGHNPCC). Dis Colon Rectum. **34**:424–5.

Vasen HFA, Stomorken A, Menko FH, et al (2001) MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. J Clin Oncol. **19**:4074–80.

Vasen HFA, Watson P, Mecklin J, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology. **116**(6):1453‑6.

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, et al (1998) Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. Proc Natl Acad Sci USA. **95**:8698-702.

Velu V, Titanji K, Zhu B, et al (2009) Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. Nature. **458**:206–10.

Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Swiderski C, et al (1998) Novel mutations in the polyadenine tract of the transforming growth factor beta type II receptor gene are found in a subpopulation of human pancreatic adenocarcinomas. Genes Chromosomes Cancer. **22**(2):138-44.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. Ann Rev Immunol. **29**:235–71.

Vonderheide RH, Bayne LJ (2013) Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma. Curr Opin Immunol. **25**(2):200-5.

Voong KR, Davison J, Pawlik TM, et al (2010) Resected pancreatic adenosquamous carcinoma : clinicopathologic review and evaluation of adjuvant chemotherapy and radiation in 38 patients. Hum Pathol. **41**:113-22.

Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature. **518**:495-501.

Warrington R, Watson W, Kim H, Antonetti F (2011) An introduction to immunology and immunopathology. Allergy Asthma Clin Immunol. **7**:S1.

Warth A, Körner S, Penzel R, et al (2016) Microsatellite instability in pulmonary adenocarcinomas: a comprehensive study of 480 cases. Virchows Arch. **468**(3):313-9.

Warthin AS (1913) Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895–1913. Arch Intern Med. **12**:546–55.

Watson P, Lynch HT (1993) Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer. **71**:677–85.

Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, et al (2008) The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. Int J Cancer. **123**:444–9.

Wilentz RE, Goggins M, Redston M, et al (2000) Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. Am J Pathol. **156**(5):1641-51.

Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, et al (2014) Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). J Med Genet. **51**(6):355-65.

Win AK, Lindor NM, Young JP, et al (2012) Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in Lynch syndrome. J Natl Cancer Inst. **104**:1363-72.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science. 322:271–5.

Winograd R, Byrne KT, Evans RA, et al (2015) Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. Cancer Immunol Res. **3**:399-411.

Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, et al (2006) 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. J Gastrointest Surg. **10**:1199-210.

Woerner SM, Yuan YP, Benner A, et al (2010) SelTarbase, a database of human mononucleotide microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. Nucleic Acids Res. **38**(Database issue): D682–D689. (disponible sur : www.seltarbase.org).

Wolf B, Gruber S, Henglmueller S, et al (2006) Efficiency of the revised Bethesda guidelines (2003) for the detection of mutations in mismatch repair genes in Austrian HNPCC patients. Int J Cancer. **118**:1465-70.

Wu J, Matthaei H, Maitra A, et al (2011) Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. Sci Transl Med. **3**:92ra66.

Yamamoto H, Imai K, Perucho M (2002) Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. J Gastroenterol. **37**:153–63.

Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, et al (2001a) Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. Cancer Res. **61**(7):3139-44.

Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M (2001b) Somatic mutation of the b2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. Gastroenterology. **120**:1565–7.

Yao S, Zhu Y, Chen L (2013) Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nature. **2013**:1-17.

Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM (2013) Precancerous lesions of the pancreas. Best Pract Res Clin Gastroenterol. **27**:299-322.

Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nature Rev Immunol. **8**:467-77.

VII. ANNEXES

A. Classification OMS

B. Articles cités dans la these

Para-aortic lymph node sampling in pancreatic head carcinoma (*Br J Surg 2014*)

Distal pancreatectomie for pancreatic carcinoma in the era of multimodal treatment (*Br J Surg 2015*)

WHO 2010 Classification of Epithelial Tumors of the Pancreas

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds.) 2010 WHO Classification of tumors of the digestive system. Lyon, IARC

BENIGN

8551/0 Acinar cell cystadenoma

8441/0 Serous cystadenoma

PREMALIGNANT LESIONS

8148/2 Pancreatic intraepithelial neoplasia, grade 3 (PanIN-3)

8453/0 Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with low or intermediate grade dysplasia

8453/2 Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with high grade dysplasia

8503/2 Intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN)

8470/0 Mucinous cystic neoplasm (MCN) with low or intermediate grade dysplasia

8470/2 Mucinous cystic neoplasm (MCN) with high grade dysplasia

MaALIGNANT LESIONS

8500/3 Ductal adenocarcinoma

8560/3 Adenosquamous carcinoma

8480/3 Mucinous adenocarcinoma

8576/3 Hepatoid carcinoma

8510/3 Medullary carcinoma

8490/3 Signet ring cell carcinoma

8020/3 Undifferentiated carcinoma

8035/3 Undifferentiated carcinoma with osteoclast-like cells

8550/3 Acinar cell carcinoma

8551/3 Acinar cell cystadenocarcinoma

8453/3 Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) with an associated invasive carcinoma

8552/3 Mixed acinar ductal carcinoma

8154/3 Mixed acinar neuroendocrine carcinoma

8154/3 Mixed acinar neuroendocrine ductal carcinoma

8154/3 Mixed ductal neuroendocrine carcinoma

8470/3 Mucinous cystic neoplasm (MCN) with an associated invasive carcinoma

8971/3 Pancreatoblastoma

8441/3 Serous cystadenocarcinoma

8452/3 Solid pseudopapillary neoplasm

Original article

Distal pancreatectomy for pancreatic carcinoma in the era of multimodal treatment

F. Paye[1,2], R. Micelli Lupinacci[1], P. Bachellier[3], J.-M. Boher[4] and J.-R. Delpero[5] on behalf of the French Surgical Association (AFC)

[1]Department of Digestive Surgery, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Antoine, and [2]Université Pierre et Marie Curie Paris 06, Paris, [3]Centre of Visceral Surgery and Transplantation, Hôpital de Hautepierre, Université Louis Pasteur, Strasbourg, and Departments of [4]Biostatistics and [5]Surgery, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

Correspondence to: Professor F. Paye, Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint Antoine, 184 Rue du Faubourg Saint Antoine, 75012 Paris, France (e-mail: francois.paye@sat.aphp.fr)

Background: Recent publications have suggested improvements in the outcome of distal pancreatectomy (DP) for cancer, but the series were small and heterogeneous. The aim of the present study was to assess perioperative and long-term outcomes of DP for pancreatic adenocarcinoma in the era of multimodal treatment in a major European country.

Methods: This was a nationwide study of all patients undergoing DP for pancreatic adenocarcinoma between 2004 and 2009 in 28 centres in France. Postoperative and long-term outcomes were assessed retrospectively and outcome predictors were explored by multivariable analysis.

Results: A total of 278 patients were enrolled. Multivisceral resections were performed in 58 patients (20·9 per cent), venous resections in 33 (11·9 per cent) and arterial resections in 11 (4·0 per cent). Neoadjuvant chemoradiotherapy was used in 20 patients. Postoperative complications occurred in 96 patients (34·5 per cent) and pancreatic fistulas developed in 76 (27·3 per cent). The postoperative 90-day mortality rate was 5·0 per cent. In univariable analysis, multivisceral resection was the only factor associated with postoperative morbidity ($P = 0·048$). Age 65 years or less, body mass index of at least 30 kg/m^2 and absence of preoperative chemoradiotherapy were associated with an increased risk of pancreatic fistula in multivariable analysis. Overall survival rates at 3 and 5 years were 44·9 and 29·5 per cent respectively. In multivariable analysis, only the presence of lymph node metastases was associated with poorer overall survival.

Conclusion: Postoperative morbidity and mortality associated with pancreatic fistula remain considerable after DP, but both short- and long-term survival have improved markedly.

Presented to the 112th Annual Meeting of the French Surgical Association, Paris, France, October 2010

Paper accepted 16 October 2014

Published online 22 December 2014 in Wiley Online Library (www.bjs.co.uk). **DOI:** 10.1002/bjs.9708

Introduction

Distal pancreatectomy (DP) with splenectomy is the standard treatment with curative intent for left-sided pancreatic adenocarcinoma. However, at diagnosis, only 10–15 per cent of patients have a resectable tumour[1,2]. Advances in diagnostic tools, operative techniques and perioperative care have improved resectability of such tumours, but reported 5-year survival rates after resection remain disappointing, ranging from 10 to 29 per cent[3–5].

The largest available series[6–9] reporting perioperative and long-term outcome of DP either include tumours other than pancreatic adenocarcinoma such as endocrine tumours, or include all pancreatic adenocarcinomas regardless of location. Thus, specific postoperative morbidity and long-term prognosis after DP for pancreatic invasive carcinoma remain poorly studied. The aim of this study was to assess perioperative and long-term outcomes, identifying prognostic factors for long-term survival, in a large multicentre Western series of DP for pancreatic adenocarcinoma.

Methods

A database was built for a national survey on oncological pancreatic surgery, including 28 centres, directed by the

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

French Surgical Association. Data were collected by retrospective review of hospital records from January 2004 to December 2008, and from a prospective survey conducted in 2009. All patients undergoing DP for pancreatic adenocarcinoma in participating centres between 2004 and 2009 were included. No more than three surgeons per centre performed the resections. Demographic data, operative and pathological findings, postoperative and long-term outcomes were collected.

Neoadjuvant chemoradiation was delivered at a total dose of 45 Gy administered in fractions of 1·8 Gy five times weekly with concurrent chemotherapy by continuous infusion of 5-fluorouracil (5-FU) (650 mg/m^2 on days 1–5 and days 21–25), supplemented with a cisplatin bolus (80 mg per day per m^2 on days 2 and 22) in two centres. Neoadjuvant chemotherapy was based on either 5-FU–leucovorin or 5-FU–oxaliplatin (FOLFOX) regimens and lasted from 3 to 6 months. Intraoperative data included concomitant splenectomy, extended visceral and/or vascular resections, texture of pancreatic parenchyma (graded by the surgeon as soft, normal or hard), site of pancreatic transection (neck *versus* body), technique of suture of the pancreatic remnant (stapler or suture), perioperative transfusions and prophylactic use of somatostatin analogues. Multivisceral resections were defined as simultaneous resections of organs other than pancreas and spleen (including colon, kidney, liver, adrenal gland, stomach).

