



HAL
open science

Caractérisation phénotypique et clinique des cancers colorectaux métastatiques avec instabilité des microsatellites

Romain Cohen

► **To cite this version:**

Romain Cohen. Caractérisation phénotypique et clinique des cancers colorectaux métastatiques avec instabilité des microsatellites. Cancer. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS313 . tel-02864793v1

HAL Id: tel-02864793

<https://theses.hal.science/tel-02864793v1>

Submitted on 11 Jun 2020 (v1), last revised 11 Jun 2020 (v2)

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 - Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Centre de recherche Saint-Antoine, INSERM UMRS_938

Equipe de recherche « Instabilité des microsatellites et cancers »

Caractérisation phénotypique et clinique des cancers colorectaux métastatiques avec instabilité des microsatellites

Par **Romain Cohen**

Thèse de doctorat de physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par Professeur Alex Duval et Professeur Magali Svrcek

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2018

Devant un jury composé de :

Professeur Marc SANSON, PU-PH

président de jury

Professeur Marie-Pierre BUISINE, PU-PH

rapporteuse

Professeur David TOUGERON, PU-PH

rapporteur

Docteur Philippe LE ROUZIC, MCU

examinateur

Professeur Janick SELVES, PU-PH

examinatrice

Docteur Aziz ZAANAN, MCU-PH

examinateur

Professeur Alex DUVAL, PU-PH

directeur de thèse

Professeur Magali SVRCEK, PU-PH

directrice de thèse



RESUME

L'instabilité des microsatellites (MSI) est un phénotype tumoral secondaire à une déficience héréditaire (syndrome de Lynch) ou acquise du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR : mismatch repair). Les tumeurs MSI sont fortement immunogènes et hautement infiltrées par des lymphocytes T cytotoxiques (CD3/CD8) dont l'activité est néanmoins régulée dans la tumeur, en particulier du fait de l'expression de points de contrôle immunitaire (*checkpoint* immunitaire : ICK). Les tumeurs MSI représentent 5% des cancers colorectaux métastatiques (CCRm). Le phénotype MSI est un facteur prédictif positif majeur de l'efficacité des inhibiteurs d'ICK (ICKi), utilisés depuis peu dans le traitement de ces cancers au stade métastatique. L'identification d'un phénotype MSI fait appel à deux techniques de référence utilisées en routine : (i) l'immunohistochimie (IHC) sur une section de tissu tumoral (anticorps dirigés contre les protéines MMR dont l'expression est perdue par les cellules cancéreuses, dites MMR-déficientes), (ii) la PCR microsatellite (amplification par PCR de loci microsatellites qui s'avèrent instables dans l'ADN tumoral, dit MSI).

L'objectif de mon travail a été de caractériser sur le plan clinique et moléculaire les CCRm MSI et d'en évaluer les modalités diagnostiques et d'évaluer la réponse aux ICKi dans le contexte des essais cliniques d'immunothérapie. Dans un premier travail, je montre que l'histoire naturelle clinique des CCRm MSI diffère selon le mécanisme sporadique ou héréditaire de la déficience du système MMR, mécanisme qui peut être déterminé par l'analyse du statut MMR en IHC, du statut de méthylation du promoteur de *MLH1* et du statut mutationnel de *BRAF* (Cohen et al., Eur J Cancer 2017). Dans un deuxième travail, je montre que près de 10% des CCRm détectés comme MSI et/ou MMR-déficients en vie réelle correspondent à des faux positifs dus à une mauvaise interprétation des analyses IHC et/ou de PCR microsatellite, et que ces faux positifs sont responsables de la majorité des cas de résistance primaire aux ICKi observés dans le cadre d'essais thérapeutiques (Cohen*, Hain* et al., JAMA Oncol. Sous presse).

Après une revue introductive de la littérature concernant le phénotype MSI, son impact dans le cadre du CCR et de l'immunothérapie, je présente les résultats des axes nosologiques et diagnostiques développés durant ce doctorat, avant de proposer différentes perspectives à l'ère de l'immunothérapie des cancers MSI.

Mots clés : cancer colorectal ; instabilité des microsatellites ; réparation des mésappariements de l'ADN ; immunothérapie ; checkpoint immunitaire ; syndrome de Lynch

ABSTRACT

Microsatellite instability (MSI) is a tumor phenotype linked to somatic or germline (Lynch syndrome) inactivating alterations of DNA mismatch repair (MMR) genes. MSI tumors are immunogenic and highly infiltrated by cytotoxic T cell lymphocytes (CD3/CD8) whose activity is regulated by the expression of immune checkpoints (ICK). MSI is observed in approximately 5% of metastatic colorectal cancers (mCRC) and has recently emerged as a major positive predictive biomarker for the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICKi) amongst mCRC patients. There are two main methods for the detection of MSI: immunohistochemistry (IHC) on a tumor section using antibodies against MMR proteins whose expression is lost by tumor cells), microsatellite PCR (PCR amplification of microsatellite loci that are unstable in tumor DNA).

The objectives of my work was to clinically and molecularly characterize MSI mCRC, to evaluate the accuracy of MSI screening methods and the response to immunotherapy in the context of ICKi clinical trials. First, I show that sporadic and inherited MSI mCRC (that can be distinguished using MMR, *BRAF* mutation and *MLH1* promoter methylation testing) display distinct natural history (Cohen *et al.*, *Eur J Cancer* 2017). In a second work, I show that MSI testing in routine practice is associated with almost 10% of false positives due to misinterpretation of IHC and PCR assays. Moreover, these false-positives are the main cause of mCRC primary resistance to ICKi observed in clinical trials (Cohen*, Hain* *et al.*, *JAMA Oncol.* Sous presse).

After summarizing the literature concerning MSI, its consequences on CRC and immunotherapy, I present the results of the nosologic and diagnostic works developed during this doctoral thesis. Then I will go on perspectives in the context of MSI cancer.

Mots clés : colorectal cancer ; microsatellite instability ; DNA mismatch repair ; immunotherapy ; immune checkpoint ; Lynch syndrome

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Marc Sanson, pour avoir accepté de présider cette soutenance de thèse de sciences. Merci au Professeur Marie-Pierre Buisine ainsi qu'au Professeur David Tougeron de leur intérêt pour mon travail, et d'avoir accepté de l'évaluer. Merci au Docteur Philippe Le Rouzic, au Professeur Janick Selves ainsi qu'au Docteur Aziz Zaanan d'avoir accepté d'examiner mon travail. C'est un honneur pour moi de présenter et soutenir mon travail devant un jury avec une telle expertise scientifique.

Je remercie avec beaucoup de respect et d'amitié le Professeur Alex Duval et le Professeur Magali Svrcek de m'avoir dirigé tout au long de cette thèse. Au-delà des compétences et connaissances acquises à vos côtés, j'ai appris de vous l'art de discerner dans des données brutes des messages scientifiquement et cliniquement pertinents. Ces allers-retours entre la clinique et la science ont été pour moi un réel plaisir et ont confirmé mes choix professionnels.

Au Professeur Thierry André pour son soutien et son aide indéniables. Ce travail n'aurait probablement pas été aussi loin sans vous, et nous n'avons pas fini d'explorer cette thématique, loin de là.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire. A chacun d'entre vous, merci pour aide, vos conseils et votre accueil si chaleureux, c'est un plaisir de travailler avec vous. Merci à Elisabeth Hain pour sa participation à ce projet. Merci tout particulièrement à Olivier Buhard : merci pour ta bienveillance, ta disponibilité et ta pédagogie.

A tous ceux qui ont fait vivre ce projet. Merci au Professeur Jean-François Fléjou, au Docteur Pascale Cervera, à Sylvie Dumont ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques.

A tous ceux qui ont participé à ce projet : Frédéric Bibeau, Florence Renaud, Armelle Bardier-Dupas, Philippe Bertheau, Rachid Kaci, Jean-Baptiste Bachet, Jean-Marc Gornet.

A l'équipe du service d'oncologie médicale, pour sa confiance et sa générosité.

A ma famille.

A Raphaël et Emile, qui me maintiennent les pieds sur terre.

A Virginie, pour son soutien sans faille.

TABLE DES MATIERES

I. Introduction	12
II. Revue de la littérature.....	14
A. Le système de réparation des mésappariements de l'ADN et l'instabilité microsatellitaire.....	14
1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN	14
2. Microsatellites et déficience du système MMR	16
3. Instabilité des microsatellites et carcinogénèse MSI.....	16
B. Aspects oncogénétiques et spectre du phénotype MSI.....	17
1. Cancers sporadiques.....	17
2. Cancers héréditaires	17
a) <i>Syndrome de Lynch</i>	17
b) <i>CMMRD : déficience constitutionnelle du système MMR</i>	18
3. Epidémiologie analytique : le cancer du côlon et du rectum, modèle d'étude privilégié.....	18
C. Détection de la déficience du système MMR et de l'instabilité microsatellitaire .	19
1. Immunohistochimie.....	19
2. Polymerase Chain Reaction	21
a) <i>Panel de Bethesda</i>	21
b) <i>Panel pentaplex</i>	21
c) <i>La répétition T17 de HSP110</i>	22
3. A la recherche d'une prédisposition familiale.....	23
4. Eléments orientant vers une origine héréditaire ou sporadique de la tumeur de phénotype MSI.....	24
a) <i>La mutation V600E de BRAF</i>	26
b) <i>L'hyperméthylation du promoteur de MLH1</i>	27
D. Immunogénicité et échappement au système immunitaire	27
1. Immunogénicité des cancers MSI	27
2. Echappement des cancers MSI à l'activité immunitaire anti-tumorale.....	28
E. Immunothérapie antitumorale.....	29
1. Immunothérapie conventionnelle	29
2. Immunothérapie adoptive.....	30
3. Anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaire.....	31
a) <i>L'ipilimumab, la révolution des années 2010</i>	31
b) <i>Un profil d'efficacité particulier</i>	33
c) <i>L'élargissement aux autres localisations tumorales</i>	34

F. Immunothérapie des cancers présentant une instabilité microsatellitaire	35
1. Activité anti-tumorale des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire	35
2. Profil de toxicité des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire	37
G. Aspects contextuels.....	38
1. Les cancers colorectaux MSI avant l'ère de l'immunothérapie	38
a) <i>Pronostic</i>	38
(1) Cancers colorectaux localisés	38
(2) Cancers colorectaux métastatiques	39
b) <i>Chimiothérapies cytotoxiques</i>	42
(1) Chimiothérapie adjuvante des cancers localisés	42
(2) Chimiothérapie palliative des cancers métastatiques	43
2. Développement de l'immunothérapie dans les cancers colorectaux MSI.....	43
a) <i>Cancers colorectaux métastatiques MSI</i>	43
b) <i>Cancers colorectaux localisés MSI</i>	45
c) <i>Problématiques liées au développement de l'immunothérapie</i>	45
III. Résultats	48
A. Axe nosologique	48
B. Axe diagnostique	62
IV. Discussion et Perspectives.....	72
A. Distinction des cancers MSI héréditaires et sporadiques	72
1. Utilité d'un algorithme décisionnel basé sur les analyses génétiques tumorales	72
2. Limites de la distinction sporadique / héréditaire par les analyses moléculaires somatiques	73
B. Diagnostic du phénotype MSI	74
1. Fidélité du diagnostic MSI en vie réelle.....	74
2. Avenirs possibles pour le diagnostic du phénotype MSI.....	75
a) <i>Séquençage à haut débit</i>	75
b) <i>Biopsies liquides</i>	76
C. Investigations en perspective.....	77
1. Cancer colorectal MSI : algorithme diagnostique entre PCR et IHC.....	77
2. Cancer colorectal MSI : stade métastatique <i>versus</i> stades localisés	77
3. Cancer colorectal métastatique MSI : générer de nouvelles hypothèses.....	78
V. Conclusion	80
VI. Annexes.....	82

1. La balance entre infiltrat inflammatoire cytotoxique et expression des points de contrôle immunitaire	82
2. Revues de la littérature publiées.....	114
a) <i>Intérêt thérapeutique des statuts BRAF et MMR</i>	114
b) <i>Immunothérapie et patients traités pour un cancer MSI</i>	125
c) <i>Perspectives de l'immunothérapie dans le cancer colorectal</i>	136
VII. Bibliographie	146

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Erreurs de réplication reconnues par le système MMR et étapes de réparation	15
Figure 2 : Etude immunohistochimique des protéines du système MMR	20
Figure 3 : PCR pentaplex et quasimonorphisme	22
Figure 4 : Algorithme décisionnel pour la distinction des cancers colorectaux MSI sporadiques et reliés au syndrome de Lynch.....	26
Figure 5 : Principes de l'immunothérapie adoptive, les CAR-T cells.....	31
Figure 6 : Immunothérapie anti-tumorale et inhibition de PD-1, PD-L1 ou CTLA-4	32
Figure 7 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de PD-1 et PD-L1	33
Figure 8 : Courbes de survie sous immunothérapie ou traitements conventionnels	34
Figure 9 : Courbes de survie sous immunothérapie, l'exemple du cancer colorectal MSI.....	37
Figure 10 : Courbes de survie globale selon les statuts <i>BRAF</i> et microsatellitaire en situation métastatique.....	41
Tableau 1 : Epidémiologie analytique du phénotype MSI.....	19
Tableau 2 : Données d'efficacité de l'immunothérapie pour les patients avec un cancer colorectal métastatique MSI.....	36
Tableau 3 : Résultats de la méta-analyse ACCENT (Adjuvant Colon Cancer Endpoints).....	39
Tableau 4 : Valeur pronostique de l'instabilité des microsatellites dans les cancers colorectaux métastatiques	40
Tableau 5 : Médianes de survie globale selon les statuts <i>BRAF</i> et microsatellitaire dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS.....	41
Tableau 6 : Essais cliniques d'immunothérapie pour les patients avec un cancer colorectal MSI actuellement ouverts en France	46
Tableau 7 : Discordances entre les analyses locale et centralisée du statut microsatellitaire dans l'étude CheckMate-142.....	63

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
B2M	beta-2-microglobuline
BCG	bacille de Calmette et Guérin
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CAR-T	chimeric antigen receptor-T
CCR	cancer colorectal
CCRm	cancer colorectal métastatique
CIMP	CpG Island methylator phenotype
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMMRD	constitutional mismatch repair deficiency
ctDNA	circulating tumor DNA (ADN tumoral circulant)
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
dMMR	MMR deficiency (déficience du système MMR)
EGRF	epidermal growth factor receptor
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERK	extracellular signal–regulated kinase
FDA	food and drug administration
HLA	human leukocyte antigen
HNPCC	human non polyposis colorectal cancer
HR	hazard ratio
HSP110	heat shock protein 110
ICK	immune checkpoint (point de contrôle immunitaire)
ICKi	inhibiteur d'immune checkpoint
IDO	indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
JAK	janus kinase
KRAS	kirsten rat sarcoma virus
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MLH1	MutL homolog 1
MMR	mismatch repair (réparation des mésappariements de l'ADN)
MSH2	MutS protein homolog 2

MSH6	MutS protein homolog 6
MSI	microsatellites instables
MSS	microsatellites stables
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCI	national cancer institute
NGS	next generation sequencing
NK	natural killer
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
pMMR	MMR proficiency (système MMR compétent)
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
POLD	ADN polymerase delta
POLE	ADN polymerase epsilon
QMVR	quasimonomorphic variation range
SG	survie globale
SSP	survie sans progression
TCR	T-cell receptor
TNF	tumor necrosis factor

I. Introduction

L'instabilité des microsatellites (MSI : *MicroSatellite Instability*) est un phénotype tumoral relié à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR : *MisMatch Repair*) qui peut être sporadique ou héréditaire, s'intégrant alors dans un syndrome de prédisposition familiale au cancer, dit syndrome de Lynch ou HNPCC (*Human Non Polyposis Colorectal Cancer*) [1]. Le phénotype MSI est majoritairement retrouvé dans les cancers du côlon et du rectum, de l'endomètre et, dans une fréquence relativement moindre, dans le cancer de l'estomac. Etant le 4^e cancer le plus fréquent dans le monde, avec près de 45000 nouveaux cas annuels en France, le cancer colorectal (CCR) est le modèle privilégié du phénotype MSI [2, 3]. Depuis 1993 et la mise en évidence de la relation entre l'instabilité microsatellitaire et la carcinogénèse liée au syndrome de Lynch, la recherche de ce phénotype moléculaire tumoral a deux intérêts en pratique clinique : (i) il oriente le conseil oncogénétique et (ii) il précise l'évaluation du pronostic tumoral et ainsi l'indication d'éventuels traitements complémentaires post-opératoires des cancers colorectaux [4, 5].

Le champ d'investigation que constitue le traitement des cancers a été radicalement transformé en 5 à 10 ans par l'émergence d'une nouvelle classe thérapeutique dite immunothérapie. Ces anticorps monoclonaux ciblent des points de contrôle du système immunitaire (« *immune checkpoints* » : ICKs) et, ce faisant, libèrent l'immunité anti-tumorale de l'hôte, généralement bridée par le cancer lui-même *via* l'expression de ligands de ces ICKs à la surface des cellules tumorales [6, 7]. Le pronostic des patients suivis pour un mélanome, un cancer broncho-pulmonaire ou un lymphome de Hodgkin a ainsi été positivement transformé [8–10].

Si les résultats des premières études de phase I d'immunothérapie ont été décevants pour les patients porteurs d'un CCR métastatique (CCRM), la mise en évidence d'une réponse tumorale complète chez un patient avec une tumeur MSI a été l'élément déclenchant d'une révolution thérapeutique [11]. L'instabilité microsatellitaire, retrouvée dans seulement 3% des cancers colorectaux métastatiques (contre 15% aux stades localisés) est liée à une hypermutabilité de l'ADN, s'est ainsi révélée être un biomarqueur prédictif majeur de l'efficacité des immunothérapies, de surcroît indépendant de la localisation tumorale [12].

Le sujet de notre thèse s'inscrit de manière très forte dans ce contexte de transformation radicale et rapide de l'utilité du phénotype MSI en pratique clinique, passant du statut de test pronostique et de dépistage oncogénétique à celui de biomarqueur théranostique. Nous

présenterons tout d'abord une revue de la littérature qui rapportera brièvement les mécanismes biologiques sous-tendant la carcinogénèse MSI et les modalités de son diagnostic, pour ensuite s'intéresser aux conséquences immunologiques et immunothérapeutiques de ce phénotype tumoral ainsi qu'aux aspects contextuels du traitement du CCR MSI en pratique clinique. Après avoir présenté les travaux publiés durant ce doctorat, qui se distinguent en deux grands axes nosologique et diagnostique, nous apporterons différents éléments de réflexions afin de mettre en perspective ce travail et de proposer différentes perspectives et voies de recherche.

II. Revue de la littérature

A. Le système de réparation des mésappariements de l'ADN et l'instabilité microsatellitaire

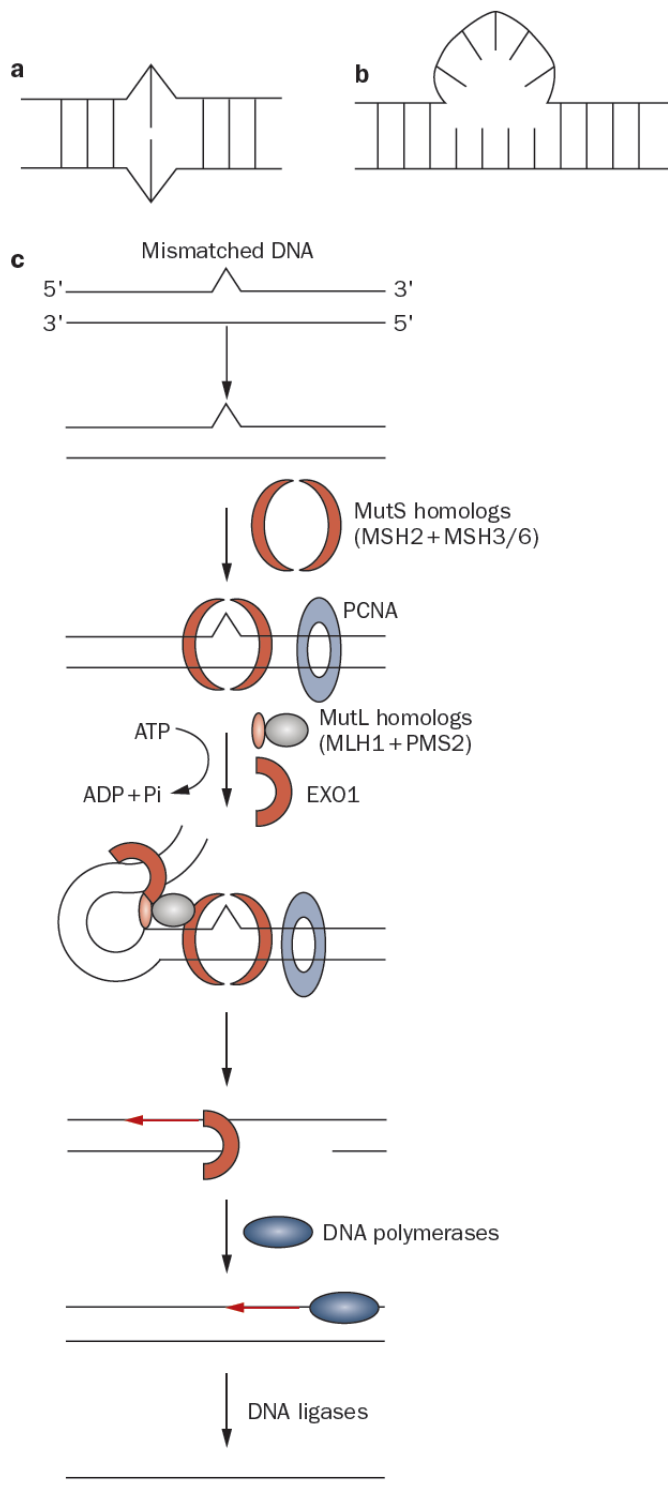
1. Système de réparation des mésappariements de l'ADN

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN, dit système MMR (Mismatch Repair) reconnaît et répare les erreurs d'insertion, de délétion ou de mésappariements de bases qui surviennent lors de la réplication de l'ADN. Malgré la haute fidélité des ADN polymérases, le processus de réplication peut en effet être source d'erreurs, avec l'introduction de bases incorrectes dans le brin d'ADN néo-synthétisé (mésappariements de bases) ou de boucles d'ADN (boucles d'insertion / délétion). En réparant ces erreurs, le système MMR, qui est un mécanisme hautement conservé, assure l'intégrité du génome.

Le système MMR fait intervenir un complexe protéique comprenant notamment MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 qui fonctionnent sous la forme d'hétérodimères (MLH1/PMS2, MSH2/MSH6) au travers de 4 grandes étapes [figure 1] [13, 14] :

- reconnaissance du mésappariement de bases ou de la boucle d'insertion-délétion par MutS (MutS α : MSH2/hMSH6, reconnaissant les mésappariements base-base et les boucles courtes ; MutS β : MSH2/MSH3, qui reconnaît les boucles supérieures à 10 nucléotides) ;
- fixation de MutS à la lésion de l'ADN, induisant une modification conformationnelle qui initie le recrutement de MutL (MLH1/hPMS2) ;
- recrutement par MutL de multiples partenaires protéiques et notamment des exonucléases pour couper la zone d'erreur sur le brin d'ADN lésé ;
- comblement du vide au niveau du brin lésé par une ADN polymérase et raccordement du brin par des ADN ligases.

Figure 1 : Erreurs de réplication reconnues par le système MMR et étapes de réparation



a : mésappariement de base ;
 b : boucle d'insertion / délétion ;
 c : étapes de réparation de l'ADN ;
 EXO1 : exonucléase 1, PCNA :
 proliferating-cell-nuclear-antigen

d'après Hewish et al, Nat. Rev. Clin.
 Oncol. (2010) [2]

2. Microsatellites et déficience du système MMR

Les microsatellites correspondent à une répétition continue en tandem de courtes séquences d'ADN formées de de 1 à 6 nucléotides. Les microsatellites sont retrouvés partout dans le génome, dans des zones codantes ou non-codantes. Du fait de leur caractère répétitif, les microsatellites sont des zones à risque d'erreurs de copie par les ADN polymérases (par « glissement », induisant des boucles d'insertion / délétion), tout particulièrement les répétitions mono- ou di-nucléotidiques. En cas de déficience du système MMR, ces erreurs de réplifications des microsatellites ne sont pas corrigées, amenant à une instabilité de leur taille. Autrement dit, les microsatellites sont les zones par lesquelles l'intégrité du génome peut être perdue en cas de déficience du système MMR.

Lorsqu'un microsatellite est situé dans une zone codante de l'ADN, la modification de la taille du microsatellite est responsable d'un décalage du cadre de lecture (en cas de délétion d'une ou deux bases) et, ainsi, de l'apparition de protéines mutées par troncature (mutations par décalage du cadre de lecture, dite « *frameshift mutations* »).

3. Instabilité des microsatellites et carcinogénèse MSI

La déficience MMR n'est pas un phénomène transformant *per se*, mais est une voie de carcinogénèse spécifique par le fait qu'elle favorise, à haut niveau, une instabilité nucléotidique de l'ADN particulièrement observée sur les séquences répétées du génome ou microsatellites. La déficience du système MMR peut induire des mutations activatrices ou inactivatrices au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur contenant des séquences microsatellitaires codantes. Ont été rapportées par exemple des mutations de *TGFBR2* (*type II transforming growth factor- β receptor*), *BAX* (*Bcl-2-associated X protein*), *IGF2R* (*insulin-like growth factor 2 receptor*), *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), ou encore *HSP110*... [15, 16]. Les différents *hallmarks* du cancer définis par Hanahan et Weinberg sont ainsi acquis par la tumeur au travers de multiples altérations génétiques spécifiques à la déficience MMR, au niveau de gènes porteurs de microsatellites et donc cibles de la voie MSI [17, 18].

De ce fait, l'instabilité microsatellitaire correspond à un phénotype tumoral singulier (phénotype dit MSI) et donc potentiellement individualisable (voir la section II.C).

B. Aspects oncogénétiques et spectre du phénotype MSI

1. Cancers sporadiques

La déficience du système MMR peut être constitutionnelle ou acquise. Dans les tumeurs sporadiques MSI, la perte de fonction du système MMR est acquise et reliée dans l'immense majorité des cas à une perte d'expression du gène *MLH1* par hyperméthylation de son promoteur [19]. Cet événement épigénétique s'inscrit généralement dans un contexte génétique plus large d'hyperméthylation de l'ADN, dit phénotype hyperméthylateur ou CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*) [20]. Brièvement, les îlots CpG sont des régions du génome présentant une concentration élevée de dinucléotides cytosine – guanine (connectés par une liaison phosphodiester : CpG), régions que l'on retrouve préférentiellement dans les zones régulatrices de l'ADN, notamment les promoteurs des gènes. Les cytosines de ces îlots peuvent être méthylées en méthyl-cytosine, inhibant l'activité transcriptionnelle du gène associé. Le phénotype tumoral CIMP, lié à la sénescence, chevauche les 2 voies classiques d'oncogénèse colorectale que sont l'instabilité chromosomique et l'instabilité microsatellitaire.