Postoperative mortality took into account all deaths occurring during the first 90 days after surgery. Major and minor postoperative complications were classified according to the Dindo–Clavien classification[10]. Pancreatic fistulas (PF) were defined and graded according to international consensus as any amylase-rich fluid (amylase concentration greater than 3 times the serum concentration) after postoperative day 3, either collected by postoperative puncture of an abdominal collection or in the effluent of surgical drains[11]. In addition, intra-abdominal collections or abscesses in the absence of any other proven anastomotic leak were considered as secondary to PF. Postoperative bleeding was defined according to international consensus[12]. Oncological quality of resection was established by both the surgeon (for R2 resections) and the pathologist (for R0 or R1 resections). Because of the retrospective design of the study, patients were vaccinated against pneumococcus either before or after surgery (minimum delay of 4 weeks after surgery) and there was no strict standardization of surgical approach or technique (exploratory laparoscopy performed at the same session before definitive open surgery, use of radical antegrade modular resection[13], technique of pancreatic stump closure, drainage) or of pathological examination among participating centres. Thus, inking of the retroperitoneal margin and radial margin assessment were not done systematically. An R1 margin was defined as tumour-free margin of less than 1 mm.

Considering the lack of available consensus in the literature about the minimum number of lymph nodes to be assessed in DP for pancreatic adenocarcinoma, all patients without evidence of lymph node metastasis were classified as N0 whatever the number of examined nodes. When used, adjuvant therapy lasted 6 months and was based on gemcitabine or 5-FU and leucovorin according to available evidence[14,15].

Statistical analysis

Results are presented as median (range) unless indicated otherwise. Univariable associations between clinicopathological variables, surgical data and outcome parameters were examined using the χ^2 test and/or logistic regression analysis as appropriate. Factors independently associated with complications, occurrence of PF and mortality were identified by multiple logistic regression analysis that included all variables with $P < 0{\cdot}100$ in univariable analysis. Survival curves were constructed using the Kaplan–Meier method, and compared by means of the log rank test. A Cox proportional hazards regression model was used to identify factors independently associated with overall survival. Overall survival was calculated from the date of pancreatic resection. All deaths from any cause were included in this analysis. Two-sided statistical tests were used and a difference was considered statistically significant at $P < 0{\cdot}050$. Patients with missing data were excluded from analyses for each of the studied criteria and numbers of patients included in the analyses are shown. Statistical analysis was performed with SPSS® for Windows® version 20.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

Results

A total of 301 patients who had DP were enrolled in the study. Twenty-three patients were excluded because DP was undertaken for tumours other than pancreatic adenocarcinoma. Data for the remaining 278 patients (median age 64 (22–90) years) who were treated by DP for invasive pancreatic ductal adenocarcinoma were analysed (*Table 1*).

Intraoperative and pathological findings

Exploratory laparoscopy was performed in 45 patients (16·2 per cent), followed immediately by an attempt at laparoscopic resection in 15 patients, with conversion

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 1 Demographic data and intraoperative findings

	No. of patients
Age > 65 years	134 of 276 (48·6)
Body mass index ≥ 30 kg/m^2	21 of 225 (9·3)
Men	125 of 278 (45·0)
ASA fitness grade III or IV	42 of 238 (17·6)
Diabetes	47 of 255 (18·4)
Neoadjuvant treatment	*n* = 278
Chemotherapy	19 (6·8)
Chemoradiation	20 (7·2)
Centre volume (< 10 resections/year)	103 of 278 (37·1)
Type of resection	*n* = 278
DP + splenectomy	254 (91·4)
SPDP	24 (8·6)
Pancreatic consistency	*n* = 224
Soft	29 (12·9)
Normal	136 (60·7)
Fibrous/hard	59 (26·3)
Arterial resection*	11 of 278 (4·0)
Venous resection†	33 of 260 (12·7)
Multivisceral resection	58 of 263 (22·1)
Intraoperative RBC transfusion ≥ 2 units	12 of 241 (5·0)
Pancreatic remnant closure	*n* = 247
Stapler	54 (21·9)
Suture	193 (78·1)
Drainage of pancreatic stump	260 of 273 (95·2)

Values in parentheses are percentages. Information on studied criteria was not available for all patients. *Resection of coeliac trunks (8 patients), hepatic arteries (2), superior mesenteric artery (1). †Resection of portal or superior mesenteric veins. ASA, American Society of Anesthesiologists; DP, distal pancreatectomy; SPDP, spleen-preserving distal pancreatectomy; RBC, red blood cell.

Table 2 Pathological data

	No. of patients
Tumour size (cm)	*n* = 254
≤ 3·0	35 (13·7)
> 3·0	219 (86·3)
Tumour differentiation	*n* = 227
Poor	39 (17·2)
Moderate/well	188 (82·8)
Tumour category	*n* = 261
T0	2 (0·8)
T1	20 (7·7)
T2	38 (14·6)
T3	166 (63·6)
T4	35 (13·4)
Nodal status	*n* = 260
N0	109 (41·9)
N1	151 (58·1)
TNM stage*	*n* = 259
I	37 (14·3)
II	153 (59·1)
III	25 (9·7)
IV	44 (17·0)
Microscopic vascular emboli	*n* = 247
Yes	128 (51·8)
No	119 (48·2)
Perineural invasion	*n* = 244
Yes	173 (70·9)
No	71 (29·1)
Margin status	*n* = 274
R0	205 (74·8)
R1 or R2	69 (25·2)

Values in parentheses are percentages. Information on histological characteristics was not available for all patients. *International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer, 7th edition (2009)[16].

to laparotomy in six. The spleen was preserved in 24 patients (8·6 per cent). In half of these spleen-preserving DPs, the tumour was located in the central part of the pancreas. Multivisceral resections were carried out in 58 patients (20·9 per cent) to achieve macroscopically complete resection. In 26 of these 58 patients, two or more organs (other than pancreas) were involved. Vascular resections were performed in 39 patients. There were 33 venous resections (11·9 per cent) (portal and/or superior mesenteric vein) and 11 arterial resections (4·0 per cent) (8 coeliac trunk resections during Appleby procedures preserving the stomach and performed without preoperative hepatic artery embolization, 2 hepatic arteries, 1 superior mesenteric artery) (*Table 1*). Five patients had concomitant arterial and venous resections.

Two of the 20 patients who underwent neoadjuvant chemoradiotherapy had a complete pathological response (*Table 2*). The median number of examined lymph nodes was 17 (0–46) per patient; 27·1 per cent of pathological examinations reported fewer than ten examined nodes per patient. The median number of lymph nodes harvested was 8 (range 0–22) when the spleen was preserved, significantly lower than the median of 15 (range 4–46) in operations with associated splenectomy ($P = 0·002$), but this had no significant effect on overall survival.

Postoperative morbidity and mortality

Ninety-six patients (34·5 per cent) developed postoperative complications. PF prophylaxis with somatostatin or analogues was used in 96 (38·1 per cent) of 252 patients for whom such data were available. PF occurred in 76 patients (27·3 per cent). Its incidence was not reduced by the use of somatostatin (analogue) prophylaxis ($P = 0·485$). In 45 patients (16·2 per cent), complications (whether medical or surgical) were classified as major (Dindo–Clavien grade III or more). Postoperative complications required relaparotomy in 21 patients (7·6 per cent). Postoperative bleeding and PF/pancreatic abscess formation were the most frequent indications for reoperation. Postoperative intra-abdominal bleeding requiring specific intervention was observed in 12 patients (4·3 per cent); surgical and

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 3 Univariable and multivariable analyses to identify risk factors for pancreatic fistula

			Univariable analysis*		Multivariable analysis†	
	n	No. with pancreatic fistula	Odds ratio	*P*	Odds ratio	*P*
Age (years)				0·002		< 0·001
≤ 65	131	49	2·36 (1·36, 4·11)		3·28 (1·71, 6·27)	
> 65	134	27	1·00 (reference)		1·00 (reference)	
Sex				0·965		
M	118	34	1·01(0·59, 1·73)			
F	147	42	1·00 (reference)			
ASA fitness grade				0·643		
I or II	188	56	0·84 (0·39, 1·78)			
III or IV	42	11	1·00 (reference)			
Body mass index (kg/m^2)				0·022		0·049
≥ 30	20	10	2·96 (1·16, 7·52)		2·69 (1·01, 7·21)	
< 30	195	49	1·00 (reference)		1·00 (reference)	
Diabetes				0·912		
Yes	44	13	1·04 (0·51, 2·13)			
No	202	58	1·00 (reference)			
Any neoadjuvant therapy				0·121		
Yes	39	7	0·50 (0·21, 1·19)			
No	228	69	1·00 (reference)			
Neoadjuvant chemoradiation				0·031		0·038
Yes	20	1	0·12 (0·02, 0·92)		0·11 (0·01, 0·88)	
No	247	75	1·00 (reference)		1·00 (reference)	
Fibrous/hard pancreatic consistency						
Yes	56	12	1·81 (0·85, 4·11)	0·103		
No	151	50	1·00 (reference)			
Type of resection				0·607		
DP + splenectomy	246	69	1·28 (0·50, 3·31)			
SPDP	21	7	1·00 (reference)			
Drainage						
Yes	253	75	2·27 (0·49, 10·50)	0·293		
No	13	2	1·00 (reference)			
Pancreatic stump closure						
Handsewn	189	52	0·73 (0·37, 1·43)	0·369		
Stapled	50	25	1·00 (reference)			
Intraoperative RBC transfusion (units)				0·712		
≥ 2	12	4	1·26 (0·37, 4·34)			
< 2	222	63	1·00 (reference)			
Arterial resection				0·929		
Yes	11	3	0·94 (0·24, 3·64)			
No	256	73	1·00 (reference)			
Venous resection				0·333		
Yes	33	12	1·46 (0·68, 3·15)			
No	217	61	1·00 (reference)			
Multivisceral resection				0·539		
Yes	56	18	1·22 (0·64, 2·32)			
No	197	55	1·00 (reference)			

Values in parentheses are 95 per cent c.i. Information on studied criteria was not available for all patients. ASA, American Society of Anesthesiologists; DP, distal pancreatectomy; SPDP, spleen-preserving distal pancreatectomy; RBC, red blood cell. *χ^2 test; †multivariable logistic regression.

radiological embolizations were carried out in five and seven patients respectively. Two patients died in the first postoperative month (0·7 per cent) and the 90-day mortality rate was 5·0 per cent (14 deaths). One of the 11 patients who underwent arterial resection died after surgery.

Univariable logistic regression analysis failed to identify any preoperative or intraoperative factors associated with 90-day mortality. The need for a multivisceral resection was the only factor associated with postoperative morbidity in univariable analysis (odds ratio 1·82, 95 per cent c.i. 1·00 to 3·32; $P = 0·048$). Age 65 years or less, body mass index over 30 kg/m^2 and absence of preoperative radiotherapy were associated with an increased risk of pancreatic fistula in univariable and multivariable analyses (*Table 3*).

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

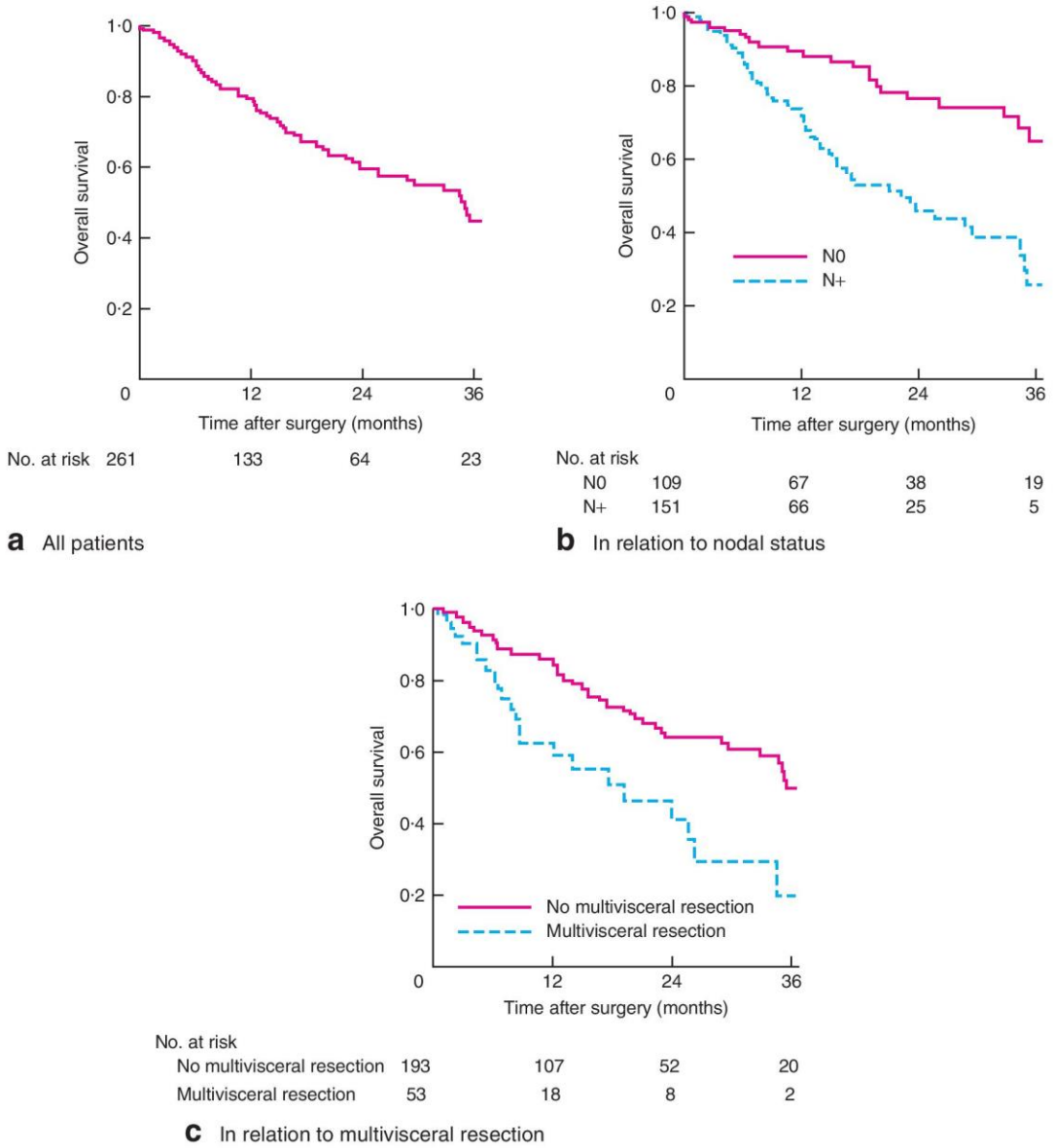


Fig. 1 Overall survival: **a** all patients, **b** impact of nodal status and **c** impact of multivisceral resection

Long-term outcome

All 261 patients with follow-up of 90 days or more were included in univariable and multivariable analyses of overall survival. Median overall survival was 35 (95 per cent c.i. 29·5 to 40·5) months. During follow-up, 86 patients died after a median survival of 12 (range 3–57) months, whereas 175 patients were alive with a median follow-up of 13 (range 3–67) months. Overall survival rates at 1, 2, 3 and 5 years were 80·2, 59·6, 44·9 and 29·5 per cent respectively (*Fig. 1*).

One-hundred and eighty-six patients (71·3 per cent) were treated with adjuvant chemotherapy. Among these, the chemotherapy regimen was specified in 175 patients and was mostly gemcitabine-based (147, 84·0 per cent).

In univariable analyses, age over 65 years, male sex, intraoperative red blood cell blood transfusion of at least 2 units, multivisceral resection, tumour size 4 cm or more, T category (International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer, 7th edition, 2009[16]), lymph node metastases and poor histological

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 4 Univariable and multivariable analyses to identify factors related to actuarial overall survival

		Overall survival (%)			Multivariable analysis†	
	n	1 year	3 years	Univariable *P**	Hazard ratio	*P*
Age (years)				0·050		0·220
≤ 65	131	83·6	49·1		0·70 (0·34, 1·23)	
> 65	128	76·5	39·6		1·00 (reference)	
Sex				0·037		0·069
M	120	74·3	40·7		1·68 (0·96, 2·94)	
F	139	82·6	47·1		1·00 (reference)	
ASA fitness grade				0·088		0·084
I or II	184	82·5	42·5		1·00 (reference)	
III or IV	40	67	24		1·71 (0·93, 3·12)	
Intraoperative RBC transfusion (units)				0·008		0·260
≥ 2	12	53	0		1·78 (0·65, 4·87)	
0–1	218	81·3	48·4		1·00 (reference)	
Multivisceral resection				0·002		0·102
Yes	53	62	20		1·73 (0·90, 3·36)	
No	193	85·7	49·7		1·00 (reference)	
Tumour size (cm)				0·006		0·499
≥ 4·0	161	75·3	30·1		1·00 (reference)	
< 4·0	93	87	63		0·82 (0·42, 1·53)	
Tumour category				0·021	1·08 (0·69, 1·70)	0·719
T0	2	100	100			
T1	20	94	94			
T2	38	85	37			
T3	166	82·3	38·2			
T4	35	57	37			
T0–2	60	88	62	0·141‡		
T3/4	201	78·3	39·2			
Nodal status				< 0·001		0·021
N0	109	89·3	64·7		1·00 (reference)	
N1/2	151	73·6	25·5		2·11 (1·12, 3·95)	
Tumour differentiation				0·004		0·227
Poor	39	59	26		1·50 (0·78, 2·92)	
Moderate/well	188	83·5	45·9		1·00 (reference)	

Values in parentheses are 95 per cent c.i. ASA, American Society of Anesthesiologists; RBC, red blood cell. *Log rank test; †Cox proportional hazards regression model. ‡T3/4 *versus* T0–2. The following factors were not significant in univariable analysis: body mass index, centre volume per year, neoadjuvant therapy, type of resection (with or without spleen preservation), arterial resection, venous resection, pancreatic fistula, tumour differentiation, vascular emboli (lymphatic or blood), perineural invasion, margin status (R1 *versus* R1/R2) and adjuvant treatment.

differentiation were significantly associated with poorer overall survival. In multivariable analysis only the presence of lymph node metastases remained independently associated with poorer overall survival (*Table 4*, *Fig. 1*). An R1 resection did not significantly alter overall survival ($P = 0·138$).

Discussion

The present multicentre study collected data on DP for pancreatic cancer in this millennium in France. Outcomes were compared with those of a similar French survey conducted about 20 years ago[17,18]. Postoperative morbidity in the present series was similar to that reported previously, whereas reoperation rates and mortality rates improved dramatically (now 5·0 per cent at 90 days *versus* 9 per cent at 30 days in the previous survey[17,18]). There are now long-term survivors, with an acceptable 5-year survival rate of 29·5 per cent.

The PF rate (27·3 per cent) and risk factors for fistula were comparable to those in previous series[19–21]. Obesity was significantly associated with PF formation in another study[22]. The lower rate of PF after preoperative radiotherapy in the present series confirms published findings[23]. The higher risk of PF in patients less than 65 years old might result from their greater pancreatic stump volume[24]. Neither diabetes[25], soft consistency of the pancreas, nor the use of staplers for pancreatic closure significantly affected PF rates, in keeping with a recent randomized trial[26] that showed no benefit from use of staplers compared with handsewn closure after DP. Finally, in contrast to a recent meta-analysis[27], the prophylactic use of somatostatin analogues in 38·1 per cent of patients was not associated with a lower PF rate.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Improved medical and radiological management of postoperative complications is likely to explain the reduced postoperative mortality, which did not result from inclusion of expert centres only. Indeed, ten of 28 participating centres performed fewer than ten pancreatic resections per year (DP and duodenopancreatectomies included). Median overall survival after DP reached 35 months here, compared with 9 months in the previous survey[18]; and 1-, 2- 3- and 5-year survival rates were 80·2, 59·6, 44·9 and 29·5 per cent respectively *versus* 38, 24, 12 and 0 per cent. These better long-term results might be related to improved patient selection by imaging, resulting in tumours frequently being smaller than 4 cm (36·6 *versus* 29 per cent), or by progressive adherence by most French pancreatic surgeons[28] to the oncological principles of the radical anterograde modular resection[13], with more frequent vascular and multivisceral resections and more microscopically complete (R0) resections. Alternatively, better management of surgical complications and wider use of more potent adjuvant therapies or neoadjuvant treatments[29] might explain the better results.