Les cancers CIMP-positifs sont fréquemment retrouvés chez des personnes âgées et de sexe féminin, et présentent fréquemment des mutations V600E de *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* ; substitution d'une valine pour un acide glutamique en position 600). La relation entre le phénotype hyperméthylateur et cette mutation ponctuelle *hotspot* de *BRAF* n'est pas clairement expliquée ; cette dernière pourrait induire l'activité de différents répresseurs transcriptionnels *via* une activation de la cascade de signalisation BRAF/MEK/ERK [21, 22].

2. Cancers héréditaires

a) *Syndrome de Lynch*

La déficience du système MMR peut également être constitutionnelle. Le syndrome de Lynch, anciennement nommé HNPCC (Human Non Polyposis Colorectal Cancer), est une pathologie génétique de prédisposition aux cancers MSI engendrée par une mutation germinale mono-allélique d'un gène du système MMR. *MLH1* ou *MSH2* sont ciblés dans 90% des cas, *MSH6* et *PMS2* dans seulement 10% des cas. Dans le cadre de ce syndrome de prédisposition génétique au cancer, une copie d'un gène MMR est donc constitutionnellement inactivée dans la lignée germinale, dans l'ensemble des cellules de l'individu. Le second allèle est perdu au niveau somatique, dans la tumeur, en accord avec le modèle à « deux

coups » originellement proposé par Knudson pour les gènes suppresseurs de tumeurs (rétinoblastome et gène *RB*) [23].

Les individus atteints de syndrome de Lynch et porteurs d'une mutation germinale d'un gène MMR sont à haut risque de développer un CCR ou un cancer de l'endomètre à un âge jeune. Le spectre du syndrome de Lynch inclut également les cancers de l'estomac, de l'intestin grêle, du pancréas, des voies biliaires, de l'ovaire et des voies urinaires. Le risque cumulé de développer un CCR avant 70 ans est évalué à 41% pour les porteurs d'une mutation de *MLH1*, de 48% pour *MSH2*, et de 12% pour *MSH6*. Concernant le cancer de l'endomètre, le risque cumulé est de 54%, 21% et 16%, respectivement pour ces mêmes gènes [24, 25].

b) CMMRD : déficience constitutionnelle du système MMR

Le syndrome CMMRD (*Constitutional Mismatch Repair Deficiency*) est la conséquence des mutations germinales bialléliques d'un gène MMR. Ce syndrome rare de prédisposition majeur aux cancers (rapporté dans une centaine de familles seulement aujourd'hui) est autosomique récessif, au contraire du syndrome de Lynch (autosomique dominant). Les mutations de *PMS2* sont majoritaires dans le cadre du CMMRD. Les individus porteurs de telles mutations germinales homozygotes sont à risque de développer à l'âge pédiatrique des cancers ayant un spectre large (cancers hématologiques, tumeurs du spectre du syndrome de Lynch, tumeurs cérébrales et autres). Ils présentent en outre fréquemment des lésions cutanées plus ou moins spécifiques à type de tâches café au lait (et autres signes, également observés dans la neurofibromatose de type 1 qui est un diagnostic différentiel du CMMRD) [26–28].

3. Epidémiologie analytique : le cancer du côlon et du rectum, modèle d'étude privilégié

Le phénotype MSI est principalement retrouvé dans les cancers de l'endomètre (17-33%), du côlon et du rectum (3-20%), et de l'estomac (8-22%) [tableau 1] [29]. La déficience du système MMR peut néanmoins être retrouvée dans de multiples types tumoraux, mais avec une fréquence bien plus faible [30].

De récentes études non supervisées, pan-tumorales, ont ainsi montré que le spectre du phénotype MSI, et du syndrome de Lynch, était plus large que ce qui est classiquement décrit. Si les prévalences les plus élevées sont retrouvées dans les tumeurs du spectre classique du syndrome de Lynch, le phénotype MSI a également été retrouvé dans les localisations moins attendues telles que le gliome ou le carcinome épidermoïde bronchique [31]. Dans une étude sur 12019 échantillons, 11 des 32 types tumoraux présentaient un phénotype MSI dans au

moins 2% des cas [32]. Certaines de ces tumeurs sont reliées au syndrome de Lynch, d'autres sont sporadiques, comme l'ont montré Schwark et collègues dans une étude de séquençage de grande envergure (plus de 15000 tumeurs) associée à une analyse de l'ADN constitutionnelle systématique : une mutation germinale d'un gène MMR n'était retrouvée que dans 16% des cas [30].

En France, le CCR est le 3^e cancer le plus fréquent chez l'homme (après le cancer de la prostate et du poumon), et le 2^e chez la femme (après le cancer du sein). Compte-tenu de son incidence importante dans la population générale (44872 nouveaux cas estimés en 2017, 2^e cancer le plus meurtrier avec 17684 décès estimés [2]), le CCR est un modèle d'étude privilégié de la déficience du système MMR et du phénotype MSI.

Tableau 1 : Epidémiologie analytique du phénotype MSI

Localisation tumorale	Incidence estimée en France (N)	Fréquence du phénotype MSI		
		Tout stade confondu	Stades localisés	Stades avancés
Côlon - rectum	44872	3 -20%	15-20%	3-12%
Endomètre	8367	17-33%	38%	28%
Estomac	6616	8-22%	8-24%	8-10%
Ovaire	4714	2-10%	NC	NC

NC : non connu [2, 31–37]

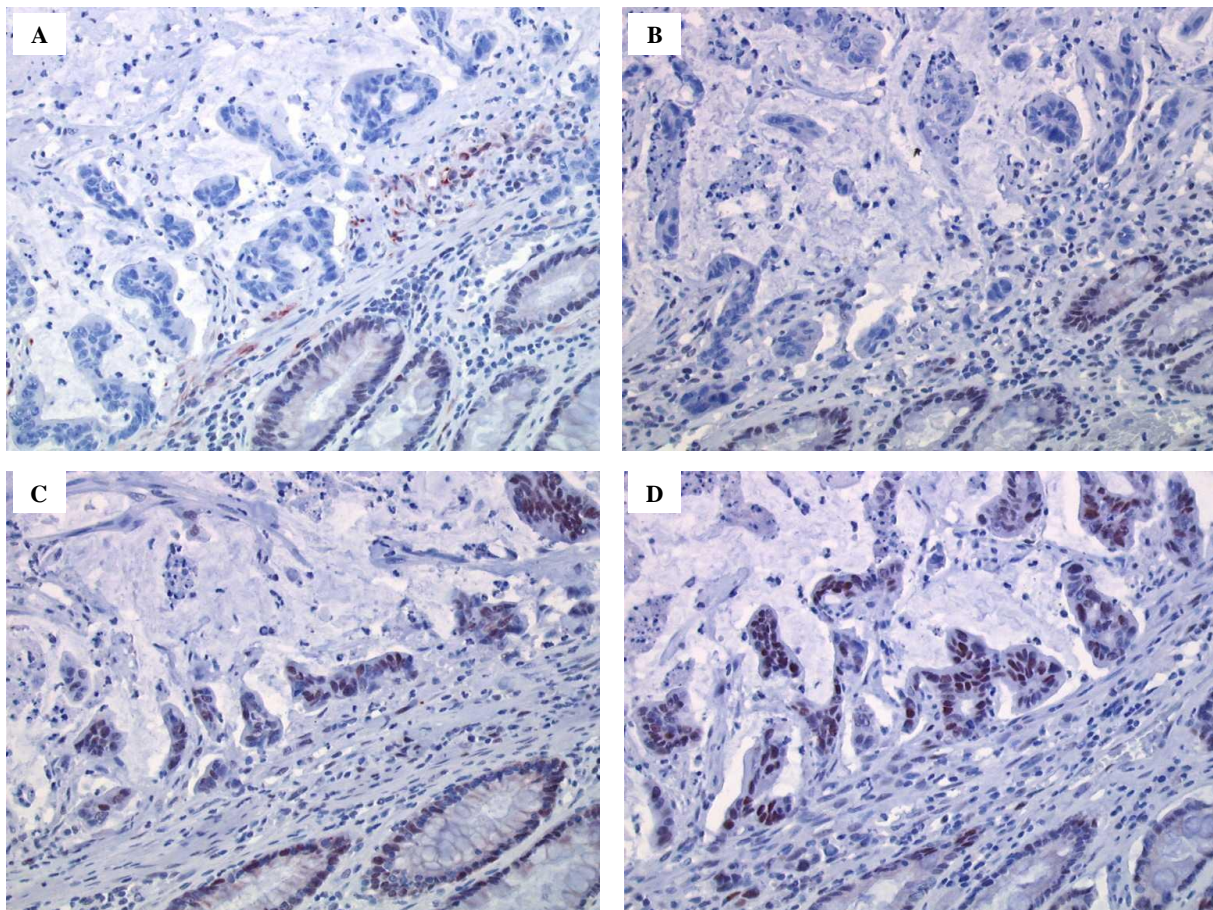
C. Détection de la déficience du système MMR et de l'instabilité microsatellitaire

1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie permet d'étudier l'expression des protéines MMR sur des tranches de section tissulaire. Physiologiquement, ces protéines ubiquitaires sont situées dans le noyau cellulaire. L'analyse immunohistochimique du système MMR consiste en la recherche d'une perte de l'expression nucléaire des protéines MMR au niveau des cellules tumorales. La présence d'un marquage nucléaire, même faible ou focal, permet de conclure au maintien de l'expression protéique. A l'inverse, l'expression protéique est considérée comme perdue lorsque qu'aucun marquage nucléaire n'est retrouvé dans les cellules tumorales : la tumeur est alors considérée comme MMR-déficiente ; la présence d'un marquage nucléaire au niveau des cellules non tumorales du stroma (cellules endothéliales, cellules inflammatoires) est requise à titre de contrôle interne positif [figure 2] [38, 39].

Physiologiquement, les protéines du système MMR fonctionnent en hétérodimères. A l'état monomérique, celle-ci sont dégradées. MLH1 et MSH2 sont les partenaires obligatoires de PMS2 et MSH6, respectivement. Ainsi, un événement délétère au niveau des gènes *MLH1* et *MSH2* (mutation, hyperméthylation) induira la protéolyse de PMS2 et MSH6. Au niveau immunohistochimique, cela se traduit par l'absence systématique de marquage de PMS2 et MSH6 en cas de perte d'expression de MLH1 et MSH2, respectivement. Le corolaire n'est pas vrai. En effet, les protéines MLH1 et MSH2 peuvent interagir avec d'autres éléments du système MMR, tels que MSH3, MLH3 ou PMS1. Par conséquent, une perte d'expression isolée de PMS2 ou MSH6 n'est pas associée à une absence de marquage de MLH1 ou MSH2 [40, 41].

Figure 2 : Etude immunohistochimique des protéines du système MMR



Exemple d'un adénocarcinome colique MMR-déficient. Les cellules tumorales n'expriment pas MLH1 (A) ni PMS2 (B), mais l'expression de MSH2 (C) et de MSH6 (D) est conservée. Les cellules du stroma sont marquées par les anticorps anti-MLH1 et -PMS2 (témoin interne positif).

2. Polymerase Chain Reaction

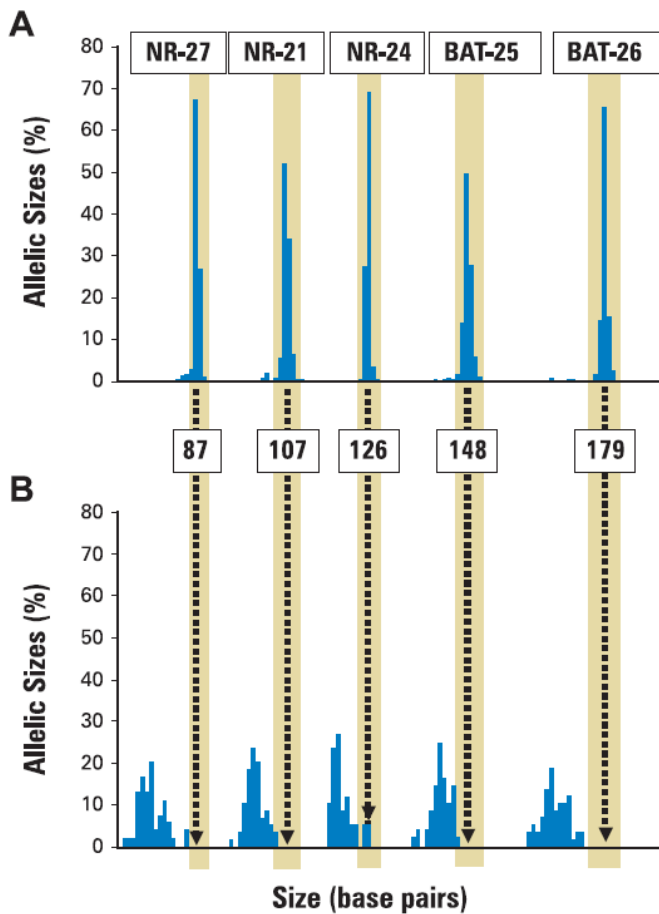
a) Panel de Bethesda

L'instabilité microsatellitaire est caractérisée par une modification de taille des microsatellites, modification qui est évaluable par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en comparant l'ADN tumoral à l'ADN non tumoral du même individu. Initialement, la méthode consistait à évaluer la taille de certaines répétitions microsatelitaires et d'évaluer leur caractère instable en comparant l'ADN tumoral à l'ADN non tumoral. Un premier panel de 5 microsatellites a été développé, avec 2 répétitions mononucléotidiques (BAT-25 et BAT-26) et 3 répétitions dinucléotidiques (D5S346, D2S123, et D17S25). Une tumeur était considérée comme MSI lorsqu'une variation de taille était détectée entre l'ADN tumoral et l'ADN non tumoral sur au moins 2 des 5 répétitions. Ce panel de 5 marqueurs, recommandé en 1998 par le groupe de travail du NCI (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, Etats-Unis d'Amérique), est à présent désigné comme le panel de Bethesda [42].

b) Panel pentaplex

Un second panel, développé par notre groupe, est constitué de 5 répétitions mononucléotidiques et quasimonomorphiques (BAT-26, BAT-25, NR-21, NR-22 et NR-24). L'utilisation de marqueurs mononucléotidiques permet d'améliorer la sensibilité du test : plus la séquence répétée en tandem est courte (constituée d'un nucléotide, plutôt que 2, 3 ou plus), plus le risque d'erreur par les ADN polymérases est important lors de la réplication. Ainsi ce panel, dit pentaplex, est plus sensible que le panel de Bethesda. Le second avantage de ces 5 microsatellites est leur caractère quasimonomorphique ; la taille de ces 5 marqueurs est en effet hautement conservée dans l'ensemble de la population humaine. Cela permet de conclure à la présence d'un phénotype MSI au niveau tumoral (en cas d'instabilité de 2 marqueurs), sans avoir à effectuer une comparaison systématique avec l'ADN non tumoral du patient, lorsque la taille allélique de l'un des marqueurs pentaplex sort de la fourchette de variation quasimonomorphique (QMVR : *quasimonomorphic variation range*) [figure 3]. Il est néanmoins important de noter que certaines ethnies, notamment africaines, présentent des taux élevés de polymorphismes au niveau de ces séquences microsatelitaires : Pygmés Biaka avec 34.7% de polymorphismes de NR-27 et 15.3% pour BAT-26, peuple San avec 57.1% de polymorphismes de BAT-25 [43–46].

Figure 3 : PCR pentaplex et quasimonorphisme



Taille allélique (en paires de bases) des 5 marqueurs de la PCR pentaplex dans l'ADN germlinal (A) de la population mondiale et (B) dans des tumeurs présentant une instabilité microsatellitaire. Pour chaque marqueur, la taille la plus commune est indiquée ; les zones beiges correspondent à la fourchette de variation quasimonorphique. D'après Buhard et al, J. Clin. Oncol. (2004) [46]

c) La répétition T17 de HSP110

Récemment, notre groupe a mis en évidence une délétion somatique quasi systématique de la répétition mononucléotidique T17 du gène *HSP110* (HT17) dans les cancers colorectaux MSI. De manière intéressante, les délétions de HT17 au niveau de l'ADN tumoral amènent à la synthèse d'un variant (isoforme) de la protéine chaperonne HSP110 (par perte de l'exon 9), variant associé à une sensibilité accrue aux chimiothérapies cytotoxiques [15, 47].

Le marqueur HT17 est hautement monomorphique et présente à lui seul une sensibilité supérieure à celle du panel pentaplex pour la détection du phénotype MSI, avec une spécificité similaire : sensibilité de 0.984 (intervalle de confiance à 95% (IC95) 0.968-0.995) versus 0.951 (IC95 0.925-0.972) respectivement, et spécificité de 0.997 (IC95 0.989-1.000) pour les deux [48].

3. A la recherche d'une prédisposition familiale

Différents critères ont été proposés pour orienter ou non les patients atteints d'un CCR en consultation d'oncogénétique. Avant la découverte du phénotype MSI, les critères d'Amsterdam avaient été développés pour proposer aux patients une analyse de l'ADN constitutionnelle. Les critères à remplir étaient :

- (i) au moins trois cas de cancers colorectaux ou de cancers du spectre du syndrome de Lynch,
- (ii) dont un individu atteint apparenté au premier degré aux deux autres,
- (iii) sur au moins deux générations successives,
- (iv) dont au moins un cas diagnostiqué avant 50 ans,
- (v) une polypose adénomateuse familiale ayant été exclue [49, 50].

Néanmoins ces critères, très sélectifs, ne sont pas assez sensibles, ni suffisamment spécifiques (près de 50% des patients avec un syndrome de Lynch prouvé ne remplissent pas les critères d'Amsterdam, et près de 50% des patients remplissant ces critères ne sont pas porteurs d'un syndrome de Lynch) [25].

La découverte du phénotype MSI comme outil de « pré-screening » des patients, avant une analyse constitutionnelle, a amené au développement de critères (dits de Bethesda) pour décider ou non d'une recherche de ce phénotype, avant d'orienter éventuellement le patient porteur d'un CCR en consultation d'oncogénétique [43]. Ainsi, une recherche du phénotype MSI (ou dMMR) devrait être réalisée lorsque l'un des critères est rempli, pour ensuite faire une analyse de l'ADN constitutionnel en cas de tumeur MSI (critères de Bethesda révisés) :

- (i) CCR diagnostiqué avant 50 ans,
- (ii) CCR diagnostiqué avant 60 ans avec histologie évocatrice,
- (iii) cancers multiples du spectre du syndrome de Lynch chez un même patient, quel que soit son âge,
- (iv) CCR chez un patient avec antécédents familiaux de cancer(s) du spectre du syndrome de Lynch (chez au moins un apparenté au premier degré diagnostiqué avant 50 ans ou chez au moins deux apparentés, au premier ou second degré, quels que soient les âges).

De même que pour les critères d'Amsterdam, les critères de Bethesda sont insuffisamment sensibles, avec près de 20% des patients porteurs d'une mutation germinale qui seraient non diagnostiqués avec cette méthodologie [51, 52].

Les recommandations françaises publiées par l'Institut National du Cancer (© Tests somatiques recherchant une déficience du système MMR au sein des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch, collection Outils pour la pratique, INCa, juin 2016) préconisent la réalisation de tests somatiques (immunohistochimie et/ou examen des marqueurs microsatellites BAT25, BAT26, BAT40, NR21, NR22, NR24 et NR27) sur ADN tumoral en biologie moléculaire) à la recherche d'une déficience MMR pour :

(i) toute personne avec un cancer colorectal, diagnostiquée à un âge inférieur à 60 ans ou présentant, quel que soit son âge, des antécédents personnels ou familiaux (au premier degré) de cancer colorectal ou de cancer(s) du spectre du syndrome de Lynch.

(ii) toute personne avec un cancer de l'endomètre, diagnostiquée à un âge inférieur à 50 ans (recherche pouvant se discuter entre 50 et 60 ans) ou présentant, quel que soit son âge, des antécédents personnels ou familiaux (au premier degré) de cancer colorectal ou de cancer(s) du spectre du syndrome de Lynch.

(iii) toute personne avec un cancer du spectre du syndrome de Lynch, autre qu'un cancer colorectal ou qu'un cancer de l'endomètre, sur justification d'un contexte personnel et/ou familial évocateur d'un syndrome de Lynch.

Néanmoins l'émergence de l'immunothérapie avec le statut MSI/dMMR comme outil théranostique de médecine personnalisée a modifié les pratiques, amenant à une analyse du phénotype MSI et/ou du statut MMR pour tous les patients porteurs d'un CCRm selon les recommandations du NCCN (National Comprehensive Cancer Network, NCCN Guidelines Version 3.2018 Colon Cancer), et au niveau national selon le thésaurus national de cancérologie digestive (travail collaboratif sous l'égide des différentes sociétés savantes françaises de cancérologie digestive : SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFED, SFRO ; www.snfge.org/tncd).

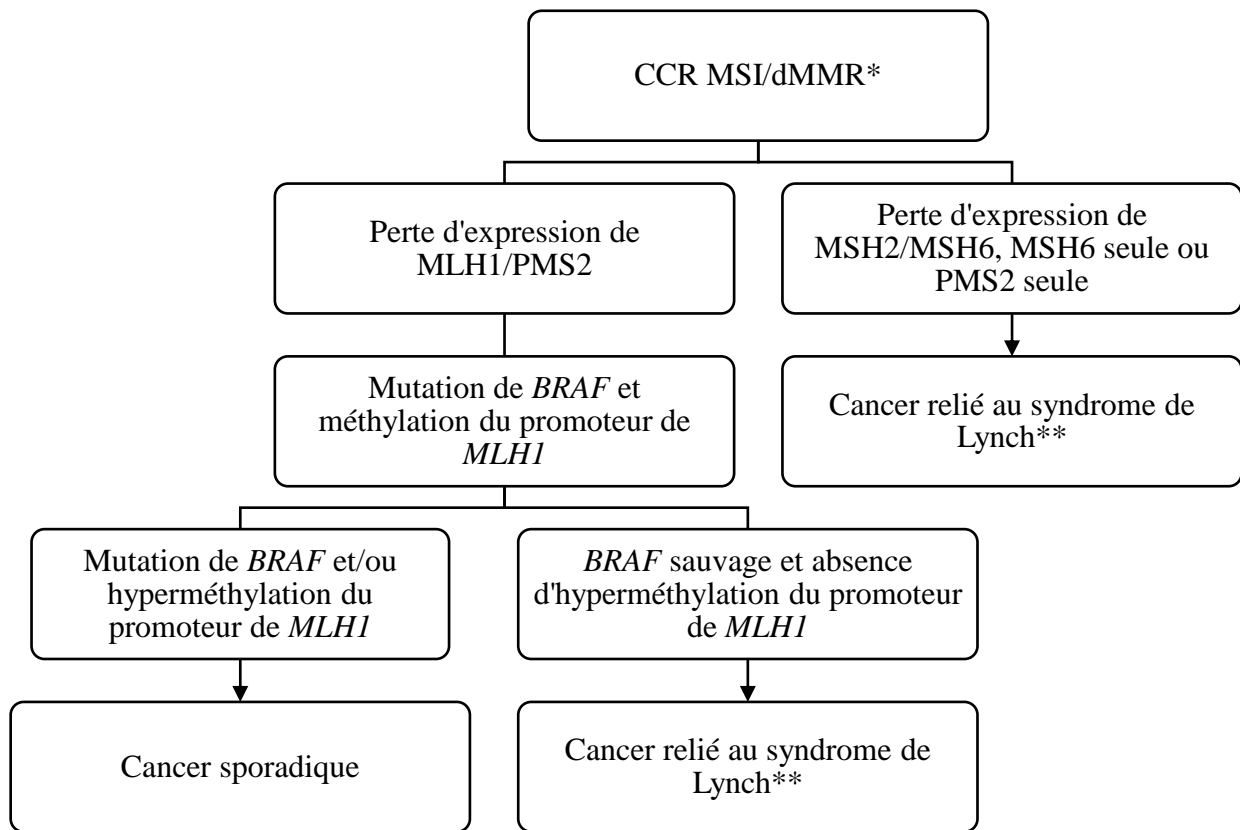
4. Éléments orientant vers une origine héréditaire ou sporadique de la tumeur de phénotype MSI

Si la recherche d'une mutation d'un gène MMR au niveau germinale constitue le *gold standard* pour le diagnostic de syndrome de Lynch, elle est parfois longue et fastidieuse, et peut assez

souvent être non concluante (pas de mise en évidence d'une mutation MMR ou mise en évidence d'un variant MMR de signification inconnue). Certaines analyses au niveau de l'ADN tumoral permettent néanmoins d'orienter le diagnostic et éventuellement d'écarter le diagnostic de prédisposition familiale sans avoir à réaliser d'analyse MMR de l'ADN constitutionnel.

Les cancers colorectaux MSI sporadiques sont reliés au phénotype hyperméthylateur (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype) (voir section II.B.1). Dans ce contexte, une déficience du système MMR est occasionnée de manière épigénétique *via* une hyperméthylation du promoteur de *MLH1*, qui est riche en îlots CpG. Ainsi, les cancers colorectaux MSI avec perte d'expression de *MLH1* en immunohistochimie, sont considérés sporadiques lorsqu'est retrouvée une mutation V600E de *BRAF* ou lorsque le promoteur de *MLH1* est hyperméthylé [figure 4] [53–55]. Comme toutes règles, ces situations souffrent d'exceptions ; il a ainsi été rapporté de rares familles Lynch dans lesquelles c'est l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* qui est transmise [56], et il peut très rarement exister des mutations *BRAF* dans des tumeurs reliées au syndrome de Lynch [57] . Par ailleurs, il existe des cas de cancers MSI non reliés au syndrome de Lynch (c'est-à-dire sans mutation constitutionnelle retrouvée d'un gène MMR) et qui ne sont pas dus à une hyperméthylation sporadique du promoteur de *MLH1*. Ces cancers dit « Lynch-like » sont liés à des mutations somatiques bialléliques d'un gène MMR, sans que ces mutations soient transmissibles de génération en génération [58, 59].

Figure 4 : Algorithme décisionnel pour la distinction des cancers colorectaux MSI sporadiques et reliés au syndrome de Lynch



* : en l'absence de mutation constitutionnelle connue d'un gène MMR ; ** : cancer probablement relié au syndrome de Lynch (« Lynch-like syndrome »)

a) *La mutation V600E de BRAF*

BRAF est une kinase clé de la voie de signalisation des MAP kinases. Elle a pour fonction d'induire la phosphorylation et ainsi l'activation de MEK en aval. La mutation V600E, correspondant au remplacement d'une valine par un acide glutamique au niveau du domaine kinase, entraîne l'activation constitutive de BRAF. Cette mutation faux-sens, retrouvée dans environ 60 % des mélanomes, est prédictive de réponse aux inhibiteurs de BRAF, tels que le vemurafenib, dans cette localisation tumorale [60].