No preoperative criteria emerged from this series to contraindicate resection of a resectable tumour. Involvement of *en bloc* resected adjacent organs was not related to overall survival in multivariable analysis and did not preclude long-term survival. Likewise, resected macroscopic venous involvement of the mesentericoportal axis did not affect survival. Arterial resections (coeliac trunk or superior mesenteric artery) were performed too rarely in this series to draw reliable conclusions. Nodal involvement was the only independent predictor of poor overall survival, as in other series[17,30–32]. However, lymphatic involvement is rarely diagnosed before surgery and does not preclude some instances of long-term survival.

Owing to the multicentre and retrospective design of this study, the accuracy of preoperative radiological assessment was not evaluable and underestimation of postoperative morbidity was possible. Thus, the nearly 30 per cent rate of PF might actually reflect the incidence of grade B, C or D PF. The rates of N1 and R1 resections were also probably underestimated because of the lack of a systematic protocol for nodal assessment and inking of pancreatic margins[33]. Because of the short period of inclusion, only 3-year actuarial estimations of survival rates are likely to be reliable. The value of preoperative diagnostic laparoscopy, which was rarely performed, and of splenectomy, which was carried out almost systematically, could not be studied in this series. Finally, the place of laparoscopic DP, more frequently performed nowadays[34,35], could not be assessed as this series included mostly open surgery.

This large series of DP performed exclusively for pancreatic adenocarcinoma demonstrated a marked improvement in the results of surgical resection for left-sided pancreatic cancer over the past two decades. This was observed not only in dedicated pancreatic surgery units but also in a countrywide study that included smaller units, which may add to the external validity of the results.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

1 Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004; **91**: 586–594.

2 D'Souza MA, Shrikhande SV. Pancreatic resectional surgery: an evidence-based perspective. *J Cancer Res Ther* 2008; **4**: 77–83.

3 Schmidt CM, Powell ES, Yiannoutsos CT, Howard TJ, Wiebke EA, Wiesenauer CA *et al.* Pancreaticoduodenectomy: a 20-year experience in 516 patients. *Arch Surg* 2004; **139**: 718–725.

4 Bassi C, Falconi M, Salvia R, Mascetta G, Molinari E, Pederzoli P. Management of complications after pancreaticoduodenectomy in a high volume centre: results on 150 consecutive patients. *Dig Surg* 2001; **18**: 453–457.

5 Balcom JH IV, Rattner DW, Warshaw AL, Chang Y, Fernandez-del Castillo C. Ten-year experience with 733 pancreatic resections: changing indications, older patients, and decreasing length of hospitalization. *Arch Surg* 2001; **136**: 391–398.

6 Nathan H, Wolfgang CL, Edil BH, Choti MA, Herman JM, Schulick RD *et al.* Peri-operative mortality and long-term survival after total pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma: a population-based perspective. *J Surg Oncol* 2009; **99**: 87–92.

7 Christein JD, Kendrick ML, Iqbal CW, Nagorney DM, Farnell MB. Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *J Gastrointest Surg* 2005; **9**: 922–927.

8 Reeh M, Nentwich MF, Bogoevski D, Koenig AM, Gebauer F, Tachezy M *et al.* High surgical morbidity following distal pancreatectomy: still an unsolved problem. *World J Surg* 2011; **35**: 1110–1117.

9 Kleeff J, Diener MK, Z'Graggen K, Hinz U, Wagner M, Bachmann J *et al.* Distal pancreatectomy: risk factors for surgical failure in 302 consecutive cases. *Ann Surg* 2007; **245**: 573–582.

10 Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004; **240**: 205–213.

11 Bassi C, Dervenis C, Butturini G, Fingerhut A, Yeo C, Izbicki J *et al.* Postoperative pancreatic fistula: an

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

international study group (ISGPF) definition. *Surgery* 2005; **138**: 8–13.
12 Wente MN, Veit JA, Bassi C, Dervenis C, Fingerhut A, Gouma DJ *et al.* Postpancreatectomy hemorrhage (PPH): an International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS) definition. *Surgery* 2007; **142**: 20–25.
13 Strasberg SM, Drebin JA, Linehan D. Radical antegrade modular pancreatosplenectomy. *Surgery* 2003; **133**: 521–527.
14 Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1200–1210.
15 Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 2013; **310**: 1473–1481.
16 Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours* (7th edn). Wiley-Blackwell: Oxford, 2009.
17 Baumel H, Huguier M, Manderscheid JC, Fabre JM, Houry S, Fagot H. Results of resection for cancer of the exocrine pancreas: a study from the French Association of Surgery. *Br J Surg* 1994; **81**: 102–107.
18 Fabre JM, Houry S, Manderscheid JC, Huguier M, Baumel H. Surgery for left-sided pancreatic cancer. *Br J Surg* 1996; **83**: 1065–1070.
19 Zhou W, Lv R, Wang X, Mou Y, Cai X, Herr I. Stapler *vs* suture closure of pancreatic remnant after distal pancreatectomy: a meta-analysis. *Am J Surg* 2010; **200**: 529–536.
20 Jensen EH, Portschy PR, Chowaniec J, Teng M. Meta-analysis of bioabsorbable staple line reinforcement and risk of fistula following pancreatic resection. *J Gastrointest Surg* 2013; **17**: 267–272.
21 Ban D, Shimada K, Konishi M, Saiura A, Hashimoto M, Uesaka K. Stapler and nonstapler closure of the pancreatic remnant after distal pancreatectomy: multicenter retrospective analysis of 388 patients. *World J Surg* 2012; **36**: 1866–1873.
22 Rosso E, Casnedi S, Pessaux P, Oussoultzoglou E, Panaro F, Mahfud M *et al.* The role of 'fatty pancreas' and of BMI in the occurrence of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg* 2009; **13**: 1845–1851.
23 Takahashi H, Ogawa H, Ohigashi H, Gotoh K, Yamada T, Ohue M *et al.* Preoperative chemoradiation reduces the risk of pancreatic fistula after distal pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Surgery* 2011; **150**: 547–556.
24 Sugimoto M, Gotohda N, Kato Y, Takahashi S, Kinoshita T, Shibasaki H *et al.* Risk factor analysis and prevention of postoperative pancreatic fistula after distal pancreatectomy with stapler use. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; **20**: 538–544.
25 Malleo G, Mazzarella F, Malpaga A, Marchegiani G, Salvia R, Bassi C *et al.* Diabetes mellitus does not impact on clinically relevant pancreatic fistula after partial pancreatic resection for ductal adenocarcinoma. *Surgery* 2013; **153**: 641–650.
26 Diener MK, Seiler CM, Rossion I, Kleeff J, Glanemann M, Butturini G *et al.* Efficacy of stapler *versus* hand-sewn closure after distal pancreatectomy (DISPACT): a randomised, controlled multicentre trial. *Lancet* 2011; **377**: 1514–1522.
27 Gurusamy KS, Koti R, Fusai G, Davidson BR. Somatostatin analogues for pancreatic surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (4)CD008370.
28 Goasguen N, Regimbeau JM, Sauvanet A. [Distal pancreatectomy with 'centrifugal' dissection of splenic vessels.] *Ann Chir* 2003; **128**: 57–61.
29 Bickenbach KA, Gonen M, Tang LH, O'Reilly E, Goodman K, Brennan MF *et al.* Downstaging in pancreatic cancer: a matched analysis of patients resected following systemic treatment of initially locally unresectable disease. *Ann Surg Oncol* 2012; **19**: 1663–1669.
30 Goh BK, Tan YM, Cheow PC, Chung YF, Chow PK, Wong WK *et al.* Outcome of distal pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Dig Surg* 2008; **25**: 32–38.
31 Lillemoe KD, Kaushal S, Cameron JL, Sohn TA, Pitt HA, Yeo CJ. Distal pancreatectomy: indications and outcomes in 235 patients. *Ann Surg* 1999; **229**: 693–698.
32 Shimada K, Sakamoto Y, Sano T, Kosuge T. Prognostic factors after distal pancreatectomy with extended lymphadenectomy for invasive pancreatic adenocarcinoma of the body and tail. *Surgery* 2006; **139**: 288–295.
33 Delpero JR, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrere N *et al.* Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a French multicentre prospective evaluation of resection margins in 150 evaluable specimens. *HPB (Oxford)* 2012; **16**: 20–33.
34 Rosok BI, Marangos IP, Kazaryan AM, Rosseland AR, Buanes T, Mathisen O *et al.* Single-centre experience of laparoscopic pancreatic surgery. *Br J Surg* 2010; **97**: 902–909.
35 Kang CM, Chung YE, Jung MJ, Hwang HK, Choi SH, Lee WJ. Splenic vein thrombosis and pancreatic fistula after minimally invasive distal pancreatectomy. *Br J Surg* 2014; **101**: 114–119.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Original article

Para-aortic lymph node sampling in pancreatic head adenocarcinoma

L. Schwarz[1], R. M. Lupinacci[1], M. Svrcek[2,3], M. Lesurtel[5], M. Bubenheim[4], H. Vuarnesson[1], P. Balladur[1,3] and F. Paye[1,3]

Departments of [1]Digestive Surgery and [2]Pathology, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Saint Antoine Hospital, and [3]Pierre and Marie Curie University, Paris, and [4]Department of Biostatistics, Charles Nicolle Hospital, Rouen, France, and [5]Department of Surgery, Swiss Hepatopancreatobiliary Centre, University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland

Correspondence to: Professor F. Paye, Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint Antoine, 184 Rue du Faubourg Saint Antoine, F-75012 Paris, France (e-mail: francois.paye@sat.aphp.fr)

Background: **The significance of positive para-aortic nodes in patients with resectable pancreatic carcinoma is unclear. This study sought to evaluate the accuracy of intraoperative detection and prognostic significance of these lymph nodes in patients with resected adenocarcinoma of the pancreatic head.**

Methods: **From 2000 to 2010, para-aortic node sampling was performed prospectively in all patients before pancreatoduodenectomy. Frozen sections were created and nodes categorized as positive or negative for metastases. Surgeons were blinded to the frozen-section results. This was followed by standard histopathological assessment of corresponding paraffin-embedded, haematoxylin and eosin-stained material. Nodes considered uninvolved by this analysis were examined immunohistochemically for micrometastases.**

Results: **A total of 111 consecutive patients were included, with a median follow-up of 20·8 (range 1·5–126) months. The 1-, 2- and 5-year overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates were 73·6, 54·0 and 24·7 per cent, and 51·8, 28·1 and 18·8 per cent respectively. Para-aortic node involvement was always associated with peripancreatic lymph node metastasis, and was detected by frozen-section analysis in 12 patients and by haematoxylin and eosin staining in 17. Sensitivity and specificity of frozen-section examination for detecting para-aortic lymph node metastases were 71 and 100 per cent respectively. Median OS for patients with and without para-aortic node involvement on frozen-section analysis was 9·7 *versus* 28·5 months respectively ($P = 0·012$), and 15·7 *versus* 27·2 months ($P = 0·050$) when assessed by haematoxylin and eosin staining. Median DFS for patients with and without para-aortic node involvement on frozen-section examination was 5·6 *versus* 12·9 months respectively ($P = 0·041$), and 8·4 *versus* 12·9 months ($P = 0·038$) for haematoxylin and eosin analysis. The presence of micrometastases in para-aortic nodes was not significantly associated with altered OS or DFS.**

Conclusion: **Para-aortic node sampling with frozen-section examination detects distant lymphatic involvement reliably. It should be performed systematically. When metastases are found, they should be considered a contraindication to pancreatic resection.**

Presented to the Tenth World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Paris, France, July 2012

Paper accepted 10 January 2014

Published online in Wiley Online Library (www.bjs.co.uk). **DOI:** 10.1002/bjs.9444

Introduction

Pancreatic adenocarcinoma is the fourth most common cause of cancer-related death among men and women[1] in the USA, with an estimated 37 660 deaths in 2011 and incidence rates that have increased by around 1 per cent per year since 1998[2]. Although surgical resection remains the cornerstone of treatment[3], only 15 per cent of tumours are resectable. Median survival after resection ranges from 13 to 21 months, and the 5-year overall survival rate is around 20 per cent[4–7].

Lymph node involvement is the main prognostic factor in pancreatic cancer, with a reported prevalence of 65–86 per cent for patients undergoing resection[8–11]. Japanese

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

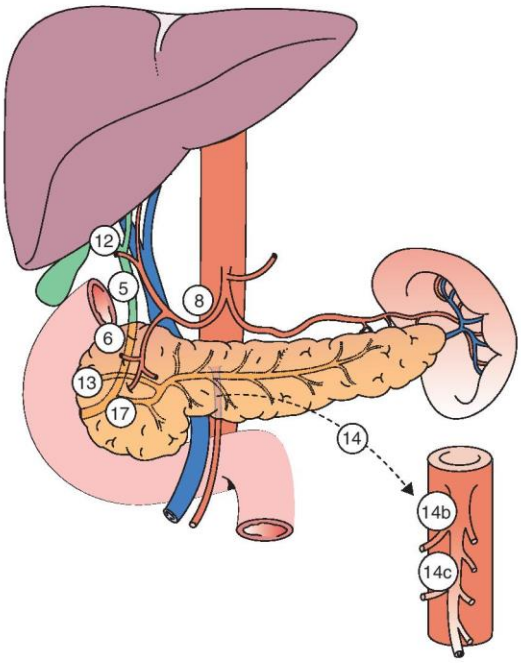


Fig. 1 Lymph nodes harvested by standard lymphadenectomy (according to the Japanese classification[16]). See text for further details

studies[9,10,12] have previously reported that peripancreatic nodes are the first to be involved. The para-aortic lymph nodes are involved later, via the lymphatic network surrounding the posterior pancreaticoduodenal, superior mesenteric and common hepatic arteries[9,12–14].

Para-aortic node involvement corresponds to 'distant metastasis' (M1) in the Japanese Pancreas Society Classification of Pancreatic Cancer[15,16]. Although Asian studies[14,17–21] have reported a correlation between distant lymph node involvement and decreased survival, para-aortic nodes are not harvested routinely in most European centres and their prognostic significance remains poorly studied.

Systematic para-aortic lymph node sampling can potentially provide an intraoperative assessment of distant node status and might help identify patients who may benefit from pancreatic resection. This sampling can be performed easily by harvesting the cellulolymphatic tissue located between the aorta and the vena cava below the left renal vein[22].

Looking for micrometastases in lymph nodes by immunohistochemistry improves staging and the prognostic assessment in other malignancies, notably breast cancer. The few published studies[23–25] on micrometastatic lymph node involvement in pancreatic cancer have yielded contradictory results, although no studies have analysed the impact of micrometastases in para-aortic nodes after pancreatic resection.

This study sought to assess the prognostic value of distant lymph node involvement (metastatic and/or micrometastatic) detected by systematic para-aortic lymph node sampling in patients undergoing pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. The main objective was to assess the impact of the presence of metastatic para-aortic lymph nodes based on frozen-section analysis on long-term overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) after pancreatoduodenectomy, to see whether a positive result should be considered a contraindication to pancreatic resection.

Secondary objectives were to establish the impact of positive para-aortic nodes confirmed or discovered by standard analysis of paraffin-embedded material on OS and DFS, and to calculate the prevalence of micrometastatic para-aortic node involvement and its impact on long-term OS and DFS.

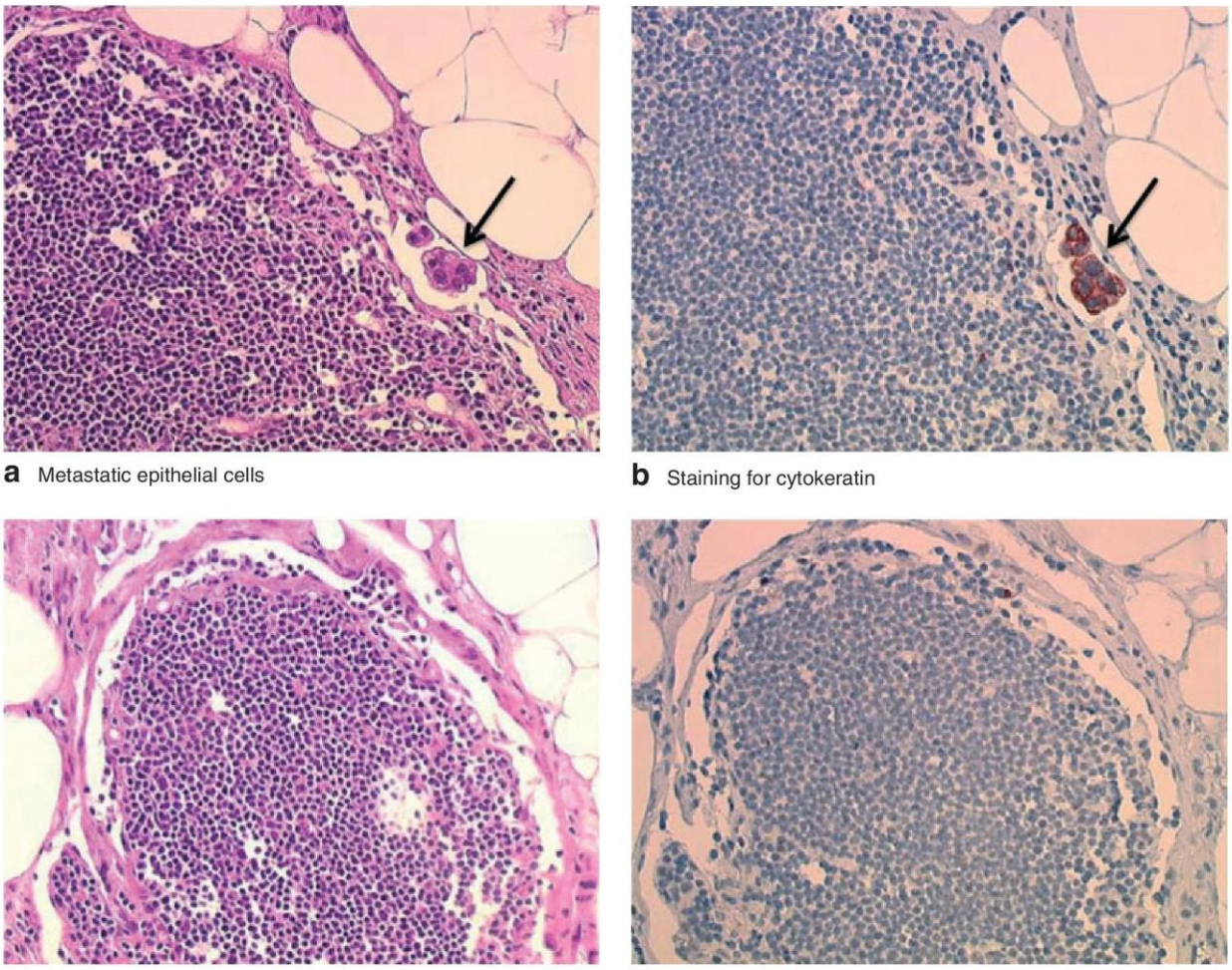
Methods

Consecutive patients undergoing pancreatoduodenectomy for adenocarcinoma (excluding neoadjuvant treatment) at Saint Antoine Hospital between 2000 and 2010 were included in a prospectively created database. This single-centre study was approved by the local independent ethics committee.

The preoperative evaluation included computed tomography (CT) of the chest and abdomen, and endoscopic ultrasonography. Non-circumferential involvement of the mesentericoportal venous axis was not considered a contraindication to resection. Preoperative biliary drainage was restricted to patients with acute cholangitis, renal failure or a serum bilirubin level above 250 μmol/l. Intraoperative suspicion of para-aortic lymph node involvement was not a contraindication to proceeding with resection.