Dans le cadre du CCR, des mutations de *BRAF* sont retrouvées dans environ 10 % des tumeurs, tous stades confondus. Il s'agit de la mutation V600E dans l'immense majorité des cas. D'autres mutations peuvent être retrouvées, mais leur valeur pronostique est inconnue.

BRAF V600E est retrouvée préférentiellement dans les tumeurs MSI (20-70 % des tumeurs MSI *versus* 5-10 % des tumeurs MSS).

La mutation V600E de *BRAF* est recherchée de manière systématique pour les cancers colorectaux métastatiques en raison de son impact pronostique négatif et de ses implications thérapeutiques (intensification thérapeutique, absence de preuve de l'efficacité des anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR) [61–66]. Quel que soit le stade tumoral, la mutation V600E de *BRAF* est recherchée pour les cancers MSI avec perte d'expression de MLH1 afin d'orienter le conseil oncogénétique.

b) L'hyperméthylation du promoteur de MLH1

L'extinction épigénétique de l'expression de *MLH1* est reliée au phénotype hyperméthylateur dit CIMP. Si le diagnostic du phénotype hyperméthylateur reste encore non consensuel (plusieurs panels proposés : *MINT1*, *MINT2*, *MINT31*, *CDKN2A* et *MLH1* ; *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* et *SOCS1*) [67], les méthodes diagnostiques sont néanmoins robustes : PCR méthylation-spécifique, MethyLight, COBRA, ou pyroséquençage avec traitement au bisulfite [22]. Cette dernière méthode, classiquement employée, consiste à traiter l'ADN tumoral avec du bisulfite qui induit une conversion des cytosines non méthylées en uracile, tandis que les cytosines méthylées restent inchangées ; après traitement, le séquençage des allèles méthylés et non méthylés est différent, ce qui permet d'évaluer l'état de méthylation de la séquence analysée. L'état de méthylation du promoteur de *MLH1* est étudié pour les cancers MSI avec perte d'expression de MLH1 pour rechercher une origine sporadique.

D. Immunogénicité et échappement au système immunitaire

1. Immunogénicité des cancers MSI

La voie de cancérogénèse MSI, *via* les mutations de microsatellites codants engendrant des décalages du cadre de lecture des gènes qu'elles affectent, aboutit à la synthèse de multiples néo-antigènes aberrants et potentiellement immunogènes par les cellules tumorales ; les cancers MSI sont dits « hypermutés », présentant une charge mutationnelle élevée par rapport aux cancers MSS [68–72]. Cette « charge » néo-antigénique des cancers MSI s'associe à une réponse immunitaire forte [73, 74]. En effet les cancers colorectaux MSI sont caractérisés par une forte réaction inflammatoire locale, pouvant se présenter sous la forme de nodules lymphoïdes péri-tumoraux (réaction « Crohn-like »), et également d'une infiltration dense au

niveau intra-tumoral par des lymphocytes T cytotoxiques activés de type Th1 [75–78]. La carcinogénèse MSI est donc fortement immunogène [79].

2. Echappement des cancers MSI à l'activité immunitaire anti-tumorale

Deux signaux sont requis pour initier la réponse immunitaire adaptative des lymphocytes T : la reconnaissance par le TCR (T Cell Receptor) du complexe peptide antigénique – CMH (complexe majeure d'histocompatibilité) et la co-stimulation *via* différents récepteurs interagissant avec des ligands exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes. Par ailleurs, la présence de co-récepteurs inhibiteurs permet de contrôler la réponse immunitaire. Ces récepteurs, sortes de freins à la réponse immunitaires, et appelés points de contrôle immunitaire (ICKs : *immune checkpoints*) induisent un épuisement lymphocytaire, associant une absence de prolifération en réponse à l'antigène reconnu et la perte des fonctions effectrices cytotoxiques du fait de la diminution de sécrétion d'interféron gamma (IFN γ).

Les tumeurs MSI développent différents mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale. Le processus de présentation antigénique par les cellules tumorales peut notamment être altéré, *via* des mutations au niveau de gènes impliqués dans l'apprêtement et l'assemblage des complexes peptides - CMH dans le réticulum endoplasmique, ou dans leur transport jusqu'à la surface de la cellule tumorale. Ainsi ont été rapportées différentes mutations du gène de la bêta-2-microglobuline (*B2M*), protéine impliquée dans la présentation antigénique en tant que composant du complexe protéique HLA de classe I. En effet le gène de la B2M présente plusieurs séquences microsatellitaires dans sa séquence codante. Les mutations de ces séquences, aboutissant à la production de mutants protéiques tronqués de la B2M, ont pour conséquence la perte de la présentation antigénique, rendant les cellules tumorales « invisibles » pour les lymphocytes T cytotoxiques [80].

Par ailleurs, il a été démontré que les tumeurs MSI surexprimaient de multiples ICKs, notamment PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 et IDO, contrebalançant ainsi l'activité anti-tumorale caractéristique de leur microenvironnement. Cliniquement, ce mécanisme d'échappement immunitaire annule l'impact pronostique positif apporté par l'infiltrat inflammatoire anti-tumoral des tumeurs MSI [81, 82].

Ces données forment le rationnel biologique du développement de nouvelles thérapies ciblant les ICKs [83]. Ces différents inhibiteurs de PD-1, PD-L1 ou encore CTLA-4 (voir section

II.E.3), ont ainsi été testés chez les patients traités pour un cancer MSI, et ont démontré dans cette situation biologique spécifique une activité clinique majeure (voir section II.F) [12].

E. Immunothérapie antitumorale

1. Immunothérapie conventionnelle

Il paraît essentiel de rappeler que l'immunothérapie n'est pas née au XXI^e siècle. Les progrès thérapeutiques réalisés cette dernière décennie s'inscrivent dans la suite de travaux scientifiques anciens. Avant l'avènement des inhibiteurs d'ICKs (ICKi), l'immunothérapie avait déjà sa place en cancérologie, avec notamment le bacille de Calmette-Guerin (BCG-thérapie), l'interleukine-2 (IL-2), ou l'interféron alpha (IFN α).

Le BCG a été étudié comme potentiel traitement du cancer dès les années 70, après que des études épidémiologiques avaient montré une réduction du risque de leucémie chez les enfants vaccinés par le BCG [84]. C'est ainsi qu'il a été utilisé sous la forme d'instillations intradermiques puis intravésicales dès 1976 pour le traitement des tumeurs superficielles de vessie [85]. Cette immunothérapie, qui fait partie des standards actuels de prise en charge des tumeurs vésicales superficielles, n'est néanmoins pas dénuée d'effets indésirables potentiellement fatals. Les mécanismes de son efficacité ne sont pas totalement élucidés mais peuvent être séparés en 3 catégories : (i) l'infection des cellules urothéliales cancéreuses par le BCG est responsable d'une augmentation de l'expression du CMH de classe II à la surface cellulaire, de même que pour les cellules urothéliales saines, qui médient ainsi une réponse immune précoce ; (ii) l'instillation intravésicale de BCG est associée à production de cytokines dont l'interleukine-17 qui joue un rôle important dans la réponse cellulaire Th1 ; (iii) l'activité anti-tumorale du BCG dépasse le cadre de la réponse immunitaire Th1, différents travaux ayant démontré que la réaction au BCG passait également par une réponse NK (Natural Killer) et neutrophilique [86].

Découverte en 1976 dans le surnageant des cultures des lymphocytes, l'IL-2 est une cytokine sécrétée par les lymphocytes T CD4⁺ en réponse à une stimulation antigénique. Elle stimule la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ activés ainsi que des cellules NK et augmente leur activité cytotoxique. Par ailleurs l'IL-2 stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et augmente la cytotoxicité des monocytes qui vont se transformer en macrophages. Elle est aussi impliquée dans la production d'autres cytokines comme l'IFN γ , le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), et d'autres interleukines. L'IL-2, de même que l'IFN α , ont longtemps été (et sont encore) utilisés dans le traitement du cancer du rein métastatique et

dans les mélanomes avancés, où ils induisent des réponses objectives dans 15 à 20% des cas, avec de rares réponses complètes prolongées (< 5%), au prix d'effets secondaires sévères [87–89]. Les résultats obtenus par ces traitements ont montré qu'il était possible de traiter le cancer efficacement en agissant sur le système immunitaire de l'hôte [89].

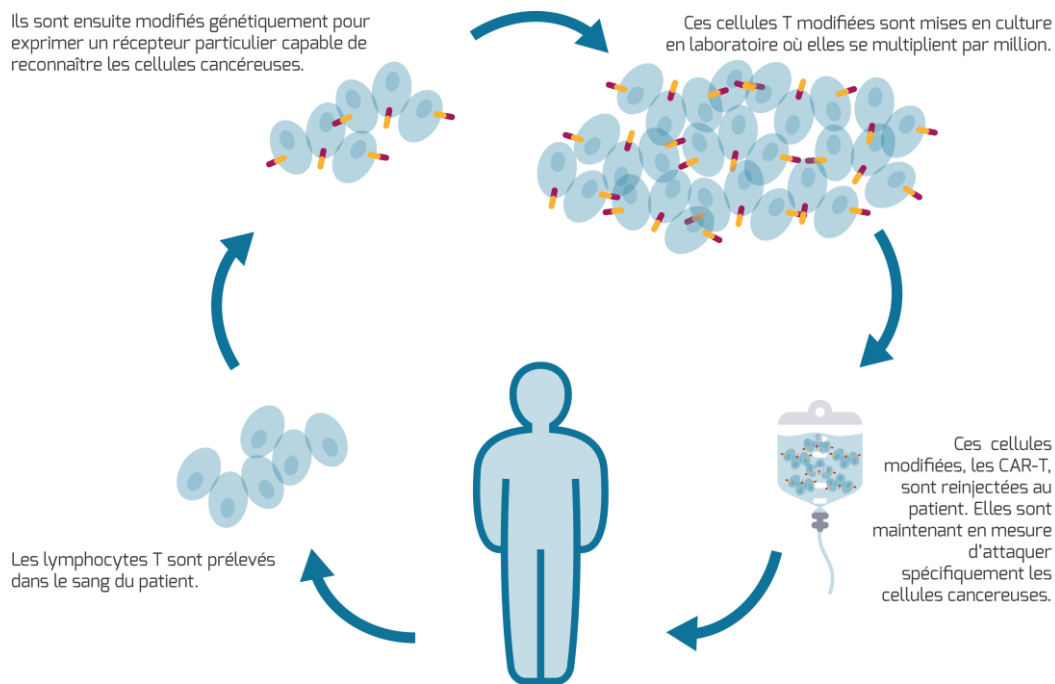
2. Immunothérapie adoptive

Le développement de l'immunothérapie antitumorale s'est fait au travers de divers axes, allant de la vaccination au transfert adoptif de lymphocytes T. L'immunothérapie adoptive vise à stimuler le système immunitaire du patient en donnant aux cellules immunitaires l'information dont elles ont besoin pour mieux reconnaître les cellules tumorales comme anormales et ainsi pouvoir les attaquer. Pour cela, des cellules immunitaires sont sélectionnées et/ou modifiées en laboratoire puis réinjectées dans l'organisme du patient.

Une première approche, le transfert adoptif de lymphocytes T, consiste à prélever des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL : *tumor infiltrating lymphocytes*) d'un patient à partir d'échantillons de sa tumeur, sélectionner ceux qui ont une activité anti-tumorale *in vitro*, les expandre, puis les réinjecter au patient. Les résultats obtenus avec cette technique complexe et coûteuse restent néanmoins modestes, et de nouvelles stratégies ont dû être élaborées [90, 91].

Une approche plus récente et très prometteuse consiste à modifier génétiquement les lymphocytes T des patients pour les faire reconnaître un antigène spécifique de la tumeur [figure 5] : il s'agit des « CAR-T cells » (*Chimeric Antigen Receptor-T cells*). Cette stratégie représente une réelle révolution dans le domaine de l'onco-hématologie [92–94]. Néanmoins les CAR-T cells n'ont pas encore fait leurs preuves en oncologie solide, notamment en raison du caractère polyclonal, hétérogène de ces maladies, et de la nécessité de prise en compte du stroma tumoral inhérent à ces cancers solides [95–98].

Figure 5 : Principes de l'immunothérapie adoptive, les CAR-T cells



D'après l'INCA©, Immunothérapie : mode d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie ... e-cancer.fr

3. Anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaire

a) *L'ipilimumab, la révolution des années 2010*

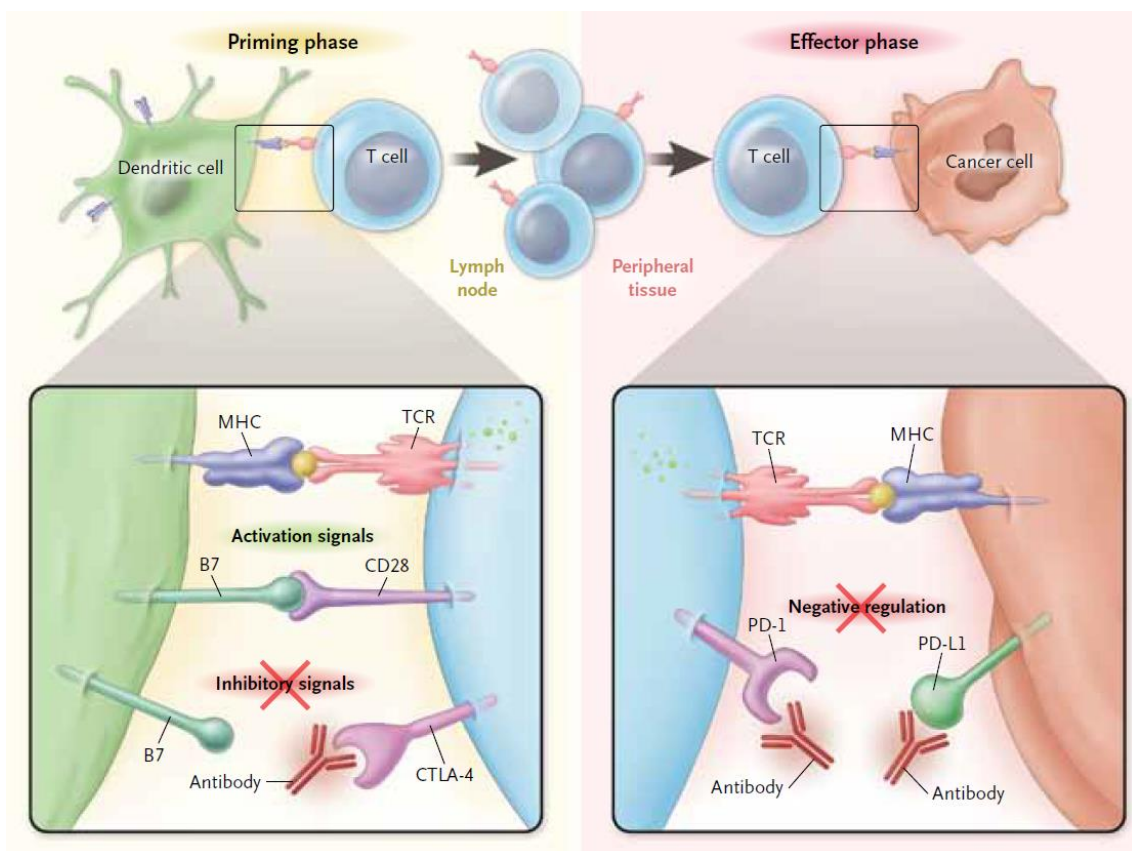
L'un des développements les plus importants dans le domaine de l'immunothérapie des cancers s'est fait avec l'ipilimumab, alliant les concepts de thérapie ciblée et de modulation immunitaire. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal ciblant le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), qui est un récepteur clé qui est exprimé à la surface des cellules T lors de leur activation, et qui se lie aux molécules accessoires de la famille B7 exprimées par les cellules dendritiques et autres cellules présentatrices d'antigènes. Cette liaison du CTLA-4 inhibe la poursuite de l'activation et de l'expansion T, contrôlant et atténuant ainsi la réponse immune ; il s'agit d'une voie de costimulation inhibitrice, le CTLA-4 est un ICK.

Le rationnel de l'utilisation d'une molécule inhibant CTLA-4 est de « libérer » une réponse immunitaire T antitumorale. La première étude randomisée de phase III évaluant l'ipilimumab (seul ou en association à un peptide spécifique du mélanome, gp100, utilisé seul comme bras comparateur) chez les patients traités pour un mélanome multi-traité, montre un taux de survie à 24 mois quasiment doublé (23.5% *versus* 13.7%) [99]. Une autre étude de phase 3, associant l'ipilimumab à la dacarbazine, montrait de même un doublement du taux de longs survivants [100]. Il est important de noter que le développement de l'ipilimumab s'est fait en présumant

qu'il y avait une réponse T antitumorale préexistante, puisqu'il n'était pas associé à un traitement immunisant concomitant, mis à part le vaccin peptidique gp100 dont l'utilité n'est pas démontrée.

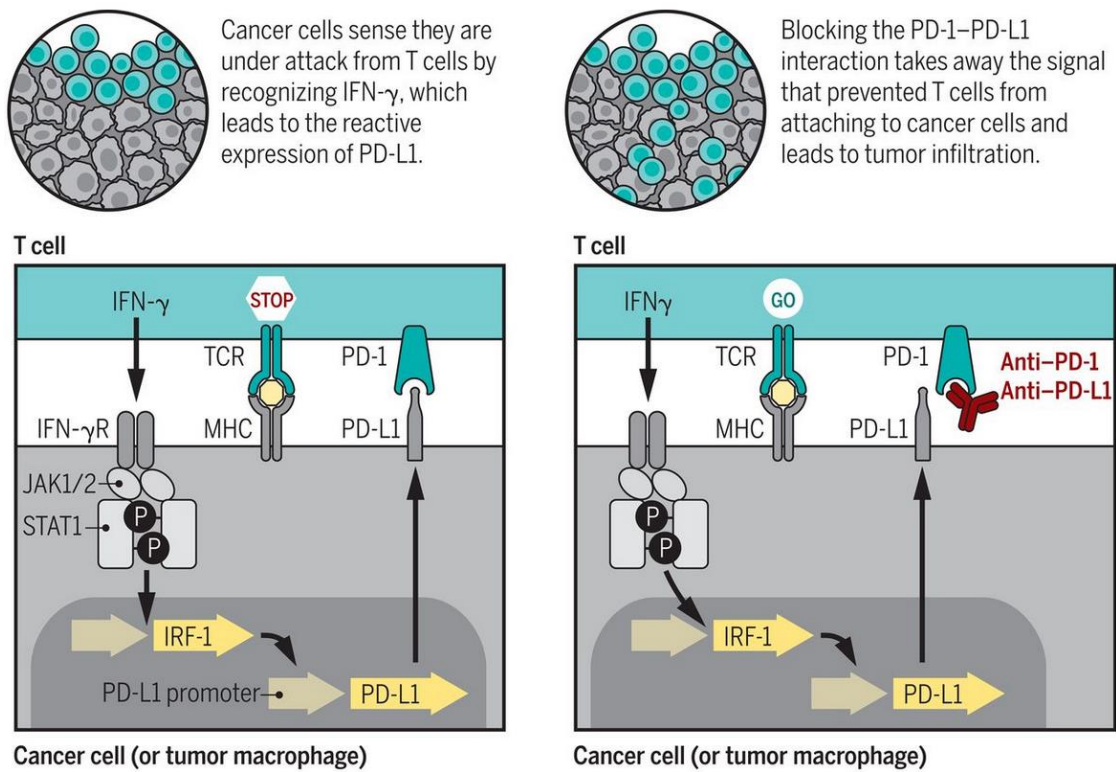
En moins d'une décennie, ce premier succès obtenu avec l'ipilimumab a été suivi de nombreux autres améliorations significatives pour les patients traités pour un mélanome, que ce soit en situation métastatique ou en situation adjuvante, seul ou en association à des anticorps monoclonaux ciblant d'autres ICKs, notamment PD-1 ou son ligand PD-L1 [figures 6 et 7] [6, 9, 101].

Figure 6 : Immunothérapie anti-tumorale et inhibition de PD-1, PD-L1 ou CTLA-4



Les cellules T reconnaissent les antigènes présentés par le CMH à la surface des cellules tumorales *via* leur TCR. Le second signal apporté par la molécule de co-stimulation B7 est nécessaire à l'activation lymphocytaire. La molécule CTLA-4 est rapidement surexprimée par les cellules T après leur activation et induit une régulation négative de celles-ci en se liant aux molécules de co-stimulation B7 exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes qui induisent un signal activateur ou inhibiteur selon qu'elles se lient à CD28 ou à CTLA-4 (encadré de gauche). Le récepteur inhibiteur PD-1 est exprimé par les cellules T en cas d'expositions antigéniques prolongées et induit une régulation négative lors de sa fixation à ses ligands PD-L1 et PD-L2 qui sont exprimés dans le microenvironnement tumoral ; cette interaction PD-1/PD-L1(-L2) a lieu durant la phase effectrice de la cellule T, dans les tissus périphériques (encadré de droite). D'après Ribas, N Engl J Med (2012) [102]

Figure 7 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de PD-1 et PD-L1

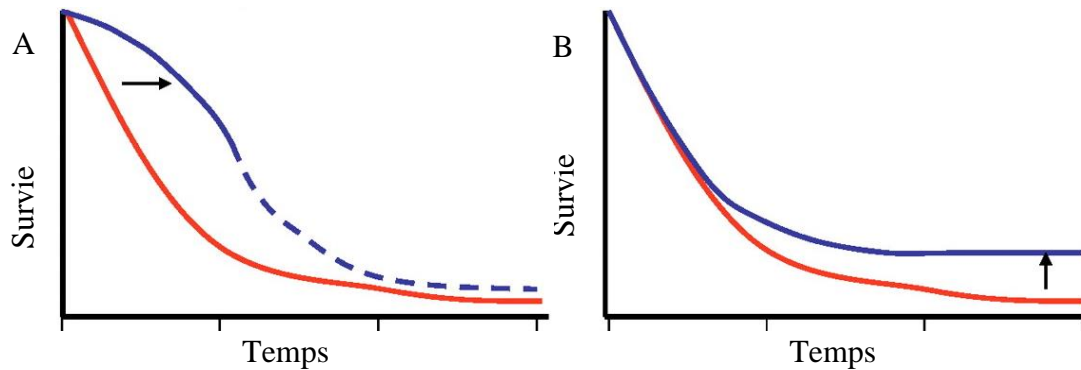


La reconnaissance par le TCR de l'antigène spécifique présenté par les molécules du CMH à la surface des cellules tumorales induit l'activation des fonctions effectrices de la cellule T qui produit alors de l'IFN γ et d'autres cytokines. Les cellules tumorales et autres cellules du micro-environnement expriment des récepteurs à l'IFN γ qui induisent *via* JAK1/2 et d'autres transducteurs du signal la traduction de différents gènes de réponse à l'IFN γ , notamment l'IRF-1 (interferon regulatory factor-1) qui se lie à PD-L1 amenant à son transport à la surface cellulaire. L'expression de PD-L1 induit alors l'extinction des cellules T anti-tumorales (encadré de gauche). L'inhibition de PD-1 et de PD-L1 par des anticorps monoclonaux induit la prolifération des cellules T et leur infiltration dans les tumeurs, d'où une réponse T cytotoxique et une réponse tumorale à ces traitements (encadré de droite). D'après Ribas and Wolchok, Science 2018 [103]

b) Un profil d'efficacité particulier

Il est important de noter que le profil d'efficacité de l'immunothérapie diffère fondamentalement de celui des thérapies antitumorales conventionnelles (chimiothérapies cytotoxiques ou thérapies ciblée). En effet, il est caractérisé par des réponses cliniques durables, qui se traduisent par une plus ou moins forte proportion de patients présentant une survie sans événement prolongée. Cela peut être visualisé sur les courbes de survie, avec une queue de courbe en plateau, de plus ou moins haute altitude selon la localisation tumorale et le type d'immunothérapie (monothérapie, combinaison, *etc.*) [figure 8].

Figure 8 : Courbes de survie sous immunothérapie ou traitements conventionnels



Effet des chimiothérapies cytotoxiques et thérapies ciblées (A), et de l'immunothérapie (B) : les chimiothérapies cytotoxiques et thérapies induisent une réponse tumorale rapide mais rarement durable, résultant en une amélioration précoce des courbes de survie, mais sans amélioration claire de la queue de la courbe. D'après Ribas et al., Clin. Can. Res (2012) [104]

c) L'élargissement aux autres localisations tumorales

De manière intéressante, le spectre d'efficacité de cette nouvelle forme d'immunothérapie s'est élargi aux localisations tumorales reconnues comme sensibles aux immunothérapies conventionnelles. Dans le cancer du rein, l'association de l'ipilimumab au nivolumab (anticorps anti-PD-1) est associée à un taux de survie à 18 mois de 75%, contre 60% avec le sunitinib (inhibiteur de tyrosine kinase antiangiogénique), et 20 à 30% avec l'IFNa [105]. Dans le cancer de la vessie, l'efficacité des ICKi paraît moindre que dans le cancer du rein ou le mélanome, avec néanmoins des résultats positifs, qui devraient amener à des recherches translationnelles poussées afin de sélectionner les patients à même de tirer un bénéfice clinique de ces traitements [106–109].

Le blocage des ICKs est également efficace dans d'autres localisations tumorales, et en premier lieu le cancer du poumon avec un taux de survie à 1 an passant de 49% sous chimiothérapie seule à 69% en combinant la chimiothérapie au pembrolizumab (anti-PD-1) [8, 110]. Le cas du cancer du poumon est intéressant à plusieurs égards. Tout d'abord, il est important de noter que les tumeurs avec une mutation activatrice de l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*), qui ont une oncogénèse particulière, indépendante du tabagisme, semblent résistantes à l'immunothérapie [111]. Par ailleurs, l'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses s'est révélé être un biomarqueur prédictif de l'efficacité des anticorps anti-PD1, avec une valeur insuffisante pour restreindre ce traitement à un sous-groupe

particulier, mais permettant néanmoins d'optimiser la stratégie thérapeutique entre chimiothérapies conventionnelles et immunothérapie [112]. Enfin, différentes signatures génomiques ont été démontrées comme prédictives de l'efficacité des ICKi dans le cancer bronchique : la signature du « tabac », la charge mutationnelle et les mutations des systèmes impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN (système MMR, mutation de la polymérase epsilon) [113].