Aortocaval nodes (group 16, according to the Japanese classification[16]) were sampled by harvesting a 5-cm portion of the lymphocellular aortocaval tissue located below the left renal vein. Frozen-section analysis was performed. Surgeons were blinded to the frozen-section results, so as not to influence any decision to proceed with an attempted curative resection. Pancreatoduodenectomy without pylorus preservation was performed in all patients. When necessary, venous resections were used to achieve a macroscopically complete resection. *En bloc* standard lymphadenectomy was performed systematically and included peripancreatic nodes (groups 13 and 17), nodes along the hepatic artery (group 8), hepatoduodenal

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd



a Metastatic epithelial cells

b Staining for cytokeratin

c Absence of tumour cells

d Negative immunohistochemical assessment

Fig. 2 a A small cluster of metastatic epithelial cells (arrow) in a para-aortic lymph node (haematoxylin and eosin staining, original magnification × 200). **b** This cluster of cells (arrow) stained positive for cytokeratin. Serial sectioning (performed after frozen-section analysis) did not show any tumour cells on **c** haematoxylin and eosin staining or **d** immunohistochemical assessment

ligament nodes (group 12), suprapyloric and infrapyloric nodes (groups 5 and 6), and lymphoneural tissue surrounding the right hemicircumference of the first 7 cm of the superior mesenteric artery (groups 14b and 14c) (*Fig. 1*).

Systematic inking of the venous, arterial and retroperitoneal margins with a standardized pathological assessment of all resection margins became routine in 2007 and was added to the protocol at that time. R0 resection was defined by the absence of tumour cells on all examined margins. All harvested nodes were examined by frozen-section analysis. Briefly, nodes were bisected along the longest axis after clearing away surrounding fat. The two halves were then frozen in a Shandon Cryomatrix™ (Thermo Electron Corporation, Cergy Pontoise, France); a section of each half was then stained with haematoxylin and eosin, and examined for the presence of metastases. The remaining tissue was fixed in formalin overnight. After paraffin embedding, a 4-μm thick section of each half was stained with haematoxylin and eosin solution. All frozen and paraffin-embedded samples were reviewed by a single pathologist.

Lymph node samples classified as negative above were then examined for micrometastases, according to the French guidelines for sentinel breast lymph nodes[26]. Each of the three sections created was first examined with conventional haematoxylin and eosin staining. Lymph nodes that were negative were further analysed

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 1 Clinical characteristics of included patients

	No. of patients ($n = 111$)
Mean(s.d.) age (years)	64·9(10·4)
Sex ratio (M : F)	67 : 44
ASA grade	
I	30 (27·0)
II	67 (60·4)
III	14 (12·6)
Adjuvant treatment	
Yes	69 (62·2)
No	42 (37·8)
Postoperative death (< 90 days)	3 (2·7)

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise. ASA, American Society of Anesthesiologists.

Table 2 Pathological characteristics of resected tumours

	No. of tumours ($n = 111$)
Tumour size (cm)*	3·0(1·1)
Tumour category	
T1	5 (4·5)
T2	25 (22·5)
T3	74 (66·7)
T4	7 (6·3)
Histological differentiation	
Well	60 (54·1)
Moderate	40 (36·0)
Poor	11 (9·9)
R1 resection	30 (27·0)
Before 2007	10 of 67 (15)
After 2007	20 of 44 (45)
Vascular invasion	20 (18·0)
Lymphovascular invasion	86 (77·5)
Perineural invasion	80 (72·1)
Lymph node involvement†	92 (82·9)
No. of analysed nodes	22 (7–68)
No. of involved nodes	3 (0–20)

Values in parentheses are percentages unless indicated otherwise; values are mean(s.d.) and †median (range).

immunohistochemically using their corresponding serial sections with KL1 pan cytokeratin antibody (dilution 1 : 50; Immunotech®, Marseilles, France). The KL1 assessment was considered to be positive when a given cluster contained at least two tumour cells (*Fig. 2*). Clusters with a single KL1-positive cell were considered negative. Micrometastases were defined as having a largest dimension of more than 0·2 mm and/or containing more than 200 cells. Malignant cell clusters of less than 0·2 mm and/or containing fewer than 200 cells were defined as isolated tumour cell clusters[27,28].

Isolated tumour cell clusters and micrometastases were subsequently pooled as positive results and referred to as micrometastatic clusters or micrometastatic para-aortic lymph node involvement.

Postoperative follow-up included regular physical examinations, CT of the chest and abdomen, and tumour marker assays (carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19–9). These examinations were performed every 4 months for the first 2 years and every 6 months thereafter. Follow-up data were completed via telephone interviews with patients, general practitioners and/or oncologists.

Statistical analysis

Yeo and colleagues[22] reported 3-year postpancreatoduodenectomy survival rates of 15 and 38 per cent in patients with positive and negative para-aortic lymph nodes respectively. The corresponding hazard ratio (HR) for this type of node involvement in an exponential model is 1·96. This value was used for power considerations in the present study. For a HR of at least 1·96 to be significant with a power of 80 per cent and a type I error of 5 per cent, at least 75 fatal events should occur during the whole follow-up period[29]. Assuming an 8 per cent lost-to-follow-up rate over a 3-year follow-up interval, at least 111 patients were required for the study.

Patient characteristics at baseline were compared using Fisher's exact test or Student's *t* test, as appropriate. OS and DFS were calculated. Estimates of survival probabilities were calculated using the Kaplan–Meier method; the log rank test was used to compare survival data. The threshold for statistical significance was set at $P < 0·050$. All statistical analyses were performed using SAS® version 9.2 software for Windows® (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

Results

One hundred and eleven consecutive patients were enrolled in the study. Their clinical and pathological characteristics are summarized in *Tables 1* and *2*. Of these patients, 92 (82·9 per cent) had N1 status (regional lymph node involvement). Systematic inking of the surgical specimen and standardized pathological investigation of the resection lines were performed in 44 patients (39·6 per cent), who had an R1 resection rate of 45 per cent. Three patients (2·7 per cent) died within 90 days of surgery. Sixty-nine patients (62·2 per cent) received 5-fluorouracil/folinic acid or gemcitabine-based adjuvant treatments.

After a median follow-up of 20·8 (range 1·5–126) months, disease recurred in 73 patients (65·8 per cent); median DFS was 12·4 (range 3–126) months. Long-term outcomes are detailed in *Table 3*. The 1-, 2- and 5-year survival rates for the whole series were 73·6, 54·0 and 24·7 per cent for OS, and 51·8, 28·1 and 18·8 per cent for DFS. Median OS was 26·3 (range 1·5–126) months.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

Table 3 Long-term outcomes

	Total ($n = 111$)	Haematoxylin and eosin staining: Positive ($n = 17$)	Haematoxylin and eosin staining: Negative ($n = 94$)
Recurrence	73 (65·8)	14 (82)	59 (63)
Site of recurrence			
Abdominal cavity (locoregional, peritoneum, lymph nodes)	27 of 73 (37)	4 of 14 (29)	23 of 59 (39)
Distant organ (liver, lungs, bones)	27 of 73 (37)	5 of 14 (36)	22 of 59 (37)
Both sites	19 of 73 (26)	5 of 14 (36)	14 of 59 (24)
Median survival (months)			
Disease-free	12·4	8·4	12·9
Overall	26·3	15·7	27·2

Values in parentheses are percentages.

Table 4 Lymph node status in patients with and without para-aortic lymph node involvement according to frozen-section analysis

	Frozen-section analysis: Positive ($n = 12$)	Frozen-section analysis: Negative ($n = 99$)	P*
Standard lymph node analysis			
No. of nodes	24·5(10·1)	22·6(9·9)	0·490
No. of positive nodes	9·0(4·9)	2·9(3·3)	< 0·001
Lymph node ratio	0·41(0·17)	0·14(0·16)	< 0·001
Para-aortic lymph node analysis			
No. of nodes	4·5(1·1)	2·9(1·3)	0·001
No. of positive nodes	2·1(0·7)	–	–

Values are mean(s.d.). *Student's t test.

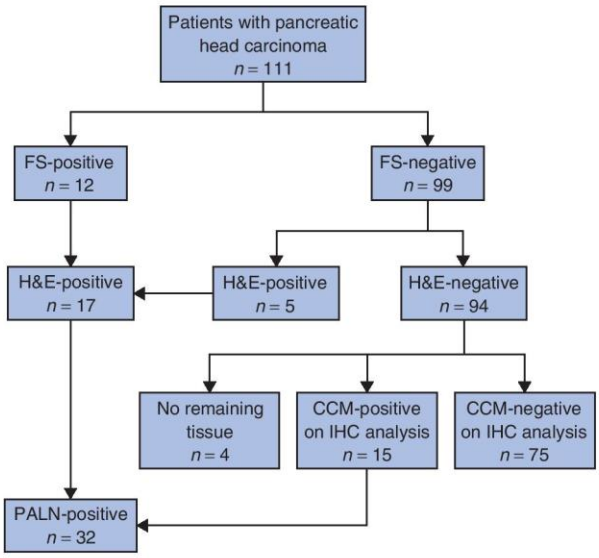


Fig. 3 Flow chart of para-aortic lymph node assessment. FS, frozen-section analysis; H&E, paraffin-embedded haematoxylin and eosin-stained section analysis; CCM, isolated tumour cell clusters or micrometastases; IHC, immunohistochemical; PALN-positive, macroscopic or micrometastatic para-aortic lymph node involvement

Para-aortic lymph node analysis

Frozen-section examination was positive in 12 patients (10·8 per cent). In five patients with negative frozen-section findings, the haematoxylin and eosin analysis revealed metastases in these nodes, creating a total of 17 patients (15·3 per cent) (*Fig. 3*). On the basis of macroscopic characteristics, during surgery the surgeon considered the para-aortic nodes to be involved in 22 patients, of which four were true-positive and 18 negative.

Sensitivity and specificity for detecting para-aortic lymph node metastasis by frozen-section examination that could be confirmed by conventional pathology laboratory techniques were 71 per cent (12 of 17) and 100 per cent respectively. Positive and negative predictive values were 100 per cent (12 of 12) and 95 per cent (94 of 99).

The mean(s.d.) number of identified para-aortic nodes per patient was 4·5(1·1) in the node-positive group and 2·9(1·3) in the node-negative group ($P = 0·001$) (*Table 4*).

Patients with and without para-aortic node involvement did not differ significantly in terms of clinical and pathological characteristics, other than lymph node involvement. Although these two groups did not differ with regard to the total number of harvested nodes as part of the *en bloc* main resection specimen, the number of metastatic nodes was significantly greater in patients with para-aortic node metastases detected by either frozen-section examination (9·0(4·9)) or haematoxylin and eosin staining (6·0(2·3)), compared with numbers in patients with uninvolved para-aortic nodes (2·9(3·3)) (*Table 4*).

Samples from 90 of the 94 patients without para-aortic node involvement after the final frozen-section and/or haematoxylin and eosin examination were subjected to immunohistochemical assessment (insufficient tissue was available in 4 patients). Clusters of micrometastatic cells were identified in 15 patients. Overall, 32 patients had metastatic or micrometastatic para-aortic lymph node involvement (*Fig. 3*).

Patients with positive para-aortic nodes identified by either frozen-section or haematoxylin and eosin examination had significantly worse survival than patients

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

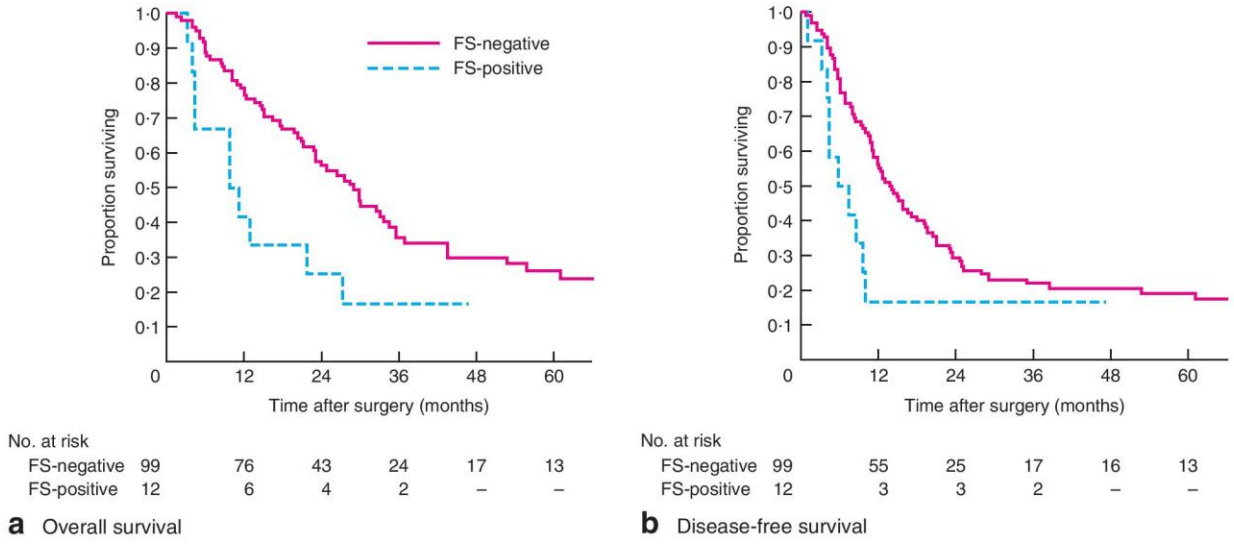


Fig. 4 **a** Overall and **b** disease-free survival in patients with positive and negative findings on frozen-section (FS) analysis of para-aortic lymph node samples. **a** $P = 0{\cdot}012$, **b** $P = 0{\cdot}041$ (log rank test)

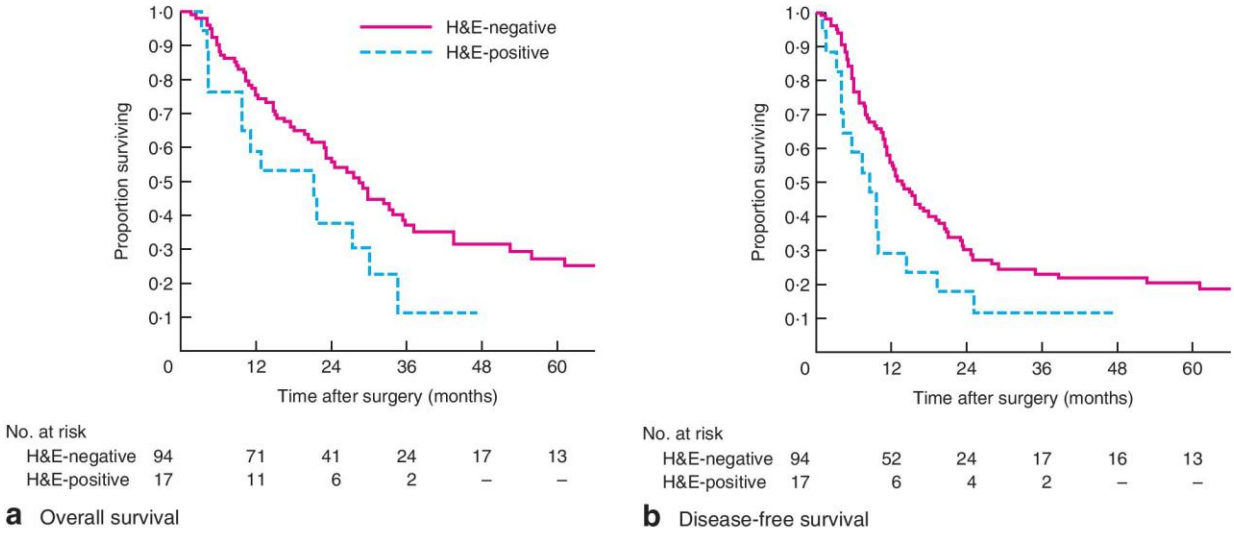


Fig. 5 **a** Overall and **b** disease-free survival in patients with positive and negative findings on paraffin-embedded haematoxylin and eosin (H&E)-stained section analysis of para-aortic lymph node samples. **a** $P = 0{\cdot}050$, **b** $P = 0{\cdot}038$ (log rank test)

who had clear nodes (*Figs 4* and *5*). Median OS for patients with and without para-aortic node involvement was 9·7 *versus* 28·5 months respectively ($P = 0{\cdot}012$) when judged by the frozen-section results and 15·7 *versus* 27·2 months ($P = 0{\cdot}050$) when judged by the haematoxylin and eosin findings. Similarly, median DFS for patients with and without para-artic node involvement was 5·6 *versus* 12·9 months ($P = 0{\cdot}041$) for frozen-section examination and 8·4 *versus* 12·9 months ($P = 0{\cdot}038$) for haematoxylin and eosin assessment.

Survival of patients with micrometastatic cell clusters did not differ significantly from that of patients without clusters. Median survival of patients with and without micrometastases in para-aortic lymph nodes was 14·6 *versus* 23·1 months ($P = 0{\cdot}310$) for OS, and 11·4 *versus* 14 months ($P = 0{\cdot}150$) for DFS.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

All patients with para-aortic node involvement by frozen-section and/or haematoxylin and eosin examination had positive peripancreatic nodes in the resected specimens. Median survival was better in patients judged to have N0 status than in those with node involvement (at any level): 37·0 *versus* 19·8 months respectively ($P = 0{\cdot}090$) for OS, and 24·8 *versus* 11·5 months ($P = 0{\cdot}028$) for DFS.

The implication of a poorer prognosis in patients with para-aortic node involvement compared with that in patients with isolated regional node involvement did not achieve statistical significance. Median OS and DFS in patients with regional lymph node involvement only, and in patients with both regional and para-aortic node involvement were 21·0 *versus* 15·1 months ($P = 0{\cdot}110$) and 12·7 *versus* 9·6 months ($P = 0{\cdot}120$) respectively.

Discussion

Para-aortic lymph node sampling and frozen-section analysis revealed the presence of node metastases in 10·8 per cent of patients and had a sensitivity of 71 per cent. Patients with para-aortic lymph node involvement detected by frozen-section analysis exhibited significantly poorer median OS (9·7 *versus* 28·5 months) and DFS (5·6 *versus* 12·9 months), compared with survival in patients with clear nodes. These results confirm those from earlier studies[13,20,30], where para-aortic node involvement was associated with 2-year survival rates of less than 14 per cent and very few 3-year survivors. These survival rates do not differ from those reported for locally advanced unresected pancreatic head adenocarcinoma[31–33]. In the present study, the prognosis of patients without node involvement detected by frozen-section or haematoxylin and eosin analysis was not significantly altered by finding micrometastases in the para-aortic nodes. At present, this extra assessment does not seem clinically relevant.

Preoperative diagnosis of para-aortic lymph node involvement in pancreatic cancer is challenging[34]. Imaging-based preoperative detection techniques, including [^{18}F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography, have yielded disappointing results[35,36]. Intraoperative systematic node sampling therefore appears attractive.

Para-aortic lymph node sampling was a simple and safe procedure that did not alter the postoperative course. Metastatic para-aortic nodes were detected by conventional techniques in 15·3 per cent of patients in the present series, similar to reported values seen with extended lymphadenectomy[13,14,18–21,30,37]. The small number of false negatives in the frozen-section analysis were due to the detection of metastases on further sections taken after examination of paraffin-embedded material, and not to erroneous frozen-section examination. The accuracy of frozen-section analysis might be improved further by increasing the number of sections examined routinely or by simultaneous touch preparation.

Retroperitoneal node involvement is the second step in the lymphatic spread of pancreatic cancer[30]. Patients with para-aortic lymph node involvement always had regional peripancreatic node involvement and higher numbers of regional metastatic lymph nodes. The Japan Pancreas Society classification considers para-aortic node involvement as M1 disease[15] and, although occasional long-term survivors have been described[30], all but two patients in the present series with positive nodes at this level died within 3 years.

Micrometastases are considered precursors to the development of clinically relevant metastasis[38]. Several studies have demonstrated micrometastatic node involvement to be associated with poorer outcome for different solid tumours (biliary tract[39,40], stomach[41], colon[42]). There are few published studies on the clinical impact of lymph node micrometastases in pancreatic cancer[25,43–45]. Kurahara and co-workers[25] detected micrometastases in 13 of 23 histologically node-negative patients, adversely impacting on prognosis, as also reported by others[43,45,46]. One previous study[46] used a complex two-stage polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism technique to look for K-*ras* point mutations; only 13 patients were studied and no significant impact on survival or recurrence was observed.

In the present series, 15 (17 per cent) of 90 patients without histologically confirmed para-aortic lymph node involvement displayed micrometastatic cell clusters without any significant impact on survival.