Ces signatures prédictives mettent en avant deux éléments centraux de la sensibilité des cancers à l'immunothérapie : la charge mutationnelle et les mécanismes oncogénétiques sous-jacent du phénotype hypermuté. Les résultats les plus spectaculaires de l'immunothérapie ont été observés dans le mélanome et le cancer broncho-pulmonaire, cancers causés majoritairement par une exposition chronique à des mutagènes (ultraviolets, tabagisme), deux cancers présentant le plus fort de taux de néo-antigènes tumoraux [114]. Dans le cadre du cancer du poumon, qui peut également se développer chez des personnes non exposées au tabac (tumeurs fréquemment mutées EGFR, voir ci-dessus), la signature du « tabac » était corrélée à la charge mutationnelle (qui peut varier d'un rapport x100 entre deux tumeurs) et à l'efficacité de l'immunothérapie [113]. Dans ce travail concernant le cancer broncho-pulmonaire, il est également important de noter qu'étaient retrouvés 3 cas présentant des anomalies des systèmes de réplication et de réparation de l'ADN, à savoir de *POLD1* (ADN polymérase D1), *POLE* (ADN polymérase epsilon) et *MSH2* (*i.e.* tumeur dMMR).

F. Immunothérapie des cancers présentant une instabilité microsatellitaire

1. Activité anti-tumorale des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Les ICKi sont associés à une grande efficacité clinique chez les patients traités pour un CCRm MSI/dMMR, que ce soit le pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD-1), le nivolumab (anti-PD-1) seul ou en association avec l'ipilimumab (anti-CTLA-4) [12, 115–118]. A l'inverse, ces thérapies ciblées n'ont démontré aucune activité clinique chez les patients présentant un CCR MSS [119–121]. Les résultats de ces études de phase II non randomisées chez les patients avec un CCR MSI sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Données d'efficacité de l'immunothérapie pour les patients avec un cancer colorectal métastatique MSI

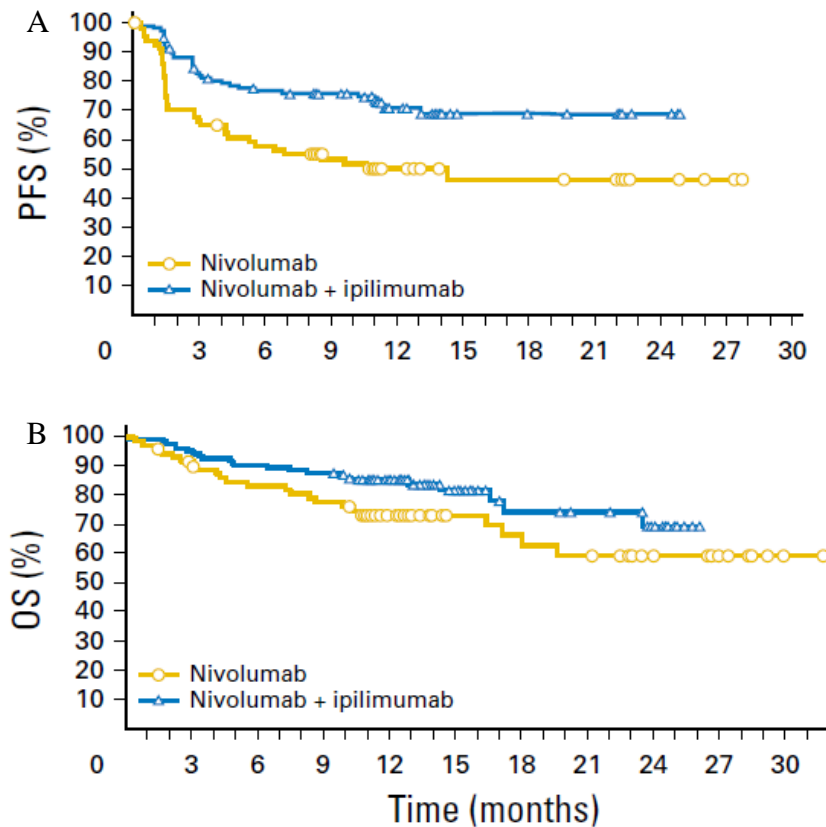
	N	CR (%)	PR (%)	SD (%)	PD (%)	NE (%)	Taux de SSP à 1 an (%)	SSP médiane (mois)	Suivi médian (mois)
Keynote-016									
Pembrolizumab [122]	28	11	46	32	4	7	-	NA	8.7
Keynote-164									
Pembrolizumab, cohorte A [123]	61	0	28	23	46	3	34	2.3	13.2
≥ 2 lignes préalables									
Pembrolizumab, cohorte B [116]	63	3	29	25	40	3	41	4,1	12.6
≥ 1 ligne préalable									
CheckMate-142									
Nivolumab [115, 118]	74	9	24	31	31	5	44	6.6	21
Nivolumab + Ipilimumab [117]	119	3	51	31	12	3	71	NA	13.4

CR: complete response (réponse complète : -100%) ; PR: partial response (réponse partielle : > -30%) ; SD: stable disease (stabilité tumorale : -30% à +20%) ; PD: progressive disease (progression tumorale : > +30%) ; SSP: survie sans progression ; SG: survie globale ; NA : non atteint

Le critère de jugement le plus représentatif de l'efficacité de ces médicaments anti-cancéreux est la durée de réponse des tumeurs MSI/dMMR aux ICKi, dont la médiane n'a toujours pas été atteinte dans aucune des 4 cohortes publiées, avec pourtant un suivi médian supérieur à 12 mois pour chacune d'entre elle. Les courbes de survie sont ainsi comparables à celles observées dans les autres localisations tumorales (voir section II.E.3.b) [figures 8 et 9].

L'activité majeure de ces nouveaux traitements a amené à l'autorisation de prescription aux Etats-Unis (*Food and Drug Administration (FDA) approval*) du pembrolizumab chez les patients avec un cancer avancé MSI chimio-réfractaire, quelle que soit la localisation tumorale, et du nivolumab seul ou associé au pembrolizumab pour les patients avec un CCRm MSI.

Figure 9 : Courbes de survie sous immunothérapie, l'exemple du cancer colorectal MSI



Courbes de survie sans progression (A) et de survie globale (B) des patients avec un cancer colorectal métastatique MSI traité par nivolumab seul ou en association à l'ipilimumab [117]

2. Profil de toxicité des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Le profil de toxicité des ICKi paraît acceptable. Aucun décès toxique n'a été rapporté chez les patients traités pour un CCR. Des événements indésirables sévères (de grade 3 ou 4 selon la classification NCI-CTCAE) ont été rapportés chez 11 à 21% des patients traités par anticorps anti-PD1 en monothérapie, et chez 32% des patients traités avec la combinaison du nivolumab et de l'ipilimumab. Il s'agit principalement d'hépatites, de colites, de pancréatites, ou d'atteintes endocriniennes telles que les thyroïdites, ce qui correspond à un profil de toxicité différent des agents cytotoxiques conventionnels requérant l'acquisition de nouvelles compétences par les cliniciens [124]. De manière intéressante, les patients pour qui l'immunothérapie a été arrêtée en raison d'effets secondaires semblent tirer un bénéfice similaire de ce traitement que la population globale étudiée (16 patients parmi les 119 de l'étude de combinaison du nivolumab et de l'ipilimumab, avec un taux de réponse objective de 63% et un taux de contrôle de la maladie supérieure à 12 semaines évalué à 81%) [12, 117, 118].

G. Aspects contextuels

1. Les cancers colorectaux MSI avant l'ère de l'immunothérapie

a) Pronostic

(1) Cancers colorectaux localisés

Aux stades localisés (stades I à III), les CCR MSI sont de meilleur pronostic que les CCR MSS. 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 MSI. S'appuyant sur les résultats de 5 essais de phase 3 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 MSI traité par chirurgie seule [125]. L'étude complémentaire de Sargent et al. validait ces résultats avec des HR à 0.46 pour la survie sans maladie et à 0.51 pour la SG ; ces tendances perdaient cependant leur significativité en analyse multivariée [126].

En 2011, l'étude de Sinicrope analysait 2141 patients inclus dans différents essais randomisés de chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidines. En analyse multivariée, les 344 patients avec une tumeur MSI avaient une survie sans récurrence et une SG significativement prolongées par rapport au groupe MSS [127]. Ces résultats étaient retrouvés chez les patients traités et non traités avec des tumeurs MSI de stade II et de stade III, résultats confirmés spécifiquement pour le groupe des stades II par l'étude QUASAR où 10% des patients avec tumeur MSI ont rechuté ou sont décédés, contre 27% des patients MSS [128].

L'étude PETACC-3, qui a analysé les CCR de stade II et III, a confirmé le caractère pronostique positif du statut MMR [129]. Cet impact pronostique est majeur pour les tumeurs de stades II, sur la SSR (HR 0.26, IC95 0.10–0.65) et la SG (HR 0.16, 0.04–0.64) [130]. Pour les stades III, il reste significatif sur la SSR (HR 0.67, 0.46–0.99), mais pas sur la SG (HR 0.70, 0.44–1.09).

L'impact pronostique du statut MSI semble s'amenuiser au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, des stades localisés au stade métastatique. Ainsi la méta-analyse du groupe ACCENT (N = 7803) a montré que chez les patients traités par chirurgie seule, le statut MSI confère un avantage pronostique en termes de survie sans récurrence et de survie globale, avec un impact plus important pour les cancers de stade II que pour les cancers de stade III [tableau 3] [131]. L'analyse de l'étude PETACC-3 montre également que l'impact pronostique positif de MSI observé pour les CCR de stade III est perdu dans les tumeurs avec un envahissement

ganglionnaire important (4 ganglions ou plus) [132]. A l'inverse, le statut MSI a un impact pronostique péjoratif dans les CCR de stade IV (voir ci-dessous).

Il est important de noter que la mutation V600E de *BRAF*, fréquemment associée au statut MSI, n'a pas d'impact pronostique chez les patients avec des CCR MSI de stade III, tandis qu'elle est associée à des taux de survie inférieurs pour les tumeurs MSS [61].

Tableau 3 : Résultats de la méta-analyse ACCENT (Adjuvant Colon Cancer Endpoints)

		N	Survie sans récurrence à 5 ans			Survie globale à 5 ans		
			MSI	MSS	Hazard ratio	MSI	MSS	Hazard ratio
Stade II	Chirurgie	307	89%	74%	0.27	90%	78%	0.27
					<i>P</i> = .012			<i>P</i> = .011
	5FU	1155	88%	83%	0.81	88%	87%	0.87
					<i>P</i> = .28			<i>P</i> = .47
Stade III	Chirurgie	264	60%	47%	0.59	59%	54%	0.69
					<i>P</i> = .16			<i>P</i> = .28
	5FU	2723	72%	64%	0.80	77%	71%	0.79
					<i>P</i> = .025			<i>P</i> = .097

[131]

(2) Cancers colorectaux métastatiques

L'impact du statut dMMR sur le pronostic des patients atteints d'un CCR à un stade métastatique n'est pas encore totalement élucidé. La faible prévalence des CCRm MSI comparativement aux stades II et III (5% *versus* 15-20%) souligne la faible capacité de ce type tumoral à développer des métastases. Peu de données sont disponibles concernant le pronostic des patients avec un CCRm MSI. Jusqu'à récemment, les études ayant évalué l'impact pronostique du statut MMR dans cette situation avaient inclus de très faibles échantillons, rendant les résultats statistiquement non significatifs et difficilement interprétables [tableau 4].

Tableau 4 : Valeur pronostique de l'instabilité des microsatellites dans les cancers colorectaux métastatiques

Auteur, année	N (MSI / MSS)	Survie globale (mois)		P
		MSI	MSS	
Brueckl, 2003 [133]	43 (7 / 36)	33	19	0.021*
Des Guetz, 2007 [134]	40 (9 / 31)	16	22.5	0.16
Koopman, 2009 [135]	515 (18 / 497)	10.2	17.9	0.41
Tran, 2011 [136]	350 (40 / 310)	11.1	22.1	0.001*
Venderbosch, 2014 [137]	3063 (153 / 2910)	13.6	16.8	0.001*

* : statistiquement significatif

L'analyse poolée de 4 études de phase III en situation de 1^e ligne métastatique (études CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS) a permis de mieux appréhender le profil pronostique des CCRm MSI [137]. Parmi les 3063 patients présentant un CCR de stade IV, ceux avec une tumeur MSI (n = 153 ; 5%) avaient une SSP et une SG significativement réduites par rapport aux patients avec un cancer MSS (HR = 1.33, IC95 1.12-1.54 ; HR = 1.35, IC95 1.13-1.61, respectivement), suggérant que le phénotype MSI a un impact pronostic péjoratif en situation métastatique.

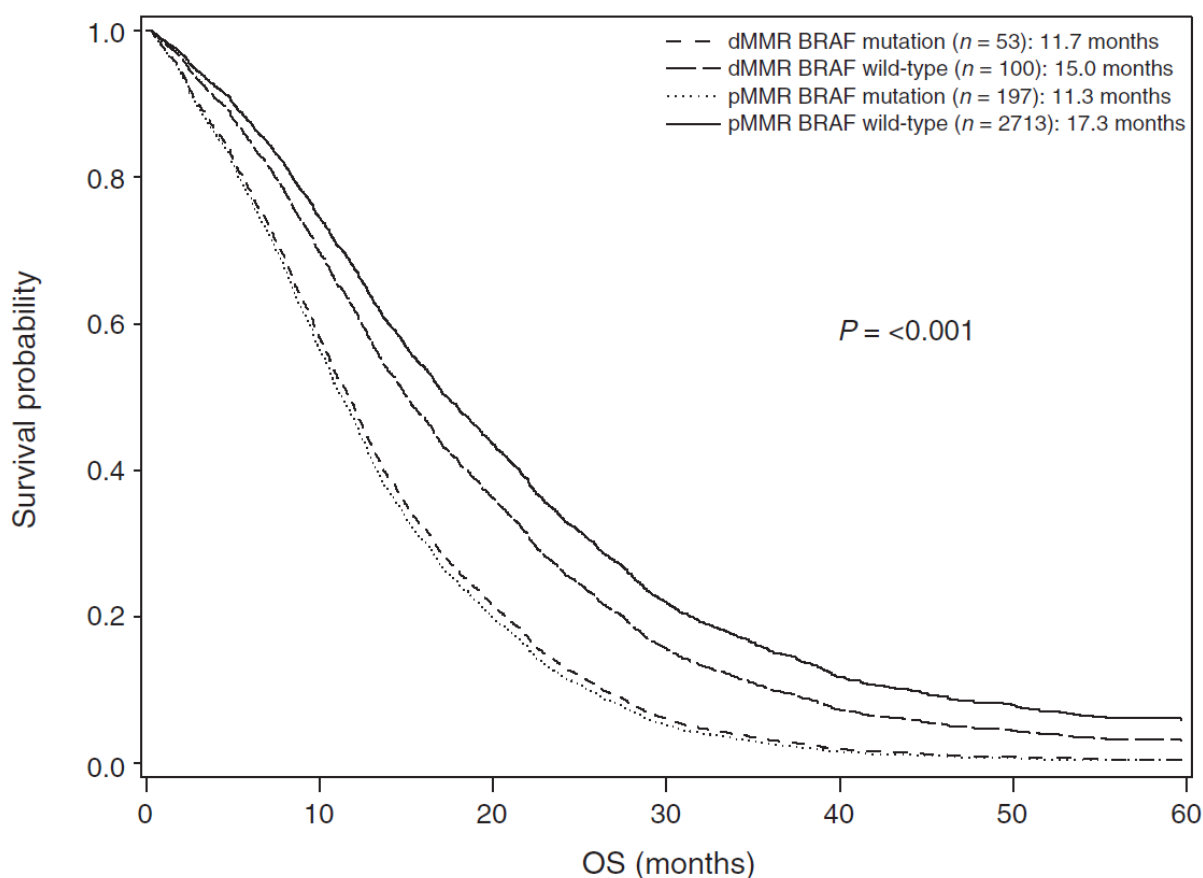
La prise en compte de l'association forte entre MSI et *BRAFV600E* permet de préciser ces données et semble indiquer que le pronostic défavorable observé pour les patients présentant un CCRm MSI est lié à l'impact péjoratif de la mutation *BRAFV600E*, retrouvée dans 34% des cas dMMR [tableau 5 ; figure 10].

Tableau 5 : Médianes de survie globale selon les statuts *BRAF* et microsatellitaire dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS

	<i>BRAF</i> ^{MT}		<i>BRAF</i> ^{WT}		dMMR		pMMR	
	dMMR	dMMR	dMMR	pMMR	<i>BRAF</i> ^{MT}	<i>BRAF</i> ^{WT}	<i>BRAF</i> ^{MT}	<i>BRAF</i> ^{WT}
Nombre de patients	53	197	100	2713	53	100	197	2713
SG, médiane (mois)	11.7	11.3	15.0	17.3	11.7	15.0	11.3	17.3
HR (IC95)	1.05 (0.68-1.63)		1.22 (0.91-1.65)		1.51 (0.93-2.46)		1.94* (1.57-2.40)	

* : statistiquement significatif ; *BRAF*^{MT} : *BRAF*V600E muté ; *BRAF*^{WT} : *BRAF* sauvage [137]

Figure 10 : Courbes de survie globale selon les statuts *BRAF* et microsatellitaire en situation métastatique



dMMR : MMR-déficient ; pMMR : MMR-proficient ; OS : survie globale (mois)

d'après Venderbosch et collègues, Clin. Can. Res. (2014)

b) Chimiothérapies cytotoxiques

(1) Chimiothérapie adjuvante des cancers localisés

L'impact prédictif du statut MSI sur l'efficacité des chimiothérapies adjuvantes par fluoropyrimidines a été complexe à appréhender. Tout d'abord, l'analyse de Ribic (N = 570) a montré que les patients avec des CCR MSS de stades II et III avaient une meilleure SSR et SG lorsqu'ils recevaient une chimiothérapie adjuvante contenant une fluoropyrimidine (HR = 0.69, P = 0.002), contrairement au groupe MSI (HR 2.17, P = 0.10) [125]. L'analyse confirmatoire de Sargent (N = 1027) montrait en outre une réduction significative de la SSR pour les CCR MSI de stade II lorsqu'ils recevaient une fluoropyrimidine en adjuvant (HR = 2.59, P = 0.04). La méta-analyse du groupe ACCENT, si elle ne mettait pas en évidence d'impact péjoratif du traitement adjuvant pour les CCR MSI de stade II, confirmait l'absence d'efficacité des fluoropyrimidines dans ce sous-groupe [126, 131]. Ces données permettent de conclure que le statut MSI doit être connu pour les stades II, car en cas de tumeur MSI, il n'y a pas d'indication à une chimiothérapie par fluoropyrimidines en raison de leur pronostic excellent et de l'absence d'impact de la chimiothérapie adjuvante dans cette situation.

Pour les CCR de stade III, la situation est différente puisque le traitement adjuvant de référence est l'association d'une fluoropyrimidine à l'oxaliplatine [138]. La problématique du bénéfice apporté par l'ajout de l'oxaliplatine en situation adjuvante selon le statut MSI a été initialement soulevée par Zaanan et al., dans une étude rétrospective, montrant un effet positif sur la SSR des patients avec un CCR MSI de stade III traités par FOLFOX [139]. Une seconde étude française a repris 433 CCR MSI dont 186 tumeurs de stade III, traitées par 5-FU seul ou FOLFOX [140]. En analyse multivariée, l'ajout de l'oxaliplatine était associé à une amélioration significative de la SSR (HR = 0.29 ; P = 0.003). Le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine était retrouvé de manière significative dans les tumeurs de stade III (HR 0.39 ; P = 0.0014) et avec une tendance forte dans les stades II de haut risque (HR 0.141 ; P = 0.549). L'essai MOSAIC, qui a démontré la supériorité du FOLFOX4 sur le LV5FU2 pour les CCR réséqués de stade II ou III, a permis de suggérer l'intérêt du FOLFOX pour les tumeurs MSI dans le cadre d'une étude prospective de phase III [141]. Les résultats à 10 ans de cette étude (N = 1 008) sur les 95 cas MSI sont en faveur de l'ajout de l'oxaliplatine sur la SSR (HR 0.48 ; IC95 0.207-1.16) et la SG (HR 0.41 ; IC95 0.16-1.07), mais le nombre de patients avec une tumeur MSI dans cette étude est insuffisant pour être statistiquement significatif [20]. De même, les études C-07 et C-08 du NSABP manquaient de puissance statistique pour pouvoir mettre en évidence une amélioration de la survie par l'ajout de l'oxaliplatine chez les patients

avec un CC MSI de stade III (seulement 12 et 16 rechutes dans les groupes MSI des études C-07 et C-08, respectivement) [142, 143]. Le statut MSI n'a à ce jour pas démontré son intérêt dans l'indication d'un traitement adjuvant dans les stades III, qui demeure une association de l'oxaliplatine à une fluoropyrimidine, pour une durée de 3 à 6 mois [144].

(2) Chimiothérapie palliative des cancers métastatiques

La littérature scientifique est très limitée concernant la sensibilité des cancers colorectaux métastatiques aux chimiothérapies cytotoxiques conventionnelles ou aux thérapies dites ciblées telles que les antiangiogéniques (bevacizumab, aflibercept) ou les anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR (cetuximab, panitumumab).

Dans une analyse poolée de 4 essais randomisés (CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS), les patients avec un CCRm MSI/dMMR avait une survie sans progression en 1^e ligne inférieure à celle de la population avec un cancer MSS (médiane de 6.2 mois *versus* 7.6 mois respectivement, HR = 1.33, IC95 1.12-1.57). Une large étude rétrospective française est actuellement en cours d'analyse pour évaluer la chimiosensibilité des cancers métastatiques MSI selon le type de traitement réalisé (irinotécan ou oxaliplatine, antiangiogéniques ou thérapies anti-EGFR), étude réalisée notamment avec les données de la cohorte clinique constituée pour notre travail de thèse. La médiane de survie sans progression chez les patients en situation non curative (avec des métastases irrésécables) n'était que de 3.9 mois, sans différence observée entre les types de chimiothérapie (5-fluorouracile seul ou en association à l'irinotécan ou à l'oxaliplatine), et sans amélioration significative de la survie avec l'ajout des anti-angiogéniques ou des anti-EGFR. Concernant les traitements ciblant l'EGFR, il est important de relever que les CCR MSI sont fréquemment *BRAF* mutés et se développent principalement dans le côlon proximal, deux situations pour lesquelles ces thérapies ciblées ont été démontrées comme peu ou pas efficaces [62, 63, 145].

Les résultats de ces études, bien que parcellaires, montrent donc que les CCRm MSI semblent relativement résistants aux chimiothérapies conventionnelles. Les études randomisées actuellement en cours comparant les ICKi aux chimiothérapies standards permettront d'explorer de manière plus rigoureuse la chimiosensibilité des CCRm MSI.

2. Développement de l'immunothérapie dans les cancers colorectaux MSI

a) *Cancers colorectaux métastatiques MSI*

Les différentes cohortes publiées concernant l'activité clinique des ICKi pour les patients avec un CCR MSI ne concernent que les patients en situation métastatique, en progression

tumorale malgré au minimum une ligne de chimiothérapie, et sans comparaison directe possible aux chimiothérapies conventionnelles puisque ces essais n'étaient pas randomisés (voir section II.F.1). L'un des enjeux majeurs est à présent de savoir comment utiliser ces nouveaux traitements, en les intégrant à l'arsenal thérapeutique existant.

Le pembrolizumab est actuellement en cours d'évaluation en première ligne métastatique dans une étude de phase 3 dans l'étude Keynote-177 (NCT02563002) qui évalue l'efficacité et la tolérance de cet inhibiteur de PD-1 en comparaison à la chimiothérapie standard. Les patients sont randomisés pour recevoir le pembrolizumab dosé à 200 mg toutes les 3 semaines ou une chimiothérapie dont le choix est laissé à l'investigateur (FOLFOX6m ou FOLFIRI, seul ou en association au cetuximab ou au bevacizumab), le traitement étant poursuivi jusqu'à progression, toxicité inacceptable ou réalisation de 35 cycles de pembrolizumab (soit 2 ans de traitement). Un *cross-over* vers le pembrolizumab est autorisé pour les patients randomisés dans le bras chimiothérapie. Le critère de jugement principal est la survie sans progression. Si son objectif principal est atteint, cette étude de phase 3 pourrait amener à l'autorisation de mise sur le marché en situation de maladie métastatique non prétraitée par chimiothérapie pour les patients avec un CCR MSI.

En situation de première ligne métastatique, l'étude de phase 3 COMMIT évalue l'atezolizumab (anticorps monoclonal anti-PD-L1 ; NCT02997228) seul ou combiné au FOLFOX plus bevacizumab, ces 2 bras de traitement étant comparé au FOLFOX plus bevacizumab. Le critère de jugement principal est la survie sans progression. Cette étude de phase 3 apportera les premières données d'activité clinique des inhibiteurs de PD-L1 (avec l'étude de phase 2 randomisée SAMCO, qui évalue l'avelumab en 2^e ligne de traitement).

Chez les patients réfractaires aux chimiothérapies conventionnelles (5-fluorouracile, oxaliplatine, irinotécan, bevacizumab, anti-EGFR pour les tumeurs *RAS* sauvages), l'essai de phase 2 mono-bras NIPICOL (NCT03350126), au sein duquel les patients sont traités par nivolumab à l'ipilimumab, permettra de savoir comment évaluer sur le plan radiologique l'efficacité des ICKi, en comparant les critères RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) et iRECIST dans l'analyse du taux de contrôle tumoral à 12 semaines [146].

Les essais cliniques avec ICKi pour les patients avec un CCR MSI actuellement ouverts en France sont résumés dans le tableau 6.

b) Cancers colorectaux localisés MSI

Une autre situation de grand intérêt sur le plan clinique est la situation adjuvante, pour les patients opérés pour un CCR MSI localisé. Dans cette situation où le traitement standard est l'association de l'oxaliplatine à une fluoropyrimidine pendant 3 à 6 mois avec des taux de guérison avoisinant 80%, il paraît important d'évaluer l'efficacité des ICKi. L'étude Alliance A021502 (NCT02912559) compare ainsi le traitement par FOLFOX à son association avec l'atezolizumab pour les patients avec un cancer colique de stade III (*i.e.* avec une atteinte ganglionnaire). Dans le bras expérimental, les patients reçoivent 6 mois de chimiothérapie combinée à l'atezolizumab, suivis de 6 mois supplémentaires de traitement par atezolizumab seul.

c) Problématiques liées au développement de l'immunothérapie

Si la comparaison des ICKi aux chimiothérapies conventionnelles correspond à une suite logique dans le développement de ces nouveaux traitements anti-cancéreux, d'autres problématiques apparaissent et requièrent des études dédiées.

La première de ces problématiques concerne la résistance des tumeurs MSI à l'immunothérapie. Tout d'abord, entre 12 et 40% des tumeurs MSI semblent présenter une résistance primaire aux ICKi, avec une progression tumorale dès la première évaluation radiologique généralement effectuée 6 à 8 semaines après l'initiation du traitement [115–117]. Par ailleurs, des résistances acquises, secondaires, peuvent également apparaître [103, 147]. Les principaux biomarqueurs putatifs (statut mutationnel de *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF*, origine sporadique ou héréditaire de la déficience MMR, charge mutationnelle) n'ont pas montré d'impact prédictif sur l'efficacité des ICKi [12, 115, 117]. Certains mécanismes de résistance sont en train d'être mis en évidence, tels que les mutations délétères de JAK (10 à 20% des cancers MSI), les pertes des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité ou les mutations de la bêta-2-microglobuline [148–151].

Tableau 6 : Essais cliniques d'immunothérapie pour les patients avec un cancer colorectal MSI actuellement ouverts en France

Numéro d'enregistrement	Essai	Condition	Intervention	Type	Cible
NCT02671435	-	MSI ou MSS	durvalumab + monalizumab	phase I	PD-L1 et NKG2A
NCT03202758	MEDITREME	MSI ou MSS ; chimio-naïf	durvalumab + tremelimumab + FOLFOX	phase I-II	PD-L1 et CTLA-4
<i>Essais dédiés aux cancers MSI</i>					
NCT02791334	PACT	MSI	LY3300054	phase I	PD-L1
NCT02332668	KEYNOTE-051	MSI ; chimiorésistant ; < 18 ans	pembrolizumab	phase II	PD-1
NCT03350126	NIPICOL	MSI ; chimiorésistant	nivolumab + ipilimumab	phase II	PD-1 et CTLA-4
NCT03186326	SAMCO	MSI ; résistant à une ligne de chimiothérapie	avelumab + chimiothérapie	phase II randomisée	PD-L1
NCT02528357	ENGAGE-1	MSI ; chimiorésistant	GSK3174998 ± pembrolizumab	phase I	OX-40 et PD-1
NCT02715284	-	MSI, résistant à 2 lignes de chimiothérapie	TSR-042	phase I	PD-1
<i>Essais dédiés aux cancers résistants aux inhibiteurs de PD-1 ou PD-L1</i>					
NCT03343613	I9L-MC-JZCA	MSI ; résistant aux anti-PD-1 ou PD-L1	LY3300054	phase I	PD-L1 et IDO

III. Résultats

A. Axe nosologique

Jusqu'à la découverte du phénotype MSI comme biomarqueur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie, son impact clinique pour les cancers colorectaux métastatique restait peu exploré du fait d'une part de sa faible prévalence (3 à 5%) et d'autre part de l'absence d'impact thérapeutique. L'émergence des ICKi et l'association du phénotype MSI avec la mutation *BRAFV600E*, biomarqueur de mauvais pronostic entraînant des adaptations thérapeutiques (intensification des chimiothérapies) ont amené la communauté scientifique et médicale à s'intéresser plus avant aux CCR MSI de stade IV.

L'axe nosologique développé durant notre travail de thèse s'est intéressé à la description de l'histoire naturelle de la maladie métastatique des CCR MSI, en portant un intérêt particulier au caractère sporadique ou héréditaire de la déficience du système MMR qui se présente comme un potentiel biomarqueur d'intérêt dans le cadre de l'immunothérapie. Nous avons pour cela construit une collection biologique constituée d'échantillons tumoraux des tumeurs primitives et/ou des métastases de CCRm MSI de patients provenant de différents hôpitaux français, dont les données cliniques ont été également recueillies. Les statuts MMR, *BRAF* et la méthylation du promoteur de *MLHI* ont été systématiquement analysés pour identifier les cas sporadiques et les cas *a priori* reliés au syndrome de Lynch.

La notion de « histoire familiale de syndrome de Lynch » est apparue dans les différents essais d'immunothérapie pour les cancers MSI, dans le but d'évaluer l'origine sporadique ou héréditaire de la déficience du système MMR comme potentiel biomarqueur d'efficacité [12, 115, 117]. Cette dichotomisation est réalisée de manière non systématisée à partir de différents éléments des dossiers médicaux : âge, antécédents familiaux, et, si disponibles, immunohistochimie MMR, statut mutationnel de *BRAF* et analyse de l'ADN germinale. Nous avons également dans ce travail évalué le risque d'erreur dans la distinction sporadique / germinale en utilisant cette méthodologie, en comparaison à une analyse systématisée de l'expression des protéines MMR, du statut de méthylation de *MLHI* et de *BRAF* (et d'une mutation germinale connue lorsque cette analyse avait été réalisée).

Nous montrons, à partir d'une cohorte de 129 patients, que les CCRm MSI reliés au syndrome de Lynch ont une histoire naturelle distincte de celle des CCRm MSI sporadiques. Ces derniers, plus fréquemment retrouvés chez des personnes âgées, de sexe féminin et principalement développés à partir du côlon proximal, sont associés, de manière non

significative à une atteinte métastatique d'emblée plus fréquente que les cancers MSI héréditaires (56% *versus* 41%, $P = 0.10$). En analyse univariée, le caractère sporadique de la déficience MMR était associé à un moins bon pronostic, probablement en rapport avec un âge plus élevé au diagnostic et un moindre recours à la chirurgie des métastases (21% *versus* 54%, $P = 0.001$), deux paramètres qui étaient corrélés à la survie globale en analyse multivariée. Dans cette cohorte, nous montrons par ailleurs que 22% des CCRm MLH1/PMS2-négatifs auraient été mal classés (entre cancers sporadiques et héréditaires) en utilisant les données des dossiers médicaux plutôt qu'une analyse moléculaire systématisée.

Ce travail a été présenté sous la forme d'un poster au congrès annuel 2016 de l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), et publié dans *European Journal of Cancer* en 2017 [152] : Cohen R, Buhard O, Cervera P, et al (2017) Clinical and molecular characterisation of hereditary and sporadic metastatic colorectal cancers harbouring microsatellite instability/DNA mismatch repair deficiency. *Eur J Cancer* 86:266–274.



Original Research

Clinical and molecular characterisation of hereditary and sporadic metastatic colorectal cancers harbouring microsatellite instability/DNA mismatch repair deficiency



R. Cohen^{a,b,c,*}, O. Buhard^b, P. Cervera^{b,c,d}, E. Hain^b, S. Dumont^c,
A. Bardier^e, J.-B. Bachet^f, J.-M. Gornet^g, D. Lopez-Trabada^a,
S. Dumont^h, R. Kaciⁱ, P. Bertheau^j, F. Renaud^{k,l,m}, F. Bibeauⁿ,
Y. Parc^{b,c,o}, D. Vernerey^p, A. Duval^{b,c}, M. Svrcek^{b,c,d,l},
Thierry André^{a,b,c,l}

^a Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

^b INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France

^d Department of Pathology, Hôpital Saint-Antoine, APHP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

^e Surgical Pathology Department, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

^f Department of Hepato-Gastroenterology, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

^g Department of Hepato-Gastroenterology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

^h Department of Medical Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

ⁱ Department of Pathology, Hôpital Lariboisière, Paris, France

^j Department of Pathology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

^k Univ. Lille, UMR-S 1172 – JPARC – Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille F-59000, France

^l INSERM, UMR-S 1172, Team “Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis”, Lille F-59000, France

^m CHU Lille, Institut de Pathologie, Lille F-59000, France

ⁿ Department of Pathology, Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

^o Department of Surgery, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

^p Methodology and Quality of Life Unit in Oncology (INSERM UMR 1098), Centre Hospital-Universitaire de Besançon, France

Received 4 July 2017; received in revised form 5 September 2017; accepted 14 September 2017

Available online 19 October 2017

* Corresponding author: Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France. Fax: +33 (0)1 49 28 23 44.

E-mail address: romain.cohen@aphp.fr (R. Cohen).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.09.022>

0959-8049/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS

Microsatellite instability;
Mismatch repair;
Lynch syndrome;
BRAF mutation;
Immunotherapy;
Colorectal cancer

Abstract Background: Patients treated with chemotherapy for microsatellite unstable (MSI) and/or mismatch repair deficient (dMMR) cancer metastatic colorectal cancer (mCRC) exhibit poor prognosis. We aimed to evaluate the relevance of distinguishing sporadic from Lynch syndrome (LS)-like mCRCs.

Patients and methods: MSI/dMMR mCRC patients were retrospectively identified in six French hospitals. Tumour samples were screened for MSI, dMMR, *RAS/RAF* mutations and *MLH1* methylation. Sporadic cases were molecularly defined as those displaying *MLH1/PMS2* loss of expression with *BRAFV600E* and/or *MLH1* hypermethylation and no MMR germline mutation.

Results: Among 129 MSI/dMMR mCRC patients, 81 (63%) were LS-like and 48 (37%) had sporadic tumours; 22% of *MLH1/PMS2*-negative mCRCs would have been misclassified using an algorithm based on local medical records (age, Amsterdam II criteria, *BRAF* and MMR statuses when locally tested), compared to a systematical assessment of MMR, *BRAF* and *MLH1* methylation statuses. In univariate analysis, parameters associated with better overall survival were age ($P < 0.0001$), metastatic resection ($P = 0.001$) and LS-like mCRC ($P = 0.01$), but not *BRAFV600E*. In multivariate analysis, age (hazard ratio (HR) = 3.19, $P = 0.01$) and metastatic resection (HR = 4.2, $P = 0.001$) were associated with overall survival, but not LS. LS-like patients were associated with more frequent liver involvement, metastatic resection and better disease-free survival after metastasectomy (HR = 0.28, $P = 0.01$). Median progression-free survival of first-line chemotherapy was similar between the two groups (4.2 and 4.2 months; $P = 0.44$).

Conclusions: LS-like and sporadic MSI/dMMR mCRCs display distinct natural histories. MMR, *BRAF* mutation and *MLH1* methylation testing should be mandatory to differentiate LS-like and sporadic MSI/dMMR mCRC, to determine in particular whether immune checkpoint inhibitors efficacy differs in these two populations.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microsatellite instability (MSI) is caused by the deficiency of the mismatch repair (MMR) system, resulting from a germline mutation in MMR genes (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*) predisposing to Lynch syndrome (LS), or an epigenetic inactivation of *MLH1*. Sporadic MSI/MMR-deficient (dMMR) colorectal cancer (CRC), unlike LS-related CRC, is associated with the *BRAFV600E* mutation, through its association with CIMP (CpG island methylator phenotype) [1]. MMR genes germline mutation cannot always be detected in LS and the definition of sporadic MSI/dMMR CRCs and CRCs presumed to be LS-related (i.e. Lynch-like) has evolved over time, from clinical criteria to a tailored approach with *BRAF* and *MLH1* methylation testing for CRCs showing a loss of *MLH1* expression [2–5].

Stage II MSI/dMMR CRC has a favourable prognosis. 5-Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy (5-fluorouracil alone, with leucovorin or levamisole) is ineffective on stage II MSI/dMMR CRCs [6]. However, the addition of oxaliplatin to fluoropyrimidines seems associated with a survival benefit for patients with high-risk stage II or stage III MSI/dMMR CRCs [7,8]. Sensitivity to fluoropyrimidine may differ between sporadic and hereditary stage III MSI/dMMR CRCs [8,9].

In metastatic setting, the poor prevalence of MSI/dMMR (3–5%) hampers the evaluation of its prognostic value, and results from early studies were inconsistent [10–14]. The pooled analysis of four phase III studies in first-line treatment of mCRC demonstrated that dMMR is associated with reduced progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), with an insignificant negative effect of *BRAFV600E* among MSI mCRCs [15]. Thus, the impact of *BRAFV600E* on MSI CRCs remains controversial.

While immune checkpoint inhibitors (ICKs) have demonstrated promising efficacy for MSI tumours, unresolved issues persist concerning molecular and clinical heterogeneity among MSI/dMMR mCRC patients [16,17]. In our multicentre retrospective study, we aimed to evaluate a molecular definition of sporadic and inherited MMR deficiency of MSI/dMMR mCRC patients, with a particular interest in its clinical relevance before the era of immunotherapy.

2. Material and methods**2.1. Study population**

This retrospective study was conducted in six French hospitals. All patients with locally determined MSI and/or dMMR mCRC were eligible. Tumour specimen

collection was mandatory. Exclusion criteria were: no tumour specimen available, MMR-proficient (pMMR) and microsatellite stable (MSS) tumours. Ethical approval was provided by an institutional review board (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV, N° IRB 00003835) on 20th November 2014.

2.2. Clinical data

All medical and pathological records were analysed for demographic and clinical characteristics, treatment received and survival. CRCs arising in the splenic flexure, descending colon, sigmoid colon or rectum were classified as left-sided; those originating in caecum, ascending colon, hepatic flexure or transverse colon were classified as right-sided.

2.3. Tumour tissue analysis

All tumour specimen were tested for MMR and microsatellite statuses. *MLH1* promoter methylation status was assessed for *MLH1*/*PMS2*-negative tumours. *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutational statuses were evaluated [Supplementary Methods].

2.4. Determination of sporadic and Lynch syndrome-associated dMMR/MSI tumours

When the germline MMR gene mutation analysis was not available, patients were considered to have suspected LS if their tumour exhibited a loss of expression of *MSH2*/*MSH6*, *MSH6* alone or *PMS2* alone, or a loss of *MLH1*/*PMS2* expression without *BRAF* mutation and no *MLH1* hypermethylation. *MLH1*/*PMS2*-negative tumours harbouring *BRAF* mutation or *MLH1* hypermethylation were considered sporadic [18]. Similarly, sporadic or hereditary origin of MSI tumours with no loss of MMR protein expression was determined according to *BRAF* mutation and *MLH1* methylation [Fig. S1].

As comparator, an unsystematic molecular definition that only takes into account data provided by local pathological and medical records was also used (i.e. MMR testing and *BRAF* status when available; if not, age inferior to 60 years or Amsterdam II criteria) [8,9].

2.5. Statistical analysis

Median value (interquartile range) and frequency (percentage) were provided for the description of continuous and categorical variables, respectively. Medians and proportions were compared according to hereditary or sporadic origin using Student's *t* test and chi-squared test (or Fisher's exact test, if appropriate), respectively.

For patients with initially stage I–III tumours, disease-free survival (DFS) was calculated from primary tumour surgery to relapse (second CRC, loco-regional

or metastatic relapse) or death. Overall survival (OS) was defined as the time between the diagnostic of metastatic disease to the date of death as a result of any cause. Patients treated with ICK in clinical trials were excluded from OS analysis. For patients with resected metastatic disease, DFS was calculated from the date of metastasis resection to the date of relapse or death. Progression-free survival (PFS) was calculated from the date of first-line chemotherapy initiation for metastatic disease to the date of tumour progression or death from any cause; patients with metastasectomy during chemotherapy course were excluded from PFS analysis. Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method and compared with a Log-rank test. Follow-up was calculated by reverse Kaplan–Meier estimation.

Cox proportional hazard models were performed to estimate hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (95%CI) for factors associated with OS. The association of baseline parameters with OS was first assessed using univariate Cox analyses, parameters with *P* values < 0.05 were then entered into a final multivariate Cox regression model after considering collinearity among variables with a correlation matrix.

All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary NC) and R software version 2.15.2 (R Development Core Team, Vienna, Austria; <http://www.r-project.org>). *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant, and all tests were two-sided.

3. Results

3.1. Population

Among 160 patients identified with dMMR and/or MSI mCRC, 31 were excluded: no tumour sample available (*N* = 15), pMMR and MSS tumours according to centrally performed analysis (*N* = 16). The 129 remaining patients had been diagnosed with mCRC between January 1998 and January 2016.

3.2. Distinction between sporadic and Lynch-like tumours

Results of MMR immunohistochemistry, *BRAF* mutation and *MLH1* methylation analysis are presented in Table 1. Forty-eight patients (37%) had sporadic dMMR/MSI mCRC and 81 (63%) were presumed to be Lynch-like, according to the molecular approach combining MMR, *MLH1* methylation and *BRAF* mutation testing. Of note, 18 out of all 48 sporadic MSI/dMMR mCRCs (38%) were *BRAF* wild-type but *MLH1* hypermethylated.

A MMR gene germline mutation was known for 34 patients (26%). No *BRAF* mutation or *MLH1* hypermethylation were detected in the tumours of these 34 Lynch syndrome-proven patients.

Table 1
Molecular distinction between sporadic and Lynch-like tumours.

	Overall population	Sporadic group	Lynch-like group
	N (%)	N	N
Number of patients	129 (100)	48	81
MLH1/PMS2 loss of expression	71 (55)	44	27
<i>MLH1</i> constitutive mutation		–	12
<i>BRAF</i> ^{MT}		27	–
<i>BRAF</i> ^{WT} , hypermethylated		17	–
<i>BRAF</i> ^{WT} not hypermethylated		–	15
MSH2/MSH6 loss of expression	39 (30)	–	39
Loss of expression of MSH6 alone	9 (7)	–	9
Loss of expression of PMS2 alone	5 (4)	3 ^a	2
pMMR MSI tumours	5 (4)	1 ^b	4 ^c

BRAF^{MT}: *BRAF*V600E mutated; *BRAF*^{WT}: *BRAF* wild-type.

^a PMS2-negative *BRAF*^{MT}/hypermethylated tumours.

^b 1 MMR-proficient MSI *BRAF*^{MT} tumour.

^c 2 MMR-proficient MSI tumours with known MMR gene constitutive mutation, 2 *BRAF*^{WT} tumours without hypermethylation.

Twenty-two per cent of MLH1 and/or PMS2 negative mCRCs with no known MMR germline mutation (14/64) would have been misclassified using an unsystematic molecular approach. Taking into account local pathological records only, in the absence of our systematic analysis of *BRAF* mutation and *MLH1* methylation, nine Lynch-like tumours would have been considered as sporadic and five sporadic MSI/dMMR mCRCs as Lynch-like [Table S1].

3.3. Clinical and molecular characteristics

Demographic and clinical characteristics are summarised in Table 2. Median age at diagnosis of mCRC was 57 years. Among initially localised MSI/dMMR mCRCs ($N = 69$), 33% were stage II and 67% stage III. Main first metastatic sites were: peritoneum (46%), liver (38%), distant lymph nodes (33%) and lung (2%).

Patients with sporadic MSI/dMMR mCRC were associated with female ($P < 0.001$), older age at diagnosis ($P < 0.0001$), right-sided primary tumour ($P = 0.02$) and less liver involvement ($P = 0.02$), with a trend for synchronous metastatic disease (56% versus 41%, $P = 0.10$). A sex ratio of 3.1 (male/female) was observed for patients with Lynch-like mCRC.

Thirty-three per cent, 3% and 23% of all MSI/dMMR mCRCs harboured a mutation of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF*, respectively. Forty-five tumours (35%) were all wild-type.

3.4. Resection of metastatic disease

Resection of metastatic disease was reported in 54% of Lynch-like mCRCs ($N = 44/81$) and 21% of sporadic tumours ($N = 10/48$; $P < 0.001$). Resected metastases were located in peritoneum only ($N = 20$), liver only ($N = 19$), distant lymph nodes only ($N = 6$), multisites

Table 2
Clinical and molecular characteristics.

	Overall population	Sporadic group	Lynch-like group	<i>P</i>
	N (%)	N (%)	N (%)	
Number of patients	129 (100)	48 (100)	81 (100)	
Sex ratio (male/female)	1.4 (75/54)	0.4 (14/34)	3.1 (61/20)	<0.001 ^a
Age at diagnosis of metastatic CRC				
Median, Q1–Q3 (years)	57, 42–68	71, 61–76	47, 36–56	<0.0001 ^a
Stage at diagnostic				
Stage II	23 (18)	6 (13)	17 (21)	
Stage III	46 (36)	15 (31)	31 (38)	
Stage IV	60 (47)	27 (56)	33 (41)	0.10
Primary tumour plurifocality	14 (11)	3 (6)	11 (14)	0.25
Primary tumour location				
Right	86 (67)	39 (81)	47 (58)	0.02 ^a
Left	35 (27)	7 (15)	28 (35)	
Left and right ^b	8 (6)	2 (4)	6 (7)	
Primary tumour resection	125 (97)	47 (98)	78 (96)	0.99
First metastatic sites				
≥2 organs involved	37 (29)	11 (23)	26 (32)	0.32
Peritoneum	56 (46)	22 (46)	34 (42)	0.72
Liver	49 (38)	12 (25)	37 (46)	0.02 ^a
Distant lymph nodes	43 (33)	20 (42)	23 (28)	0.13
Others	21 (16)	5 (10)	16 (20)	0.22
<i>RAS/RAF</i> mutational status ^c				
<i>KRAS</i> mutation	46 (36)	7 (15)	39 (48)	<0.001 ^a
<i>NRAS</i> mutation	5 (4)	0 (0)	5 (6)	0.16
<i>BRAF</i> mutation	30 (23)	30 (63)	0	<0.001 ^a
All wild-type	45 (35)	11 (23)	34 (42)	0.02 ^a
Not evaluable	5 (4)	1 (2)	4 (5)	

^a Statistically significant.

^b Patients with both right-sided and left-sided tumours at diagnostic stage were classified as “left and right”.

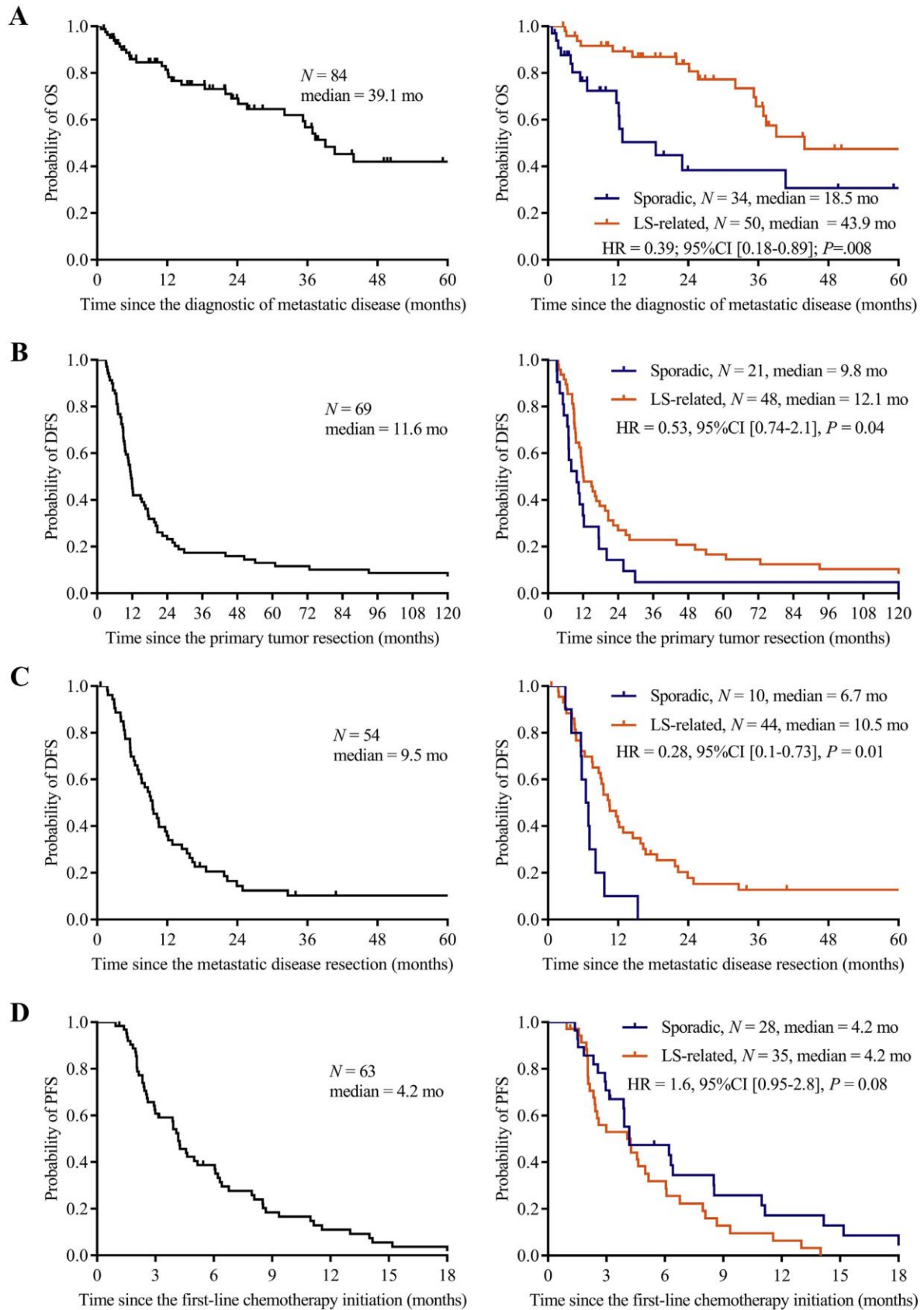
^c Two tumours exhibited two distinct mutations (both *KRAS* and *BRAF* mutations for one tumour; both *KRAS* and *NRAS* for the other one).

($N = 5$) or others ($N = 4$). Among those who relapsed ($N = 48$), metastatic resection was reiterated at least once for 16 patients (10 Lynch-like, 2 sporadic), 10 of which did not relapse during follow-up. At the data cut-off date, 16 patients (Lynch-like, $N = 15$; sporadic, $N = 1$) were in complete remission.

3.5. Survival

3.5.1. Overall survival

Among 129 MSI/dMMR mCRC patients, 45 were treated with ICK in KEYNOTE-164 and CHECKMATE-142 trials and therefore excluded from OS analysis. Median OS was 39.1 months in the overall population ($N = 84$). Median follow-up was 27 months. Median OS was superior for Lynch-like patients compared to sporadic cases (43.9 months versus 18.5 months; HR = 0.39, 95%CI [0.18–0.89], $P = 0.008$) [Fig. 1].



Results from univariate and multivariate analysis are presented in Table 3. In univariate analysis, hereditary origin of MMR deficiency (HR = 0.39, 95%CI [0.19–0.81], $P = 0.01$), younger age at diagnosis of metastasis ($P < 0.0001$) and resection of metastatic disease ($P = 0.0001$) were associated with better OS. *BRAF* mutation was not statistically associated with OS. Multivariate analysis showed that younger age and metastasis resection were associated with OS (HR = 0.314, 95%CI [0.129–0.766], $P = 0.01$ and HR = 0.238, 95%CI [0.100–0.564], $P = 0.001$), but not the origin of MMR deficiency (HR = 1.27, 95%CI [0.50–3.20], $P = 0.62$). Collinearity was observed between LS, age and metastasis resection (Table S2).

Among patients with sporadic MSI/dMMR mCRC, no difference in OS was observed according to *BRAF* status ($P = 0.91$).

3.5.2. Disease-free survival

For patients with initially localised mCRC ($N = 69$), median DFS was 11.63 months in the overall population, 9.8 months for sporadic cases and 12.1 months for Lynch-like tumours (HR = 0.53, 95%CI [0.74–2.1], $P = 0.04$).

For patients with metastatic disease resection ($N = 54$), median DFS after metastasectomy was 9.5 months and was significantly inferior for sporadic than Lynch-like patients (6.7 versus 10.5 months, HR = 0.28, 95%CI [0.1–0.73], $P = 0.01$) [Fig. 1].