Observed median OS and DFS after pancreatoduodenectomy in patients with positive para-aortic nodes in the present series were worse than those reported for locally advanced disease treated palliatively by radiotherapy for patients with stable disease after 3 months of chemotherapy (11·4 and 6·3 months respectively)[47], and for those receiving FOLFIRINOX (folinic acid, fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin) for metastatic pancreatic cancer in a randomized trial (11·1 and 6·4 months respectively)[48]. Based on these results, a positive para-aortic lymph node detected on frozen section is viewed by the present authors as a contraindication to pancreatoduodenectomy.

Acknowledgements

R.M.L and M.S. contributed equally to this work. The authors thank A. Scriva and F. Mérabtène for their contribution to the histopathological analysis.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

References

1 Jia Y, Wang TJ, Allendorf J, Saif MW. Management of borderline resectable pancreatic adenocarcinoma. *JOP* 2012; **13**: 147–150.

2 American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2012*. American Cancer Society: Atlanta, 2012.

3 Moon HJ, An JY, Heo JS, Choi SH, Joh JW, Kim YI. Predicting survival after surgical resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2006; **32**: 37–43.

4 Schnelldorfer T, Ware AL, Sarr MG, Smyrk TC, Zhang L, Qin R *et al*. Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible? *Ann Surg* 2008; **247**: 456–462.

5 Turrini O, Viret F, Moureau-Zabotto L, Guiramand J, Moutardier V, Lelong B *et al*. Neoadjuvant 5 fluorouracil–cisplatin chemoradiation effect on survival in patients with resectable pancreatic head adenocarcinoma: a ten-year single institution experience. *Oncology* 2009; **76**: 413–419.

6 Hsu CC, Herman JM, Corsini MM, Winter JM, Callister MD, Haddock MG *et al*. Adjuvant chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma: the Johns Hopkins Hospital–Mayo Clinic collaborative study. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**: 981–990.

7 Hatzaras I, George N, Muscarella P, Melvin WS, Ellison EC, Bloomston M. Predictors of survival in periampullary cancers following pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**: 991–997.

8 Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area. *Cancer* 1978; **41**: 880–887.

9 Nakao A, Harada A, Nonami T, Kaneko T, Murakami H, Inoue S *et al*. Lymph node metastases in carcinoma of the head of the pancreas region. *Br J Surg* 1995; **82**: 399–402.

10 Ishikawa O, Ohigashi H, Sasaki Y, Kabuto T, Furukawa H, Nakamori S *et al*. Practical grouping of positive lymph nodes in pancreatic head cancer treated by an extended pancreatectomy. *Surgery* 1997; **121**: 244–249.

11 Massucco P, Ribero D, Sgotto E, Mellano A, Muratore A, Capussotti L. Prognostic significance of lymph node metastases in pancreatic head cancer treated with extended lymphadenectomy: not just a matter of numbers. *Ann Surg Oncol* 2009; **16**: 3323–3332.

12 Nagakawa T, Kobayashi H, Ueno K, Ohta T, Kayahara M, Miyazaki I. Clinical study of lymphatic flow to the paraaortic lymph nodes in carcinoma of the head of the pancreas. *Cancer* 1994; **73**: 1155–1162.

13 Kayahara M, Nagakawa T, Ohta T, Kitagawa H, Ueno K, Tajima H *et al*. Analysis of paraaortic lymph node involvement in pancreatic carcinoma: a significant indication for surgery? *Cancer* 1999; **85**: 583–590.

14 Yoshida T, Matsumoto T, Sasaki A, Shibata K, Aramaki M, Kitano S. Outcome of paraaortic node-positive pancreatic head and bile duct adenocarcinoma. *Am J Surg* 2004; **187**: 736–740.

15 Isaji S, Kawarada Y, Uemoto S. Classification of pancreatic cancer: comparison of Japanese and UICC classifications. *Pancreas* 2004; **28**: 231–234.

16 Japan Pancreas Society. *Classification of Pancreatic Carcinoma* (1st English edn). Kanehara: Tokyo, 1996.

17 Cordera F, Arciero CA, Li T, Watson JC, Hoffman JP. Significance of common hepatic artery lymph node metastases during pancreaticoduodenectomy for pancreatic head adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 2330–2336.

18 Shimada K, Sakamoto Y, Sano T, Kosuge T. The role of paraaortic lymph node involvement on early recurrence and survival after macroscopic curative resection with extended lymphadenectomy for pancreatic carcinoma. *J Am Coll Surg* 2006; **203**: 345–352.

19 Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Yuasa Y, Sueda T. Prognostic impact of para-aortic lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg* 2010; **34**: 1900–1907.

20 Sakai M, Nakao A, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Kodera Y, *et al*. Para-aortic lymph node metastasis in carcinoma of the head of the pancreas. *Surgery* 2005; **137**: 606–611.

21 Doi R, Kami K, Ito D, Fujimoto K, Kawaguchi Y, Wada M *et al*. Prognostic implication of para-aortic lymph node metastasis in resectable pancreatic cancer. *World J Surg* 2007; **31**: 147–154.

22 Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Coleman J, Sauter PK, Hruban RH *et al*. Pancreaticoduodenectomy with or without extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma: comparison of morbidity and mortality and short-term outcome. *Ann Surg* 1999; **229**: 613–622.

23 Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA, Wilson SD. Adenocarcinoma of the pancreas: detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay. *Cancer* 1998; **83**: 1328–1334.

24 Kanemitsu K, Hiraoka T, Tsuji T, Inoue K, Takamori H. Implication of micrometastases of lymph nodes in patients with extended operation for pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; **26**: 315–321.

25 Kurahara H, Takao S, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S, Aikou T. Impact of lymph node micrometastasis in patients with pancreatic head cancer. *World J Surg* 2007; **31**: 483–490.

26 Haute Autorité de Santé (HAS). *Place de la Technique du Ganglion Sentinelle dans la Stratégie Diagnostique de l'Envahissement Ganglionnaire d'un Cancer du Sein à un Stade Précoce – Note de Cadrage*; 2011. http://has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-12/cadrage_tecthnique_ganglion_sentinelle.pdf [accessed 21 January 2014].

27 Sobin LH, Wittekind C. *UICC TNM Classification of Malignant Tumors* (6th edn). Wiley-Liss: New York, 2002.

28 Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual* (7th edn). Springer: New York, 2010.

29 Piantadosi S. *Clinical Trials: a Methodologic Perspective* (2nd edn). Wiley: Hoboken, 2005.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd

30 Yamada S, Nakao A, Fujii T, Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S *et al*. Pancreatic cancer with paraaortic lymph node metastasis: a contraindication for radical surgery? *Pancreas* 2009; **38**: e13–e17.
31 Loehrer PJ Sr, Feng Y, Cardenes H, Wagner L, Brell JM, Cella D *et al*. Gemcitabine alone *versus* gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 4105–4112.
32 Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, Rougier P, Mariette C, Bouche O *et al*. Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000–01 FFCD/SFRO study. *Ann Oncol* 2008; **19**: 1592–1599.
33 Lesurtel M, Dehni N, Tiret E, Parc R, Paye F. Palliative surgery for unresectable pancreatic and periampullary cancer: a reappraisal. *J Gastrointest Surg* 2006; **10**: 286–291.
34 Soriano A, Castells A, Ayuso C, Ayuso JR, de Caralt MT, Ginès MA *et al*. Preoperative staging and tumor resectability assessment of pancreatic cancer: prospective study comparing endoscopic ultrasonography, helical computed tomography, magnetic resonance imaging, and angiography. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 492–501.
35 Karmazanovsky G, Fedorov V, Kubyshkin V, Kotchatkov A. Pancreatic head cancer: accuracy of CT in determination of resectability. *Abdom Imaging* 2005; **30**: 488–500.
36 de Bondt RB, Nelemans PJ, Hofman PA, Casselman JW, Kremer B, van Engelshoven JM *et al*. Detection of lymph node metastases in head and neck cancer: a meta-analysis comparing US, USgFNAC, CT and MR imaging. *Eur J Radiol* 2007; **64**: 266–272.
37 Imai H, Doi R, Kanazawa H, Kamo N, Koizumi M, Masui T *et al*. Preoperative assessment of para-aortic lymph node metastasis in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol* 2010; **15**: 294–300.
38 Bouvet M, Wang J, Nardin SR, Nassirpour R, Yang M, Baranov E *et al*. Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model. *Cancer Res* 2002; **62**: 1534–1540.
39 Yonemori A, Kondo S, Matsuno Y, Ito T, Nakanishi Y, Miyamoto M *et al*. Prognostic impact of regional lymph node micrometastasis in patients with node-negative biliary cancer. *Ann Surg* 2010; **252**: 99–106.
40 Yonemori A, Kondo S, Matsuno Y, Ito T, Tanaka E, Hirano S. Prognostic impact of para-aortic lymph node micrometastasis in patients with regional node-positive biliary cancer. *Br J Surg* 2009; **96**: 509–516.
41 Yonemura Y, Endo Y, Hayashi I, Kawamura T, Yun HY, Bandou E. Proliferative activity of micrometastases in the lymph nodes of patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2007; **94**: 731–736.
42 Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Buchler MW, Koch M *et al*. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 60–70.
43 Scheunemann P, Stoecklein NH, Rehders A, Bidde M, Metz S, Peiper M *et al*. Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2008; **393**: 359–365.
44 Lee SE, Jang JY, Kim MA, Kim SW. Clinical implications of immunohistochemically demonstrated lymph node micrometastasis in resectable pancreatic cancer. *J Korean Med Sci* 2011; **26**: 881–885.
45 Kat'uchová J, Bober J, Kat'uch V, Radoňak J. Significance of lymph node micrometastasis in pancreatic cancer patients. *Eur Surg Res* 2012; **48**: 10–15.
46 Ando N, Nakao A, Nomoto S, Takeda S, Kaneko T, Kurokawa T *et al*. Detection of mutant K-*ras* in dissected paraaortic lymph nodes of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1997; **15**: 374–378.
47 Huguet F, André T, Hammel P, Artru P, Balosso J, Selle F, *et al.* Impact of chemoradiotherapy after disease control with chemotherapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma in GERCOR phase II and III studies. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 326–331.
48 Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y *et al.*; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX *versus* gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1817–1825.

© 2014 BJS Society Ltd
Published by John Wiley & Sons Ltd