3.5.3. First-line progression-free survival

Sixty-three patients received first-line chemotherapy for unresectable metastatic disease. Median PFS was 4.2 months in the overall population, as well as in sporadic and Lynch-like groups [Fig. 1]. Main chemotherapeutic regimens were: FOLFIRI ($N = 26$; 41%), FOLFOX ($N = 26$; 46%), and FOLFIRINOX ($N = 3$; 5%). Anti-angiogenic agents and anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) were associated with chemotherapy for 24 (38%) and 12 (19%) patients, respectively.

4. Discussion

We report here a large cohort dedicated to patients with MSI/dMMR mCRC. Although retrospective, this multicentre study exhibits robustness thanks to the mandatory tumour specimen collection. This biological collection paired to a clinical database allowed a systematic analysis of microsatellite, MMR, *BRAF* and *MLH1* methylation statuses.

We show that the determination of MMR deficiency origin using a molecular approach is technically feasible

in metastatic setting and efficient, despite poor pre-analysis conditions (i.e. retrospectively collected formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) samples). Indeed, 22% of patients with *MLH1*/*PMS2*-negative mCRC would have been misclassified using widely-used algorithms combining MMR immunohistochemistry, *BRAF* mutation, age and Amsterdam II criteria [8,9]. Notably, 38% of sporadic MSI/dMMR mCRCs were *BRAF* wild-type but *MLH1* hypermethylated. Twenty-five per cent of patients with sporadic MSI/dMMR mCRC were aged 60 or less, and 25% of Lynch-like patients were older than 55 years, indicating that age is ineffective at distinguishing inherited and sporadic MSI/dMMR mCRCs. Thus, when the germline MMR gene mutation analysis is not available, it is necessary to test MMR protein expression using immunohistochemistry and, for *MLH1*/*PMS2*-negative tumours, both *BRAF* mutation and *MLH1* methylation, in order to correctly identify sporadic or Lynch-like MSI/dMMR mCRCs [18,19].

In our cohort, 62% of MSI/dMMR mCRCs were presumed to be related to Lynch syndrome. This result might be explained by the fact that many participants of this cohort are expert centres for familial colorectal cancers. However, the true proportion of sporadic and inherited tumours among MSI/dMMR mCRCs is unknown. In our study, patients with sporadic MSI/dMMR mCRC were associated with female, older age, right-sided primary tumour and less liver involvement. These results are concordant with previously published works [12,20]. Surprisingly, Lynch-like mCRC patients had a sex ratio superior to 3 in favour of male. This trend was observed in a pooled analysis of randomised trials in first-line treatment among *BRAF* wild-type dMMR mCRC patients (66 males, 33 females) [15]. Further research will have to explore the biological determinants of this finding.

The inherited origin of MMR deficiency, younger age at diagnosis of mCRC and resection of metastasis were associated with better OS in univariate analysis. Our study being insufficiently powered to compute age as a continuous variable in multivariate analysis, a cut-off of 70 years was used [21]. Younger age and metastatic surgery, but not LS, were associated with OS in multivariate analysis. However collinearity among these variables was observed.

Of note, *BRAFV600E* was not associated with OS. Moreover, no prognostic difference was observed between *BRAF*-mutated and -wild type sporadic MSI/dMMR mCRC. This enlightens the analysis of Venderbosch and colleagues where the negative prognostic effect of *BRAFV600E* on OS did not reach statistical

Fig. 1. Kaplan–Meier curves of overall population and according to MMR deficiency origin for overall survival (1A), disease-free survival after primary tumour resection (1B) and resection of metastatic disease (1C) and first-line progression-free survival (1D). *LS-related: Lynch syndrome-related Black line: overall population; blue line: sporadic group; red line: Lynch-syndrome-related group (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

Table 3
Univariate and multivariate analysis for overall survival.

	Number of patients ^b	Number of events	Univariate analysis			Multivariate analysis		
			HR	95%CI	P-value	HR	95%CI	P-value
Age at metastatic diagnosis (years)	84	31	1.000	1.000–1.000	<.0001 ^a			
Age at metastatic diagnosis								
≥70 years	46	12	1			1		
<70 years	38	19	0.229	0.144–0.622	0.0012 ^a	0.314	0.129–0.766	0.0109 ^a
Gender								
Male	47	32	1					
Female	37	16	1.871	0.922–3.796	0.0828			
Metastatic disease								
Synchronous	36	14	1					
Metachronous	48	17	0.901	0.442–1.838	0.7753			
Location of primary tumour								
Right	54	24	1					
Left	25	6	0.376	0.153–0.925				
Left and right ^c	5	1	0.349	0.047–2.596	0.0735			
Number of metastatic sites								
1	66	23	1					
≥2	18	8	1.972	0.877–4.435	0.1005			
Peritoneal involvement								
No	48	17	1					
Yes	36	14	1.163	0.573–2.361	0.6761			
Resection of metastasis						1		
No	47	22	1			0.238	0.100–0.564	0.0011 ^a
Yes	37	9	0.208	0.094–0.460	0.0001 ^a			
BRAFV600E mutation								
Wild-type	64	23	1					
Mutated	20	8	1.987	0.881–4.481	0.0978			
Origin of MMR deficiency						1		
Sporadic	34	15	1			1.265	0.501–3.191	0.6185
Lynch-like	50	16	0.394	0.193–0.806	0.0107 ^a			

^a Statistically significant.

^b Patients treated with immune checkpoint inhibitors were excluded.

^c Patients with both right-sided and left-sided tumours at diagnostic were classified as “left and right”.

significance within MSI/dMMR mCRCs (HR = 1.51, 95%CI 0.93–2.46) [15]. On the contrary, Goldstein *et al.* reported a statistically significant negative impact of *BRAFV600E* on OS in a retrospective cohort of 55 MSI/dMMR mCRCs [22]. In localised setting, *BRAFV600E* is not associated with prognosis (OS) among stage II and III MSI/dMMR CRCs [21,23]. Since CMS 1 (consensus molecular subtype 1) has high *BRAF*-mutated and MSI tumours and is characterised by favourable recurrence-free survival but poor survival after relapse, it appears necessary to investigate the clinical and molecular heterogeneity of consensus molecular subtype (CMS)1 CRCs, with a particular interest in CpG island methylator phenotype (CIMP) status, which overlaps with *BRAF* mutation and MSI phenotype [24,25].

Patients with Lynch-like mCRC underwent metastasis surgery more frequently and exhibited a significantly better median DFS than sporadic MSI/dMMR mCRC patients (HR = 0.28, 95%CI [0.1–0.73], *P* = 0.01). This might be explained by the fact that Lynch-like mCRCs are associated with younger age and higher frequency of liver metastasis. Moreover, MMR genes mutation carriers are followed with colonoscopy every 1–2 years, allowing the early detection of CRC, whereas patients with sporadic MSI/dMMR mCRCs are associated with older age and therefore frequently out of screening programmes [19,26].

Median PFS for patients receiving first-line chemotherapy for unresectable mCRC did not differ between

sporadic and Lynch-like groups (4.2 months in both groups). This is consistent with the analysis of Venderbosch and colleagues (median PFS of 6.1 and 6.3 months for *BRAF*-mutated and *BRAF*-wild type MSI mCRC patients, respectively) [15]. The poor median PFS in first-line setting with comparison to the analysis of Venderbosch might be partly explained by the retrospective nature of our study. Moreover, since it was retrospectively not possible to properly differentiate patients with resectable or unresectable metastatic disease before the initiation of first-line chemotherapy, we excluded patients with metastasectomy from this PFS analysis.

Nivolumab monotherapy for MSI/dMMR mCRC (*N* = 74) showed promising efficacy in patients with or without clinical history of LS, determined by investigators based on past medical history collected from clinical records [17]. Similarly, favourable outcomes have been reported among *BRAFV600E*-mutated MSI/dMMR mCRCs treated with ICK [16,17,27]. However, these results should be taken with caution as the criteria for the distinction between sporadic and LS-related MMR deficiency were unclear. Given the clinical and survival differences observed in our cohort between sporadic and LS-related MSI/dMMR mCRC patients, the mechanism of the MMR deficiency should be systematically determined in future studies evaluating therapies in this population. An efficient and consensual definition, as we propose here, will be necessary to properly evaluate the efficacy of ICK for patients with MSI/dMMR mCRC with

regards on the mechanism underlying MMR deficiency.

5. Conclusion

As immunotherapy is on the rise for MSI/dMMR tumours, there is an urgent need for studies that clinically and molecularly characterise patients with MSI/dMMR mCRCs before the era of ICK. We show that MMR protein expression, *BRAF* mutation and *MLH1* promoter methylation testing are needed to properly distinguish sporadic and inherited MSI/dMMR mCRCs. MSI/dMMR mCRC is a clinically heterogeneous disease associated with poor chemosensitivity. With a distinct pattern of metastatic spread characterised by a higher frequency of liver involvement, patients with Lynch-like mCRC are associated with younger age, more frequent metastatic surgery and favourable prognosis compared to those with sporadic MSI/dMMR mCRC. *BRAF* mutation, *MLH1* methylation and MMR testing will be essential to evaluate whether the efficacy of anticancer treatments differs between sporadic and LS-related MSI/dMMR mCRC patients.

Funding

ARCAD Foundation.

Conflict of interest statement

RC has received travel expenses from Sanofi.

JBB declares honoraria from Amgen, Bayer, Celgene, Merck Serano and Sanofi, compensation from Amgen, Bayer, Merck Serono and Servier for consultancy and travel expenses from Merck Serano and Servier.

TA has received compensation from Bristol-Myers Squibb for consultancy and fees from Merck.

All remaining authors have declared no conflicts of interest.

Acknowledgement

The authors thank Delphine Lees for editorial assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.09.022>.

References

- [1] Colle R, Cohen R, Cochereau D, Duval A, Lascols O, Lopez-Trabada D, et al. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull Cancer (Paris)* 2017;104:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.11.006>.
- [2] Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, et al. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod Pathol* 2017.
- [3] Newton K, Jorgensen NM, Wallace AJ, Buchanan DD, Lalloo F, McMahon RFT, et al. Tumour MLH1 promoter region methylation testing is an effective prescreen for Lynch Syndrome (HNPCC). *J Med Genet* 2014;51:789–96. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102552>.
- [4] Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012;49:151–7. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100714>.
- [5] Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim C-Y, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455–60.
- [6] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219–26. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.1825>.
- [7] André T, Gramont A de, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol* 2015;33:4176–87. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4238>.
- [8] Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I, Lecomte T, Coriat R, Aparicio T, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in colon cancer with microsatellite instability: a large multicenter AGEIO study. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv438. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv438>.
- [9] Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:863–75. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr153>.
- [10] Brueckl WM, Moesch C, Brabletz T, Koebnick C, Riedel C, Jung A, et al. Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy. *Anticancer Res* 2003;23:1773–7.
- [11] Des Guetz G, Mariani P, Cucherousset J, Benamoun M, Lagorce C, Sastre X, et al. Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27:2715–9.
- [12] Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623–32. <https://doi.org/10.1002/cncr.26086>.
- [13] Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;100:266–73. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604867>.
- [14] Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, et al. Metastatic pattern of stage IV colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability as a prognostic factor. *Anticancer Res* 2017;37:239–47.
- [15] Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014;20:5322–30. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0332>.

- [16] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>.
- [17] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017;18:1182–91. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30422-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30422-9).
- [18] Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology* 2014;147:502–26. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.001>.
- [19] Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement of the familial risk–colorectal cancer: European Society for Medical Oncology clinical practice guidelines. *J Clin Oncol* 2015;33:209–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.1322>.
- [20] French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:3408–15. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1489>.
- [21] Taieb J, Zaanani A, Le Malicot K, Julié C, Blons H, Mineur L, et al. Prognostic effect of BRAF and KRAS mutations in patients with stage III colon cancer treated with leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin with or without cetuximab: a post hoc analysis of the PETACC-8 trial. *JAMA Oncol* 2016;2:643. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5225>.
- [22] Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* 2014;25:1032–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu100>.
- [23] Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. 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* 2010;28:466–74. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.3452>.
- [24] Popovici V, Budinska E, Tejpar S, Weinrich S, Estrella H, Hodgson G, et al. Identification of a poor-prognosis BRAF-mutant–like population of patients with colon cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:1288–95. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.5814>.
- [25] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350–6. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.
- [26] Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D. Familial risk-colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol* 2013;24:vi73–80. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt209>.
- [27] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2016;34. suppl; abstr 103.

Supplementary methods

Determination of MMR and microsatellite statuses

MMR and microsatellite statuses were systematically confirmed using immunohistochemistry and polymerase chain reaction in the laboratory team unit “microsatellite instability and cancer” from Saint-Antoine Research Center (INSERM, UMR_S 938, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France).

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor specimen were stained with anti-MLH1, -PMS2, -MSH2 and -MSH6 antibodies. Protein expression was considered negative when nuclear staining was absent in tumor cells. Non-tumor tissue was used as an internal control.

Tumor DNA was extracted from paraffin sections using the DNeasy Blood and Tissue DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany). MSI status was determined using Pentaplex PCR (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27). All Pentaplex markers were analysed on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Microsatellite instability was defined by the instability of at least 2 markers.

MLH1 promoter methylation

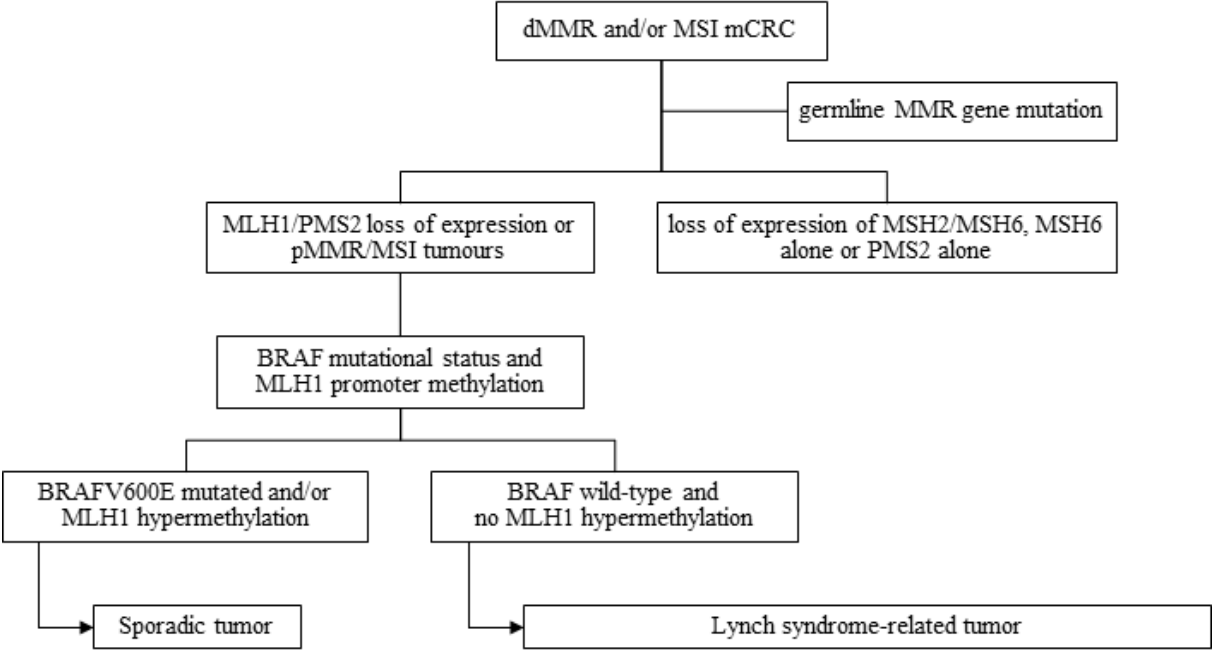
Tumor DNA was treated with bisulfite (EZ DNA methylation-Gold kit, Zymo Research, Orange, CA). Amplicons were sequenced using Genetic Analyzer 3500XL and analyzed with Genemapper software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Methylated (RKO) and unmethylated (ITS3) cell lines were used as control.

RAS and RAF mutational status

KRAS (exons 2, 3 and 4), *NRAS* (exons 2 and 3) and *BRAF* (exon 15) mutational status was determined using real-time PCR (Light Cycler 480, Roche Diagnostic) and analyzed by pyrosequencing (Pyromark Q24, Qiagen). Discrepant cases were directly sequenced (ABI

PRISM 3500L Dx Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). We did not analyze samples for *NRAS* exon 4 mutations given their very low frequency in metastatic CRC (Stintzing S, Miller-Phillips L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, et al. Impact of BRAF and RAS mutations on first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab: analysis of the FIRE-3 (AIO KRK-0306) study. *Eur J Cancer* 2017;79:50–60. doi:10.1016/j.ejca.2017.03.023).

Figure S1: Molecular definition of sporadic and inherited MMR deficiency



Supplementary results

Table S1: Discrepancies between definitions of sporadic and inherited MMR deficiency in MLH1/PMS2-negative tumors

		Molecular algorithm*		Total
		Sporadic	Lynch-like	
Combined algorithm**	Sporadic	42 (66)	9 (14)	51 (80)
	Lynch-like	5 (8)	8 (13)	13 (20)
Total		47 (73)	17 (27)	64 (100)

Values in brackets correspond to percentages relative to patients with a loss of MLH1 and/or PMS2 expression in the tumor and no known MMR gene germline mutation ($N = 64$)

* Tumors with *BRAFV600E* mutation and/or hypermethylated *MLH1* promoter were considered sporadic; *BRAF* wild-type tumors with no hypermethylation of *MLH1* promoter were suspected to be related to Lynch syndrome

** All patients were considered to have sporadic dMMR CRC, except patients with a loss of MSH2/MSH6 expression, or a loss of MLH1 without *BRAFV600E* mutation and age inferior to 60 years, or if they met the Amsterdam II criteria in the absence of MMR immunochemistry.

Table S2: Correlation matrix (Spearman correlation coefficient)

	Origin of MMR deficiency	Age at metastatic diagnosis	Resection of metastasis
Origin of MMR deficiency	1.00	0.581 P<0.0001 N = 84	0.487 P<0.0001 N = 84
Age at metastatic diagnosis	0.581 P<0.0001 N = 84	1.00	0.383 P<0.0001 N = 84
Resection of metastasis	0.487 P<0.0001 N = 84	0.383 P<0.0001 N = 84	1.00

B. Axe diagnostique

Tous les échantillons inclus dans la collection biologique de cancer colorectaux métastatiques MSI ont été analysés pour confirmer le statut dMMR et/ou MSI. Dans ce cadre, un taux inattendu de cas faussement diagnostiqués comme MSI dans les laboratoires d'origine a été retrouvé. Même si ce sont deux méthodes diagnostiques robustes, ni l'immunohistochimie ni la PCR n'ont une sensibilité et une spécificité de 100% [48, 153–155]. Par ailleurs, il n'existe pas à notre connaissance dans la littérature d'étude dédiée à l'évaluation des pratiques courantes, hors centres experts : la proportion de tumeurs mal classées (tumeurs MSI classées MSS, et inversement ; tumeurs dMMR classées pMMR, et inversement) n'est pas connue.

Compte-tenu du caractère dorénavant « théranostique » du statut MSI/dMMR, la problématique du « bon diagnostic » est majeure, ce d'autant que les ICKi peuvent être responsables d'effets secondaires sévères, voire « d'hyperprogressions tumorales » [156, 157]. Par ailleurs, dans le cadre des premiers essais cliniques de phase II publiés concernant les ICKi pour les patients avec un CCRm MSI, la proportion de cas présentant une résistance primaire aux ICKi varie de 10 à 46% [tableau 2], suggérant d'éventuelles différences non contrôlées dans l'inclusion de ces patients [12, 115–117]. Dans l'étude centralisée des échantillons tumoraux recueillis dans le cadre de l'étude CheckMate-142 (NCT02060188, nivolumab), seuls 53 cas sur 74 (72%) ont été confirmés comme MSI, avec notamment 14 cas discordants par rapport aux analyses réalisées localement [tableau 7] [158].

Dans le contexte d'essais cliniques pour lesquels la confirmation par analyse centralisée du statut MSI/dMMR n'est pas un critère d'inclusion protocolaire, nous nous sommes intéressés à évaluer le taux de diagnostics erronés au sein de la cohorte de patients inclus dans des essais d'immunothérapie à l'hôpital Saint-Antoine (service d'oncologie médicale du Pr Thierry André), avec comme dénominateur commun la résistance primaire aux ICKi, c'est-à-dire une progression tumorale dès la première évaluation radiologique (augmentation de taille > 20%, ou apparition de nouvelles lésions). Il s'agissait de patients avec un CCRm localement diagnostiqué comme MSI et/ou dMMR, qui étaient adressés par différents centres hospitaliers français pour être inclus dans des essais d'immunothérapie.

Nous avons donc intégré l'axe de travail diagnostique dans le cadre de l'exploration des mécanismes de résistance primaire des cancers MSI à l'immunothérapie. Nous montrons sur une cohorte de 38 patients adressés à l'hôpital pour inclusion dans un essai clinique d'immunothérapie, 5 cas ont présentés une progression tumorale d'emblée sous ICKi (13%) et

que, parmi ces 5 cas, 3 étaient en réalité MSS et pMMR. Le taux d'erreur diagnostique retrouvé dans cette cohorte prospective était similaire dans une cohorte rétrospective multicentrique (9 erreurs parmi 93 cas), correspondant ainsi à une valeur prédictive positive de l'analyse du statut microsatellitaire / MMR respectivement de 92.1% et 90.3%. Au total, 11 des 12 erreurs diagnostiques provenaient de l'analyse moléculaire par PCR.

Ce travail a été présenté au congrès annuel 2018 de l'ESMO (European Society of Medical Oncology) et publié *JAMA Oncology* en 2018 [159].

Tableau 7 : Discordances entre les analyses locale et centralisée du statut microsatellitaire dans l'étude CheckMate-142

Patient	Analyse locale		Analyse centralisée	Meilleure réponse tumorale (selon l'investigateur)	Meilleure réponse tumorale (BICR)
	Méthode	Résultat			
1	IHC	dMMR	MSS	PD	PD
2	IHC	dMMR	MSS	PR	PR
3	IHC	dMMR	MSS	SD	PR
4	IHC	dMMR	MSS	PD	PD
5	IHC	dMMR	MSS	PD	PD
6	IHC	dMMR	MSS	PR	SD
7	IHC	dMMR	MSS	SD	SD
8	IHC	dMMR	MSS	PD	NR
9	IHC	dMMR	MSS	SD	PD
10	IHC	dMMR	MSS	SD	PD
11	IHC/PCR	pMMR/MSI	MSS	PD	SD
12	PCR	MSI	MSS	PR	PD
13	IHC/PCR	dMMR/MSI	MSS	SD	SD
14	PCR	MSI	MSS	NE	NE

BICR : *blind independant central review* (revue centralisée indépendante en aveugle) ; NE : non évaluable ; NR : non rapporté ; SD : *stable disease* ; PD : *progression disease* ; PR : *partial response*

Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status

Romain Cohen, MD; Elisabeth Hain, MD; Olivier Buhard, MSc; Agathe Guilloux, PhD; Armelle Bardier, MD; Rachid Kaci, MD; Philippe Bertheau, MD, PhD; Florence Renaud, MD, PhD; Frédéric Bibeau, MD, PhD; Jean-François Fléjou, MD, PhD; Thierry André, MD; Magali Svrcek, MD, PhD; Alex Duval, MD, PhD

[+ Supplemental content](#)

IMPORTANCE Primary resistance to immune checkpoint inhibitors is observed in 10% to 40% of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) displaying microsatellite instability (MSI) or defective mismatch repair (dMMR).

OBJECTIVE To investigate possible mechanisms underlying primary resistance to immune checkpoint inhibitors of mCRC displaying MSI or dMMR.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This post hoc analysis of a single-center, prospective cohort included 38 patients with mCRC diagnosed as MSI or dMMR by local laboratories and entered into trials of immune checkpoint inhibitors between January 1, 2015, and December 31, 2016. The accuracy of MSI or dMMR status was also assessed in a retrospective cohort comprising 93 cases of mCRC that were diagnosed as MSI or dMMR between January 1, 1998, and December 31, 2016, in 6 French hospitals. Primary resistance of mCRC was defined as progressive disease according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors criteria, 6 to 8 weeks after initiation of immune checkpoint inhibitors, without pseudo-progression. All tumor samples were reassessed for dMMR status using immunohistochemistry with antibodies directed against MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2, and for MSI using polymerase chain reaction with pentaplex markers and with the *HSP110* T17 (HT17) repeat.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES The primary outcome was positive predictive value.

RESULTS Among the 38 patients (15 women and 23 men; mean [SD] age, 55.6 [13.7] years) in the study with mCRC displaying MSI or dMMR, primary resistance to immune checkpoint inhibitors was observed in 5 individuals (13%). Reassessment of the status of MSI or dMMR revealed that 3 (60%) of these 5 resistant tumors were microsatellite stable or displayed proficient mismatch repair. The positive predictive value of MSI or dMMR status assessed by local laboratories was therefore 92.1% (95% CI, 78.5%-98.0%). In the retrospective cohort of 93 patients (44 women and 49 men; mean [SD] age, 56.8 [18.3] years) without immune checkpoint inhibitor treatment, misdiagnosis of the MSI or dMMR status by local assessment was 10% (n = 9), with a positive predictive value of 90.3% (95% CI, 82.4%-95.0%). Testing for MSI with the HT17 assay confirmed the MSI or dMMR status in 2 of 4 cases showing discrepant results between immunohistochemistry and pentaplex polymerase chain reaction (ie, dMMR but microsatellite stable).

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Primary resistance of mCRC displaying MSI or dMMR to immune checkpoint inhibitors is due mainly to misdiagnosis of their MSI or dMMR status. Larger studies are required to confirm these findings. Microsatellite instability or dMMR status should be tested routinely using both immunohistochemistry and polymerase chain reaction methods prior to treatment with immune checkpoint inhibitors.

JAMA Oncol. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4942
Published online November 15, 2018.

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Corresponding Authors: Alex Duval, MD, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938 and Site de Recherche Intégré contre le Cancer, Cancer United Research Associating Medicine University and Society, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Sorbonne Université, 75012 Paris, France (alex.duval@inserm.fr).

Microsatellite instability (MSI) is a molecular indicator of defective DNA mismatch repair (dMMR) and is observed in approximately 5% of metastatic colorectal cancers (mCRC). Microsatellite instability is a major predictive biomarker for the efficacy of immune checkpoint inhibitors. Despite high rates of response and durable clinical benefit with immune checkpoint inhibitors, 10% to 40% of mCRC displaying MSI or dMMR exhibit primary resistance to immunotherapy.¹⁻⁴ A predictive biomarker for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in MSI or dMMR tumors has yet to be found, however.⁵ The aim of this study was to start assessing molecular mechanisms that could underlie the primary resistance of mCRC displaying MSI or dMMR to immune checkpoint inhibitors. By reevaluating the MSI and dMMR status of tumors from patients who were entered into trials of immune checkpoint inhibitors, we found that misinterpretation of results for MSI and/or mismatch repair testing may explain most cases showing primary resistance to immune checkpoint inhibitors.

Methods

Study Populations

All patients with mCRC who were determined by local assessment as having MSI or dMMR and subsequently included in clinical trials for immune checkpoint inhibitors (NCT02460198 and NCT02060188) conducted at Saint-Antoine Hospital (Paris, France) were included in the study. Tumor samples from these patients were collected prospectively. A retrospective series comprising primary or metastatic tumor tissue from patients with mCRC who were previously diagnosed with MSI or dMMR in 6 French hospitals was also analyzed to assess the accuracy of current laboratory practice for the detection of MSI and dMMR. Ethical approval was provided the Comité de Protection des Personnes Ile de France IV Institutional Review Board (IRB No. 00003835). All patients provided written consent.

Central Analysis of Tumor Tissue

Tumor samples were tested by a central, specialized reference laboratory at Saint-Antoine Hospital for dMMR using immunohistochemistry (IHC) and for MSI using polymerase chain reaction (PCR) with the pentaplex mononucleotide repeat panel (eAppendix in Supplement 1). Microsatellite instability status was also assessed using the *HSP110* (OMIM 610703) HT17 microsatellite marker (HT17 assay) previously shown to have better sensitivity and similar specificity to the pentaplex panel.⁶

End Points

Primary resistance to immune checkpoint inhibitors was defined according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 criteria⁷ as progressive radiographic disease on the first study scan (ie, 6 to 8 weeks after initiation of immune checkpoint inhibitors) with no pseudoprogression (confirmed progressive disease). False positives were defined as tumor samples initially diagnosed as MSI or dMMR by local assessment, but displaying both proficient mismatch repair (pMMR) using IHC and microsatellite stability (MSS) after re-

Key Points

Question What are the determinants of primary resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancers with microsatellite instability or mismatch repair deficiency?

Findings In this cohort study of 38 patients with metastatic colorectal cancer, misdiagnosis of microsatellite instability or mismatch repair deficiency status was responsible for 3 of 5 cases of primary resistance to immune checkpoint inhibitors. These patients had been included in trials of immune checkpoint inhibitors based on positive microsatellite instability or mismatch repair deficiency tumor status, as determined by the institutes who referred them for enrollment in the trials.

Meaning Microsatellite instability or mismatch repair deficiency status with both immunohistochemistry and polymerase chain reaction should be obtained for patients with metastatic colorectal cancer prior to treatment with immune checkpoint inhibitors.

evaluation by the specialist central review laboratory. The HT17 assay was also incorporated into the definition of MSI and dMMR on account of its better sensitivity compared with the pentaplex panel. The positive predictive value of MSI and dMMR testing by local assessment was calculated as the proportion of false-positive cases among all positive cases.

Results

Primary Resistance to Immunotherapy

Forty-seven patients with mCRC initially diagnosed as MSI and/or dMMR in originating centers were included in immunotherapy trials evaluating anti-programmed cell death 1 with or without anti-CTLA4 monoclonal antibodies between January 1, 2015, and December 31, 2016, at the Saint-Antoine Hospital. Nine patients were excluded owing to lack of suitable tumor tissue. Therefore, 38 patients with mCRC treated with immune checkpoint inhibitors who were assessed locally as having MSI and/or dMMR were included in this prospective cohort. Their histologic and molecular characteristics are shown in the eTable in Supplement 2. Primary resistance to immune checkpoint inhibitors was observed in 5 patients (13%). Of these, 3 tumors (60%) were found to display both pMMR and MSS after central review (Table, Figure 1, and Figure 2; eFigure in Supplement 1).

Misdiagnosis of MSI and dMMR in Immunotherapy Clinical Trials

The positive predictive value of local testing for MSI and dMMR in the cohort treated with immune checkpoint inhibitors was 92.1% (3 patients misdiagnosed out of 38 patients; 95% CI, 78.5%-98.0%). Of the 3 misdiagnosed cases, 1 was owing to misinterpreted IHC results and 2 because of misinterpreted pentaplex PCR results. One of the 2 false-positive cases arising from pentaplex PCR occurred in an African man harboring 3 variant alleles that fell outside the quasimonomorphic variation range; his tumor was originally tested as MSI but pMMR (sample 47; Figure 1 and Figure 2).

Table. Misdiagnosis of Microsatellite Instability and Mismatch Repair-Deficient Tumors by Local Assessment

Sample No. ^a	Local Assessment		Central Review		Best Response Under Immunotherapy
	IHC	PCR	IHC	PCR	
Patients included in immunotherapy trials (n = 38)					
47	pMMR	MSI	pMMR	MSS	Disease progression
115	NE	MSI	pMMR	MSS	Disease progression
181	dMMR	NE	pMMR	MSS	Disease progression
Retrospective historical cohort (n = 93)					
29	pMMR	MSI	pMMR	MSS	NA ^b
41	NE	MSI	pMMR	MSS	NA
42	NE	MSI	pMMR	MSS	NA
43	NE	MSI	pMMR	MSS	NA
46	NE	MSI	pMMR	MSS	NA
56	NE	MSI	pMMR	MSS	NA
64	pMMR	MSI	pMMR	MSS	NA
94	pMMR	MSI	pMMR	MSS	NA
106	NE	MSI	pMMR	MSS	NA

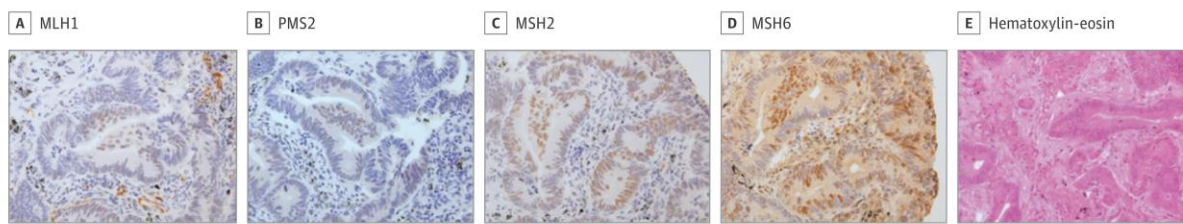
Abbreviations: dMMR, mismatch repair deficient; IHC, immunohistochemistry; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; NA, not applicable; NE, not evaluated; PCR, polymerase chain reaction; pMMR, mismatch repair proficient.

^a The 12 misdiagnosed samples originate from 6 institutions, with a maximum of 3 errors in 1 single center (2 centers with 3 errors, 2 centers with 2 errors, and 2 centers with 1 error). Fixation, type of sample, IHC technique, antibodies,

and PCR technique optimization did not differ between originating centers: all samples were formalin-fixed and paraffin-embedded, the PCR panel was the same for all centers (ie, pentaplex panel). No histopathologic or preanalytical variables (histologic type, differentiation grade, tissue origin, mucinous component, originating center) were associated with misdiagnosis.

^b Patients from the historical cohort did not receive immunotherapy.

Figure 1. False-Positive Tumor Due to Rare Microsatellite Polymorphisms: Immunohistochemistry



Immunohistochemistry of tumor sections from patient 47 using antibodies targeting MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 showing the expression of all 4 mismatch repair proteins in tumor cells (ie, mismatch repair proficiency), and hematoxylin-eosin stain of a tumor section.

Misdiagnosis of MSI and dMMR in Routine Laboratory Practice

A retrospective, multicenter cohort of 93 mCRC tumors diagnosed locally with MSI and/or dMMR between January 1, 1998, and December 31, 2016, was centrally reassessed for MSI and dMMR status. The pathologic information and molecular analyses are summarized in the eTable in Supplement 2. The positive predictive value of assessment of MSI and dMMR by local laboratories was 90.3% (95% CI, 82.4%-95.0%), with 9 of the 93 mCRC tumors showing both pMMR and MSS (Table).

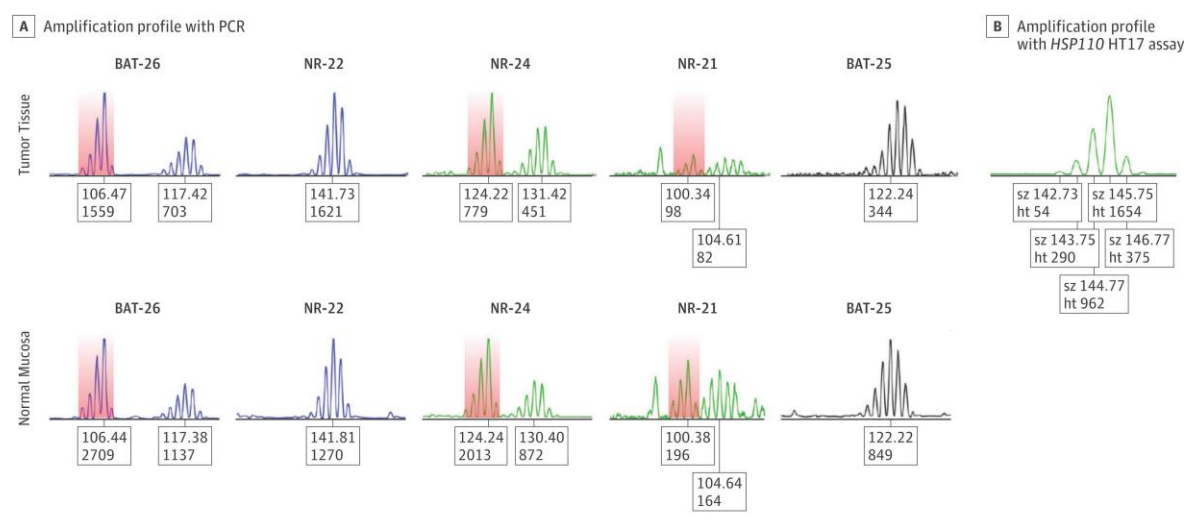
HSP110 HT17 Assay for Discrepancies Between IHC and Pentaplex PCR

Four samples exhibited an MSS phenotype pentaplex PCR but a dMMR status with IHC (immune checkpoint inhibitor-treated cohort, n = 1; retrospective cohort, n = 3). The HT17 assay confirmed the MSI phenotype for 2 cases (67%) from the

retrospective cohort. The diagnostic performances of IHC, pentaplex PCR, and the HT17 assay are described in the eTable in Supplement 1.

Discussion

Microsatellite instability and dMMR have emerged as major predictive biomarkers for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in mCRC.^{1,2,5} Several studies from expert centers, including ours, have aimed to standardize and validate the accepted reference methods for testing MSI and dMMR in colorectal cancer, mainly in patients whose disease is not metastatic.^{6,8-11} Information regarding the routine clinical use of these methods is lacking, notably in mCRC. This is despite the fact that novel immunotherapeutic strategies rely on accurate testing for MSI and/or dMMR, since these biomarkers now allow the use of immune checkpoint inhibitors in pa-

Figure 2. False-Positive Tumor Due to Rare Microsatellite Polymorphisms: Pentaplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and *HSP110* HT17 Assays

A, Amplification profile from patient 47 using pentaplex PCR showing a microsatellite stable phenotype with 3 variant alleles mimicking unstable alleles that are outside the quasimonomorphic range (BAT-26, NR-24, and NR-21) in both normal mucosa and tumor tissue. B, Amplification profile using *HSP110*

HT17 assay confirming the microsatellite stable phenotype for tumor tissue. The colored areas indicate rare polymorphisms of 3 pentaplex markers that mimicked microsatellite instability in this patient.

tients with mCRC after recent accelerated approvals by the US Food and Drug Administration.

A positive MSI or dMMR status by local assessment using only 1 diagnostic method (PCR or IHC) is currently sufficient for enrollment of patients with advanced cancer into most clinical trials of immune checkpoint inhibitors. Under these parameters, we have shown here that misdiagnosis of MSI and dMMR status may be responsible for most primary resistant cases observed in trials of immune checkpoint inhibitors trials for mCRC displaying MSI or dMMR. These results, confirmed with one of the largest retrospective collection of mCRC tumors with MSI, highlight the need for accurate diagnostic methods to assess MSI and dMMR to avoid patients being incorrectly treated with expensive and potentially harmful treatments. Similar studies in real-life routine practice should be provided for emerging diagnostic tools, such as next-generation sequencing, that are currently restricted to highly specialized laboratories but might spread throughout standard platforms in the near future. Importantly, no other predictive biomarker for response to immune checkpoint inhibitors has yet been found among patients with cancer displaying MSI, including *KRAS* (OMIM 190070), *NRAS* (OMIM 164790), or *BRAF* (OMIM 164757) mutational status; Lynch syndrome; tumor programmed death-ligand 1 expression; or tumor mutational burden.^{1,3,5}

One of the 3 patients with mCRC whose tumor was mistakenly diagnosed as MSI had been screened with both IHC and PCR, whereas the other 2 misdiagnosed patients showing primary resistance to immune checkpoint inhibitors had been

tested with only 1 method. We therefore recommend dual testing with both IHC and pentaplex PCR for all patients with mCRC before treatment with immune checkpoint inhibitors, and recommend that all samples showing discrepant results between PCR and IHC should be reassessed for MSI and dMMR status in specialized laboratories having this expertise.

Limitations

This study has some limitations. We investigated a prospective series of only 38 patients treated with immune checkpoint inhibitors for mCRC with MSI. Larger prospective studies are required to confirm our findings.

Conclusions

Misdiagnosis of MSI and dMMR status may explain most primary resistances to immunotherapy among patients with mCRC. Local assessment of MSI or dMMR status in patients with mCRC is associated with a false-positive rate of 9% in patients included in trials of immune checkpoint inhibitors in France. This error rate, which biases the results of clinical trials, should be evaluated in larger studies. We recommend dual testing using both IHC and PCR before treatment with immune checkpoint inhibitors, with referral to expert diagnostic centers in the case of discrepant results and consideration of HT17 as an additional marker because of its superior sensitivity.⁶

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: August 24, 2018.

Published Online: November 15, 2018.
doi:10.1001/jamaoncol.2018.4942

Author Affiliations: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938 and Site de Recherche

Intégré contre le Cancer, Cancer United Research Associating Medicine University and Society, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Sorbonne Université, Paris, France (Cohen, Hain, Buhard, Guilloux, Fléjou, André, Svrcek, Duval); Department of Medical Oncology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Sorbonne Université, Paris, France (Cohen, André); Department of Pathology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Université, Paris, France (Bardier); Department of Pathology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière, Paris, France (Kaci); Department of Pathology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Sorbonne Université, Paris, France (Bertheau); Université Lille, Unité Mixte de Recherche Scientifique 1172 e Jean-Pierre Aubert Research Centre e Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, France (Renaud); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche Scientifique 1172, Team "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis," Lille, France (Renaud); Centre Hospitalier Universitaire Lille, Institut de Pathologie, Lille, France (Renaud); Department of Pathology, Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France (Bibeau); Department of Pathology, Sorbonne Université, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France (Fléjou, Svrcek).

Author Contributions: Drs Cohen and Duval had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Cohen and Hain and Mr Buhard contributed equally to this work. Drs Duval and Svrcek share senior authorship of this work.

Concept and design: Cohen, Bardier, André, Svrcek, Duval.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Cohen, Hain, Buhard, Guilloux, Kaci, Bertheau, Renaud, Bibeau, Fléjou, André, Svrcek, Duval.

Drafting of the manuscript: Cohen, André, Svrcek, Duval.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All authors.

Statistical analysis: Cohen, Hain, Buhard, Guilloux, Duval.

Obtained funding: Cohen, Duval.

Administrative, technical, or material support: Cohen, Buhard, Bardier, Kaci, Renaud, Bibeau, André, Duval.

Supervision: Cohen, André, Svrcek, Duval.

Conflict of Interest Disclosures: Dr André reported receiving compensation from Bristol-Myers Squibb and Merck for consultancy. No other disclosures were reported.

Funding/Support: This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (Dr Duval) and from the ARCAD Foundation (Aide et Recherche en Cancérologie Digestive). Dr Duval's group has the label de La Ligue Contre le Cancer.

Role of the Funder/Sponsor: The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

REFERENCES

- Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182-1191. doi:10.1016/S1470-2045(17)30422-9
- Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596
- Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773-779. doi:10.1200/JCO.2017.76.9901

- Le DT, Kavan P, Won Kim T, et al. KEYNOTE-164: pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(suppl):abstract 3514.
- Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-413. doi:10.1126/science.aan6733
- Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J Med Genet*. 2016;53(6):377-384. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103518
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-268. doi:10.1093/jnci/djh034
- Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24(2):241-251. doi:10.1200/JCO.2005.02.7227
- Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part I, the utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):293-300. doi:10.2353/jmoldx.2008.080031
- Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part II, the utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):301-307. doi:10.2353/jmoldx.2008.080062

SUPPLEMENT ONLINE CONTENT

Supplementary methods

Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor specimens were stained with anti-MLH1, -PMS2, -MSH2 and -MSH6 antibodies. Protein expression was considered negative when nuclear staining was absent in the tumor cells but present in adjacent non-tumor tissue used as an internal positive control. dMMR was defined as loss of expression of MLH1 and/or PMS2, MSH2 and/or MSH6, PMS2 alone, or MSH6 alone. Proficient MMR (pMMR) was defined as unequivocal expression of all 4 MMR proteins in tumor cells.

Microsatellite instability testing

Tumor DNA was extracted from paraffin sections using the DNeasy Blood and Tissue DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany). MSI status was determined using the pentaplex mononucleotide repeat panel (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27). All pentaplex markers were analyzed for size on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). MSI was defined by alterations in the size of at least two of the five markers.

Supplementary eFigure 1: CT-scan evolution of a false-positive patient treated with immune checkpoint inhibitor (patient #181)

Tumor evolution using CT-scan at the last evaluation 9 weeks before immunotherapy initiation (A), at baseline (B) and at the first evaluation after 6 weeks (C); the patient was diagnosed with a metastatic colorectal cancer harboring mismatch repair deficiency as determined at the originating center (loss of MLH1 expression) and was included in an immunotherapy trial after a 9-week wash-out period; the CT-scan showed disease progression at the first evaluation; re-analysis of the sample in our experienced molecular diagnostic center revealed a microsatellite stable and mismatch repair-proficient tumor.



Supplementary etable 1: Detection rate and sensitivity of immunohistochemistry, pentaplex and *HSP110* T17 PCR

	Immunohistochemistry	Pentaplex PCR	<i>HSP110</i> HT17 PCR
Test results (N=119)*			
Inconclusive results (N)	0	22	2
True positives (N)	114	93	105
False negatives (N)	5	4	12
Detection rate	100%	81.5%	98.3%
(95% CI)	(97.0-1.00)	(73.4-88.0)	(94.1-99.8)
Sensitivity	95.8%	78.2%	88.2%
(95% CI)	(90.5-98.6)	(69.7-85.2)	(81.1-93.4)

*: samples misdiagnosed by originating laboratories were excluded of this analysis (N=12)

The detection rate of the diagnostic methods is defined as the probability of obtaining a conclusive result (either positive or negative) amongst all tested samples. The sensitivity is defined as the proportion of true positives amongst dMMR and/or MSI samples.

IV. Discussion et Perspectives

A. Distinction des cancers MSI héréditaires et sporadiques

1. Utilité d'un algorithme décisionnel basé sur les analyses génétiques tumorales

Distinguer les cancers MSI sporadiques des cancers MSI reliés au syndrome de Lynch à partir d'éléments de génétique tumorale est d'une grande importance. Cela permet d'une part, de poser l'indication d'une éventuelle analyse constitutionnelle et d'autre part, d'orienter le conseil oncogénétique vis-à-vis du patient et de ses apparentés lorsqu'aucune mutation constitutionnelle d'un gène MMR n'est retrouvée.

Le spectre mutationnel des gènes MMR est large, sans mutation « *hotspot* ». De multiples mutations ponctuelles ont été décrites, notamment des mutations faux-sens dont le caractère pathogène n'est pas toujours démontré (VSI : variant de signification inconnue) ; l'ensemble de ces mutations étant regroupé dans la base de données InSIGHT [1, 160]. Ainsi l'enquête oncogénétique est un travail généralement complexe et fastidieux, ne permettant pas systématiquement de répondre à la question fondamentale du caractère héréditaire du cancer. Les données moléculaires somatiques sont alors utiles pour préciser le conseil oncogénétique, en l'absence de résultat probant au niveau constitutionnel.

Par ailleurs, dans le cadre de l'immunothérapie, il paraît important d'étudier l'hypothèse d'une différence d'efficacité en fonction du mécanisme sous-jacent à la déficience du système MMR (hyperméthylation *versus* mutation constitutionnelle). Ce type d'étude translationnelle semble d'autant plus importante qu'il existe des différences significatives sur le plan génomique selon la nature du gène MMR altéré [161]. Les analyses exploratoires réalisées dans le cadre des premiers essais publiés ont été faites à partir de données parcellaires provenant des dossiers médicaux des patients [12, 117, 118].

Nous avons utilisé dans notre travail publié dans *European Journal of Cancer* un algorithme combinant la perte d'expression protéique en immunohistochimie et, pour les tumeurs MLH1-négatives, la mutation V600E de *BRAF* avec le statut de méthylation du promoteur de *MLH1* (voir section II.C.4). Cet arbre décisionnel permet, en l'absence de résultats au niveau constitutionnel, d'orienter le diagnostic et donc éventuellement le dépistage des apparentés. Nous montrons que cet algorithme est plus précis que des méthodes non systématisées clinico-moléculaires, dont l'utilisation peut fausser les résultats des analyses exploratoires

réalisées dans le cadre des premières cohortes de patients avec un CCRm MSI traité par immunothérapie.

2. Limites de la distinction sporadique / héréditaire par les analyses moléculaires somatiques

Il est important de ne pas oublier que la mise en évidence d'une mutation délétère d'un gène MMR au niveau de l'ADN germlinal reste le *gold standard* du diagnostic de syndrome de Lynch, non seulement car c'est le seul moyen de pouvoir détecter la transmission de l'allèle muté chez les apparentés, mais aussi parce que l'algorithme décisionnel proposé à partir des analyses moléculaires somatiques n'est pas absolument fiable, dans le cadre de doubles mutations somatiques ou de transmission verticale épigénétique [1].

Ainsi ont été rapportés des cas de double mutation somatique de *MLH1* (sans hyperméthylation du promoteur ni de mutation V600E de *BRAF*), voire même, au niveau de *MSH2* [162, 163]. Seule l'étude de l'ADN germlinal des patients porteurs de telles tumeurs, et éventuellement dans un second temps de l'ADN tumoral, permet de corriger le diagnostic et d'affirmer le caractère sporadique de ces cancers. D'autres situations particulières peuvent être relevées, telles que les délétions constitutionnelles de la région 3' du gène codant pour EPCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) qui s'associent au syndrome de Lynch en induisant une perte d'expression de *MSH2* par un mécanisme épigénétique [164]. De plus, certains travaux ont permis de mettre en évidence des cas de cancers héréditaires par des phénomènes de transmission épigénétique verticale, avec une éventuelle acquisition somatique de la mutation de *BRAF* [56, 57, 165, 166].

Des mécanismes de « mosaïque », germinale ou somatique, peuvent également être à l'origine de difficultés diagnostiques [162]. Dans ces situations, une mutation *de novo* apparaît lors de l'embryogénèse, à un stade relativement avancé, raison pour laquelle la mutation ne sera pas présente dans l'ensemble des tissus du patient. De ce fait, l'analyse constitutionnelle classiquement réalisée sur les lymphocytes du patient, à partir du sang périphérique, pourra être négative et seule l'analyse de la muqueuse colique saine permettra de prouver qu'il s'agit d'une mutation constitutionnelle (potentiellement transmissible si celle-ci est également présente dans les cellules germinales).

Par ailleurs les cancers avec perte d'expression de *MLH1*, sans mutation de *BRAF* ni hyperméthylation du promoteur de *MLH1*, classiquement considérés comme reliés au syndrome de Lynch, sont source d'erreur et seule l'analyse de l'ADN germlinal permet de

conclure. Dans cette situation, une mutation constitutionnelle n'est retrouvée que dans 50% des cas [53, 167]. L'origine sporadique ou héréditaire de l'autre moitié, classiquement dite « *Lynch-like* », n'est pas claire, sachant que le risque de développer un CCR dans les familles de patients porteurs de tels cancers colorectaux (perte d'expression de *MLH1*, pas de mutation de *BRAF*, pas d'hyperméthylation du promoteur de *MLH1*, pas de mutation constitutionnelle retrouvée) reste supérieur à celui des familles des patients avec un cancer sporadique [168].

B. Diagnostic du phénotype MSI

1. Fidélité du diagnostic MSI en vie réelle

Nous montrons dans l'article accepté pour publication dans *JAMA Oncology* que le diagnostic du statut microsatellitaire et MMR est erroné dans près de 10% des cas en pratique courante. Il est important de noter que la majorité des erreurs détectées dans notre travail concerne des erreurs d'interprétation de la PCR pentaplex.

Il n'y a pas à notre connaissance d'étude évaluant l'exactitude du diagnostic du phénotype MSI en conditions de vie réelle, alors même qu'il a été montré que le caractère « expert » du laboratoire influait sur le risque d'erreur diagnostique, tout du moins en ce qui concerne l'immunohistochimie [39]. Il existe en France des recommandations sur les modalités du diagnostic du statut microsatellitaire (© Tests somatiques recherchant une déficience du système MMR au sein des tumeurs du spectre du syndrome de Lynch, collection Outils pour la pratique, INCa, juin 2016) et également un engagement pour le contrôle de qualité, notamment pour l'immunohistochimie réalisée par les laboratoires d'anatomopathologie, *via* des tests d'évaluation externe de la qualité proposé par l'AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques). Nos résultats suggèrent qu'une évaluation des modalités du diagnostic moléculaire et immunohistochimique devrait être réalisée de manière systématique.

Compte-tenu des résultats observés dans notre travail, avec un taux non négligeable de tumeurs faussement diagnostiquées comme MSI (« faux positifs » liés non pas à la technique, mais à son interprétation), il semblerait intéressant d'évaluer la proportion de patients avec un CCR MSI non diagnostiqué comme tel en pratique courante (« faux négatifs »). Cette proportion est probablement relativement élevée puisque le dépistage universel du phénotype MSI n'était jusqu'à présent pas recommandé, induisant ainsi un sous-diagnostic des cas MSI, notamment des cas sporadiques qui sont généralement détectés chez les personnes âgées [167]. Par ailleurs, le choix de la technique (immunohistochimie des 4 protéines ou de *MSH6*

et PMS2 uniquement, PCR, PCR et immunohistochimie) influe potentiellement sur ce taux de faux-négatifs, qui reste extrêmement faible dans les études publiées [38, 153, 154, 169, 170]. Il faut néanmoins rappeler que sur le plan physiopathologique, certaines mutations constitutionnelles délétères des gènes MMR, de type faux-sens, ne sont pas systématiquement associées à une perte d'expression protéique [38] : dans notre cohorte, nous avons ainsi détecté deux tumeurs MSI mais sans perte de l'expression de MLH1, PMS2, MSH2 ou MSH6, chez 2 patients porteurs connus d'une mutation germinale de *MSH2* et *MSH6*.

Le choix du panel d'anticorps utilisés dans l'analyse immunohistochimique du système MMR est également une problématique source de discussions et de publications. En effet, des panels à 2 anticorps plutôt que 4 ont été proposés. Cette démarche, justifiée par les coûts des techniques, peut se justifier par le fait que la perte d'expression d'une protéine MMR induit la perte d'expression de son partenaire protéique (MSH6 pour les pertes de MSH2, PMS2 pour les pertes de MLH1, le corollaire n'étant pas systématiquement observé ; voir section II.C.1) notamment dans une démarche de réduction des coûts. Différentes études ont ainsi montré une efficacité diagnostique du panel ciblant PMS2 et MSH6 similaire à celle du panel à 4 anticorps (PMS2, MSH6, MLH1 et MSH2) [154, 170, 171]. Ces études ont néanmoins été réalisées sur des cohortes relativement réduites, et certains résultats d'études plus récentes qu'une proportion certes faible mais non moins réelle de tumeurs MSI ne seraient pas détectées avec une telle méthodologie diagnostique [172].

2. Avenirs possibles pour le diagnostic du phénotype MSI

a) *Séquençage à haut débit*

L'évaluation du statut microsatellitaire d'une tumeur requiert jusqu'à présent la réalisation d'un examen diagnostique spécifique, la PCR. L'étude de la génétique tumorale a néanmoins été transformée par le développement des techniques de séquençage à haut débit, (NGS : *Next-Generation Sequencing*). Cette technologie de pointe permet une analyse simultanée de milliers de fragments d'ADN. Ainsi peuvent être évalués les statuts mutationnels de multiples cibles choisies, au sein d'un panel de gènes prédéfinis. Il s'agit d'une transformation majeure dans l'utilisation des outils diagnostiques, puisque l'on passe ainsi du schéma classique « un examen pour un résultat » à un schéma de type « un examen pour des milliers de résultats ». Le NGS permet de se libérer également de la contrainte du nombre limité de marqueurs analysables par la technique PCR (classiquement 5), et par conséquent d'un choix se basant sur la sensibilité de chaque marqueur, sa spécificité (éventuellement dépendant du type tumoral) et également son caractère quasimonomorphique.

Différentes méthodologies ont été développées, en analysant des milliers de cibles microsatellitaires au sein de panels de centaines de gènes, sans avoir nécessairement à comparer le profil moléculaire tumoral à celui du tissu sain associé [68, 69, 173–177]. La FDA a ainsi approuvé la technologie FoundationOne CDx (F1CDx) pour l'analyse de multiples mutations génétiques et, surtout, des deux signatures génomiques que sont la charge mutationnelle et l'instabilité microsatellitaire [178]. Il paraît donc envisageable que la PCR soient délaissée au profit du NGS, de même que l'IHC puisque certains travaux montrent que le séquençage tumoral permet d'orienter le diagnostic vers le gène MMR incriminé dans le phénotype MSI [179]. Cette méthodologie, qui permet par ailleurs de détecter relativement facilement les tumeurs MSI avec double mutation somatique, présente néanmoins certaines limites, que ce soit sur le délai d'obtention des résultats (environ 2 semaines, contre 48h pour l'immunohistochimie) ou la nécessité d'avoir à disposition du tissu tumoral en qualité et quantité suffisantes. Par ailleurs, ces technologies onéreuses sont peu démocratisées et restent réservées aux laboratoires de pointe et requièrent des études de validation méthodologiques rigoureuses, conformément aux recommandations internationales STARD (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies*) [180].

b) Biopsies liquides

La dégradation des cellules, saines ou tumorales, dans l'organisme est associée à la libération de brins d'ADN pouvant circuler dans le sang. Le principe de la biopsie liquide en oncologie est la détection dans un prélèvement sanguin de l'ADN provenant des cellules cancéreuses (*ctDNA : circulating tumor DNA*). C'est un outil potentiellement extrêmement utile, lorsque le tissu tumoral est difficilement accessible (lésion osseuse, lésion pulmonaire). Ainsi, il est d'ores et déjà possible de rechercher en pratique courante, par des prélèvements sanguins, des mutations activatrices de l'*EGFR*, et des mutations de résistance aux traitements anti-EGFR, dans le cadre du cancer du poumon métastatique [181], ou les mutations de *RAS* dans le CCR (mutations de résistance aux agents ciblant l'EGFR) [182], avec une précision similaire à celle des analyses réalisées directement sur le tissu tumoral. La réalisation d'un prélèvement sanguin étant extrêmement simple, le ctDNA pourrait aussi être étudié de manière longitudinale chez les patients cancéreux, pour assurer un monitoring des traitements [183].

L'analyse du statut microsatellitaire tumoral par ctDNA semble être une voie de recherche prometteuse. Différentes méthodologies semblent envisageables pour le diagnostic MSI par biopsie liquide : (i) l'utilisation d'outils basés sur la PCR, dont l'un des inconvénients serait le

caractère restreint du nombre de marqueurs analysables (comme pour la PCR pentaplex sur le tissu tumoral), marqueurs dont la sensibilité et la spécificité pourrait varier d'un type tumoral à l'autre ; (ii) des méthodologies construites autour des approches de NGS, dont la difficulté principale serait d'allier séquençage en profondeur et gestion du bruit de fond [184]. Il serait également possible d'analyser par biopsie liquide la charge mutationnelle tumorale, qui est hautement corrélée au phénotype MSI dans le CCR [68, 69, 185]. Néanmoins, le phénotype MSI n'étant pas uniquement un outil théranostique, mais également un outil de screening du syndrome de Lynch, il ne paraît pas pertinent de restreindre l'analyse du statut tumoral MSI dans le sang à la seule charge mutationnelle.

C. Investigations en perspective

Les travaux que nous avons réalisés ont mis en lumière différentes problématiques qu'il conviendra d'explorer dans le prolongement de ce doctorat.

1. Cancer colorectal MSI : algorithme diagnostique entre PCR et IHC

Comme nous l'avons discuté dans la section IV.B.1, le choix de l'outil diagnostique utilisé en pratique courante est d'une importance majeure pour la bonne détection des patients avec un cancer MSI. Dans ce cadre, il est important de rappeler que l'autorisation d'utilisation des ICKi (pembrolizumab, nivolumab +/- ipilimumab) par la FDA aux Etats-Unis pour les patients avec un cancer MSI ne précise pas quelle méthode diagnostique doit être utilisée. Ainsi, les pratiques peuvent varier entre les centres, allant de la seule immunohistochimie avec un panel de 2 anticorps, à la PCR pentaplex seule, voire au screening double « complet » par immunohistochimie à 4 anticorps et PCR pentaplex.

A l'hôpital Saint-Antoine, l'approche adoptée jusqu'à très récemment consistait en un screening double par PCR pentaplex et immunohistochimie utilisant les anticorps anti-MLH1 et anti-PMS2 (du fait des difficultés techniques associées aux anticorps anti-PMS2 commercialisés jusqu'alors). Les résultats obtenus par cette approche sur l'ensemble des cancers colorectaux dépistés de manière systématique depuis 10 ans dans notre centre ont été colligés et le niveau de concordance entre les 2 techniques a été évalué. Un manuscrit est en cours de rédaction.

2. Cancer colorectal MSI : stade métastatique versus stades localisés

Les conséquences cliniques du phénotype tumoral MSI varient en fonction du stade la maladie cancéreuse, l'impact pronostique du statut MSI en étant l'illustration la plus nette (passant de positif pour les CCR de stade II à péjoratif pour les CCR métastatique). L'un des

axes d'étude que nous mènerons consistera en la comparaison des cancers colorectaux MSI localisés et métastatiques.

Différents paramètres devront être analysés : (i) les biomarqueurs pronostiques classiques (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*), (ii) les biomarqueurs d'intérêt dans le cadre d'un cancer MSI (gènes cibles du phénotype MSI, dont *HSP110*), (iii) mais également des paramètres cliniques et démographiques tels que la latéralité de la tumeur primitive, le sexe *etc.* (ce d'autant qu'un ratio H/F inattendu de 3 hommes pour 1 femme était retrouvé dans notre cohorte parmi les patients avec un CCR relié au syndrome de Lynch).

3. Cancer colorectal métastatique MSI : générer de nouvelles hypothèses

Nous avons montré que l'émergence de l'immunothérapie constitue une révolution thérapeutique qui est source de nombreuses questions, tant cliniques que biologiques. Un premier travail consistera à rechercher des marqueurs prédictifs de l'efficacité (ou plutôt de l'inefficacité) de l'immunothérapie, marqueurs tant génétiques que cliniques ou du microbiote intestinal [186, 187].

Sur le plan clinique, différents paramètres devront être analysés : origine sporadique ou héréditaire de la déficience MMR, usage d'antibiotiques à l'initiation du traitement, taux de lymphocytes, ratio de polynucléaires neutrophiles / lymphocytes (dNLR : derived neutrophil to lymphocyte ratio) *etc.* [188, 189].

Concernant le microbiote intestinal, des prélèvements de selles ont été obtenus dans le cadre d'une étude ancillaire de l'essai NIPICOL (NCT03350126) évaluant la réponse radiologique à 4 mois des patients avec un CCRm MSI traité par nivolumab et ipilimumab ; cette étude sera réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr SOKOL (Sorbonne Université, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules, 27 rue de Chaligny, Paris, France).

Sur le plan génétique, les échantillons de CCRm MSI de notre collection biologique seront analysés à grande échelle (exome, RNA-seq). Nous mettrons à profit la présence d'une quarantaine de couples « tumeur primitive / métastase » pour évaluer le niveau d'hétérogénéité tumorale dans les cancers MSI métastatiques. Ces analyses permettront également de générer des hypothèses en termes de profil immunitaire, d'expression différenciée et évolutive des ICKs (hétérogénéité spatiale et temporelle), qui pourront être explorées dans le cadre d'une cohorte prospective de patients traités par immunothérapie (étude NIPICOL).

V. Conclusion

La déficience du système MMR et le phénotype tumoral MSI sont des biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des immunothérapies de nouvelle génération indépendants de la localisation tumorale. Comptant pour seulement 5% de l'ensemble des cas métastatiques, les CCRm MSI avaient été peu étudiés avant l'avènement des ICKi. Notre travail a permis d'évaluer sur une collection tumorale relativement large les conséquences cliniques et phénotypiques du phénotype MSI dans cette situation carcinologique. La mise en évidence des limites de la dichotomisation des tumeurs MSI en cas sporadiques ou héréditaires, ainsi que les réserves concernant le diagnostic du phénotype MSI en pratique courante sont autant d'obstacles et limites qui seront à dépasser pour le bon développement de l'immunothérapie et une prise en charge optimale des patients.

Les différents éléments apportés dans la discussion doivent néanmoins nuancer les résultats que nous avons obtenus. Nos travaux présentent certaines limites méthodologiques qui imposent une validation de nos résultats sur des cohortes de plus grande échelle, mais également des investigations plus poussées sur le plan moléculaire. L'effort de recherche paraît indispensable dans le contexte tout particulier de la révolution thérapeutique que représente l'immunothérapie des cancers MSI.

VI. Annexes

1. La balance entre infiltrat inflammatoire cytotoxique et expression des points de contrôle immunitaire

La collection clinico-biologique de CCR métastatiques MSI mise en place pour cette thèse a permis de compléter un travail concernant l'expression des ICKs dans les CCR, sur le plan pronostique et fonctionnel.

Le profil immunitaire des cancers colorectaux a fait l'objet de différentes études, qui ont notamment permis le développement d'un indice dit Immunoscore®. Il s'agit d'un index évaluant l'infiltrat inflammatoire du stroma tumoral à partir de la densité en lymphocytes T cytotoxiques (CD3+ et CD8+) dans la tumeur et au niveau de la marge d'invasion. L'Immunoscore® a montré son rôle pronostique majeur dans les cancers colorectaux localisés, associé au temps sans récurrence de manière indépendante du stade T, du stade N et également du statut microsatellitaire [190–193]. Néanmoins l'expression des ICKs n'avait pas été prise en compte dans ces analyses.

Le travail effectué par notre équipe, en collaboration avec d'autres équipes de recherche françaises s'est développé au travers de trois axes principaux : (i) l'évaluation de l'impact pronostique de l'expression des ICKs, en tenant compte des paramètres pronostiques que sont l'infiltrat inflammatoire cytotoxique des tumeurs (lymphocytes T cytotoxiques et cellules Th1), la classification moléculaire CMS, et le statut MSI ; (ii) l'analyse de la distribution de l'expression des ICKs dans le CCR (selon le stade tumoral ou la classe moléculaire CMS) ; (iii) les conséquences fonctionnelles de l'expression des ICKs dans le CCR.

Sur le plan pronostique, cette étude montre que l'expression des ICKs est associée avec un mauvais pronostic dans les CCR MSI localisés, mais n'a pas de valeur pronostique dans les CCR localisés MSS. L'Immunoscore®, évalué au travers de différents « métagènes », avait une valeur pronostique dans les CCR MSS avec une faible expression des ICKs (CMS2 et 3), et n'avait à l'inverse pas d'impact dans les tumeurs présentant de hauts niveaux d'infiltration en cellules T cytotoxiques et d'expression de ICKs (CMS 1 et 4). Les analyses bivariées ont permis de montrer que la surexpression des ICKs contrebalance et annule l'impact pronostique positif de l'Immunoscore®, dans les tumeurs MSI. Sur le plan fonctionnel, nous montrons dans cette étude une forte association entre l'expression des ICKs et l'infiltration tumorale par des cellules lymphoïdes et myéloïdes, et surtout avec un « épuisement » de la

réponse immunitaire T. Ainsi, l'expression des ICKs semble constituer pour les tumeurs MSI un meilleur outil pronostique que le profil immunitaire CD3/CD8.

Concernant les CCR métastatiques MSI, l'étude de notre série de cas a montré que l'expression de différents ICKs (PD-L1, TIM-3, LAG-3) était associée à un pronostic défavorable. Par ailleurs, l'expression de ces ICKs était particulièrement hétérogène, dans les CCR localisés comme métastatique, sans corrélation avec le stade TNM, la classe moléculaire CMS, l'origine sporadique ou héréditaire de la déficience MMR *etc.*

Ce travail a été publié dans *Journal of National Cancer Institute* [82] : Marisa L, Svrcek M, Collura A, et al (2018) The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. JNCI J Natl Cancer Inst. doi: 10.1093/jnci/djx136

ARTICLE

The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors

Laetitia Marisa, Magali Svrcek, Ada Collura, Etienne Becht, Pascale Cervera, Kristell Wanherdrick, Olivier Buhard, Anastasia Goloudina, Vincent Jonchère, Janick Selves, Gerard Milano, Dominique Guenot, Romain Cohen, Chrystelle Colas, Pierre Laurent-Puig, Sylviane Olschwang, Jérémie H. Lefèvre, Yann Parc, François Ghiringhelli, Aurélien de Reynies, Alex Duval

Affiliations of authors: Programme "Cartes d'Identité des Tumeurs," Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France (LM, EB, AdR); INSERM, UMRS 938 - Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers," Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France (MS, AC, PC, KW, OB, AG, VJ, RC, CC, JHL, YP, AD); Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Paris, France (MS, AC, PC, KW, OB, AG, VJ, RC, CC, JHL, YP, AD); AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France (MS, PC); Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR 1037 INSERM - Université Toulouse III, Department of Pathology, CHU, Toulouse, France (JS); Laboratoire d'Oncopharmacologie, EA 3836, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France (GM); INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France (DG); AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Oncologie Médicale, Paris, France (RC); AP-HP, Laboratoire d'oncogénétique et d'Angiogénétique, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France (CC); INSERM, Unité Mixte de Recherche, Paris Sorbonne Cité, Université Paris Descartes, Paris, France (PLP); Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France and RGDS, HP Clairval, Marseille, France (SO); AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France (JHL, YP); Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France (FG); INSERM, UMR866, Burgundy University (FG); Platform of transfer in oncology, Burgundy University, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France (FG)

See the Notes section for the full list of authors and affiliations.

Correspondence to: Alex Duval, MD, PhD, INSERM, UMRS 938 - Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe "Instabilité des Microsatellites et Cancers," Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France (e-mail: alex.duval@inserm.fr).

Abstract

Background: Immune checkpoint (ICK) expression might represent a surrogate measure of tumor-infiltrating T cell (CTL) exhaustion and therefore be a more accurate prognostic biomarker for colorectal cancer (CRC) patients than CTL enumeration as measured by the Immunoscore.

Methods: The expression of ICKs, Th1, CTLs, cytotoxicity-related genes, and metagenes, including Immunoscore-like metagenes, were evaluated in three independent cohorts of CRC samples (260 microsatellite instable [MSI], 971 non-MSI). Their associations with patient survival were analyzed by Cox models, taking into account the microsatellite instability (MSI) status and affiliation with various Consensus Molecular Subgroups (CMS). PD-L1 and CD8 expression were examined on a subset of tumors with immunohistochemistry. All statistical tests were two-sided.

Results: The expression of Immunoscore-like metagenes was statistically significantly associated with improved outcome in non-MSI tumors displaying low levels of both CTLs and immune checkpoints (ICKs; CMS2 and CMS3; hazard ratio [HR] = 0.63, 95% confidence interval [CI] = 0.43 to 0.92, $P = .02$; and HR = 0.55, 95% CI = 0.34 to 0.90, $P = .02$, respectively), but clearly had no prognostic relevance in CRCs displaying higher levels of CTLs and ICKs (CMS1 and CMS4; HR = 0.46, 95% CI = 0.10 to 2.10, $P = .32$; and HR = 1.13, 95% CI = 0.79 to 1.63, $P = .50$, respectively), including MSI tumors. ICK metagene expression was statistically significantly associated with worse prognosis independent of tumor staging in MSI tumors (HR = 3.46, 95%

Received: December 16, 2016; Revised: April 18, 2017; Accepted: June 5, 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

CI = 1.41 to 8.49, $P = .007$). ICK expression had a negative impact on the proliferation of infiltrating CD8 T cells in MSI neoplasms (median = 0.56 in ICK low vs median = 0.34 in ICK high, $P = .004$).

Conclusions: ICK expression cancels the prognostic relevance of CTLs in highly immunogenic colon tumors and predicts a poor outcome in MSI CRC patients.

The host immune response, and especially the T cell immune infiltrate, intersects the molecular and clinical characteristics of primary colorectal cancers (CRCs), including TNM staging. It is associated with prognosis of localized colon tumors. Expression levels for CTL/Th1/cytotoxicity markers have been demonstrated to constitute strong and independent prognostic indicators in CRC patients, with a high density of lymphocyte infiltration being consistently associated with prolonged survival (1). Based on multiple analyses, a scoring system was developed (termed Immunoscore) to quantify cytotoxic and memory T cells in the core of the tumor and in the tumor's invasive margin (2). Immunoscore is a prognostic index in CRC (3). Several authors have suggested that the dense Th1/CTL lymphocytic infiltrate could explain the better prognosis of colon tumors displaying microsatellite instability (MSI), compared with non-MSI (MSS) CRC (4–6). MSI (7–12) leads to the synthesis of aberrant and potentially immunogenic neo-antigens by the tumor cells (for review, see [13,14]). A likely consequence of this is that MSI tumors are heavily infiltrated with activated cytotoxic T-cell lymphocytes (CTLs) and Th1 cells.

A recent study reported that concomitant expression of multiple active immune checkpoint (ICK) markers (eg, CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3 targeted by immunotherapy) in CRC may counterbalance the antitumoral Th1/CTL immune response, notably in MSI CRC (15). One hypothesis that stems from these observations is that MSI tumors would be more responsive to ICK inhibitors because ICK expression is expected to protect highly immunogenic tumor cells from being destroyed. In line with this hypothesis, Le et al. (16) evaluated the clinical activity of an anti-PD-1 ICK inhibitor (pembrolizumab) in a cohort of metastatic CRC patients with MSS and MSI primary tumors. The results of this phase II study showed that MSI status was predictive of clinical benefit from ICK blockade therapy with pembrolizumab. The second hypothesis is that ICK expression should exert a negative impact on the prognosis of MSI tumors untreated by ICK inhibitors. To our knowledge, this second hypothesis has not yet been assessed thoroughly. It was reported in a recent study that the Immunoscore was prognostic in MSI CRC (17), but the authors did not integrate ICK markers in their survival analyses. Their results were obtained by investigating a unique series of CRC, and no further validation using publicly available clinical data was performed because the Immunoscore requires direct access to primary tumor samples. In other publications, only the role of PD1/PDL1 expression in CRC has been explored, leading to various conclusions and thus demonstrating the complexity involved with analysis of the CRC immune response (18–21).

Rather than analyzing CRC immune response through the expression of PD1/PDL1 or T cell enumeration, our aim here was for a more holistic assessment of T cell immune response quality based on the analysis of both Th1/CTL and ICK markers. We also took into account the major molecular subtypes of CRC, that is, MSI/MSS status and consensus molecular subtypes (CMS) (22). Finally, the functional relevance of ICK overexpression was determined by pathway enrichment analysis and by quantification of immune infiltrates and CD8 T cell proliferation in MSI tumors.

Methods

Immune Genes

Immune checkpoint and modulator genes were selected according to Llosa et al. (15) and a recent review (23). Markers for cytotoxic T lymphocytes, cytotoxicity, and T helper1 were selected as described earlier (see also the Supplementary Materials and Methods, available online) (15,24).

Cohort Data

Tissue samples from a large multisite cohort of CRC patients were collected as part of the “Cartes d'Identité des Tumeurs” (CIT) research program/enlever network, including tumors with or without microsatellite instability (MSI or MSS, respectively) and adjacent nontumoral tissue samples (NT). Samples from 146 MSI tumors, 444 MSS tumors, and 56 NT were analyzed for gene expression profiles on Affymetrix U133 plus 2 chips as described earlier (25). Data were normalized using the frozen RMA method (26) followed by Combat normalization (27) to remove technical batch effects (SVA R package). In addition, the CRC cohort from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium was also used (86 MSI tumors, 527 MSS tumors, 51 NT). Both data sets were centered for each gene by subtracting the median value of the non-tumoral sample and are provided as a Supplementary Data File (available online).

An additional retrospective, multisite series of 28 stage IV primary MSI CRCs was analyzed separately for gene expression as part of an independent, ongoing study using the NanoString nCounter platform. A set of immune genes that comprised 14 of the 32 analyzed markers, including seven ICKs, was screened. All patients from this metastatic cohort (11 synchronous metastatic lesions, 17 metachronous metastatic lesions) received standard of care chemotherapy but not ICK blockade treatment. The NanoString data set also includes a subset of the CIT cohort samples for which sufficient RNA material was available for analysis (for protocol details, see the Supplementary Materials and Methods, available online).

Supplementary Table 1 (available online) gives a description of all the cohorts investigated in this study, totaling 260 MSIs and 971 MSS CRCs. For non-metastatic MSI CRC patients, informed consent was recorded in each case; the standard hospital blanket consent was considered sufficient by French law. For patients included in the cohort of metastatic CRCs, ethical approval was provided by an institutional review board (institutional review board No. 00003835) on November 27, 2014.

Statistical Analysis

Metagene values were computed to summarize an immune gene category as the median value per sample of all the genes in the category. Comparisons of the mean expression between gene or metagene values across groups were assessed using the Student's t-test or the analysis of variance test, as appropriate. Correlations were assessed by Pearson correlation coefficients. Associations between categorical variables were assessed using

chi-square tests. MSigDB gene sets/pathways enrichment analysis was performed by comparing low- and high-ICK groups, using the hypergeometric test and based on the genes most statistically significantly differentially expressed between these two groups. Associations between gene/metagene expression values and survival in the different cohorts were assessed by univariate and bivariate Cox proportional-hazards regression analyses and adjusted by tumor series and TNM stage, using the R package “survival,” and the results were combined using a generic inverse variance meta-analysis approach (see also the Supplementary Materials and Methods, available online). The proportional-hazards assumption was tested prior to survival analysis to examine the models’ appropriateness using the `cox.zph` function. Survival curves were obtained using Kaplan-Meier estimates, and differences between curves were assessed using the log-rank test. Overall survival was used and defined as time from diagnosis to death from any cause. All statistical tests were two-sided. The cut point for statistical significance was .05.

Results

Prognostic Value of Immune Genes and Metagenes in Function of CMS Classification of Colorectal Cancer

To test our working hypothesis, summarized in Figure 1A, we evaluated the prognostic significance of ICKs, Th1, CTLs, and cytotoxicity markers in the combined CIT (n = 590 CRC, comprising 146 MSI and 444 MSS) and TCGA (n = 613 CRC, comprising 86 MSI and 527 MSS) series. In both cohorts, MSS tumors were categorized into one of the four CMS subtypes of CRC (22). We investigated 32 immune markers classified into the above four immune marker groups (see the Supplementary Materials and Methods, available online, for a list of these markers) (for review, see [24]) as independent genes and as four metagenes. Four of the 19 immune checkpoints and modulators were not statistically significantly overexpressed in CRC as compared with nontumor colonic mucosa and were subsequently removed (Supplementary Figure 1, available online). Further analyses were thus carried out on the 28 remaining genes. Finally, to obtain Immunoscore surrogates, six Immunoscore-like metagenes were built based on the expression of Immunoscore-related markers (Supplementary Table 2, available online).

As a preliminary step, the prognostic values of MSI and CMS status were confirmed with, as expected, an improved prognosis for patients with MSI CRCs, compared with those with MSS CRCs, and a statistically significant prognostic value of the CMS classification (Figure 1B; Supplementary Figure 2, available online). The prognostic values of the 28 immune markers mentioned and the four metagenes were then analyzed by univariate Cox models. Most ICK genes were individually associated with poorer prognosis in MSI CRC, as reflected by the ICK metagene (HR = 3.46, 95% CI = 1.41 to 8.49, $P = .007$) (Figure 1, C–E; Supplementary Figure 3A, available online). This association remained statistically significant in non-metastatic MSI CRC (Supplementary Figure 3B, available online). No prognostic association was observed in patients with MSS CRCs, either for individual ICK markers or for the ICK metagene (Figure 1, D and E; Supplementary Figure 3C, available online). Subdividing MSS CRCs by CMS did not change this result, except in CMS3, where the ICK metagene was associated with better prognosis (HR = 0.46, 95% CI = 0.21 to 1.00, $P = .05$) (Figure 1E; Supplementary Table 2, available online). As expected, the

expression of most Immunoscore-like metagenes was associated with improved outcome of CRC patients (Figure 1E; Supplementary Table 2, available online). However, when CMS and MSI/MSS status were taken into account, expression of these Immunoscore surrogates was predictive of better prognosis only in MSS tumors from CMS2 and CMS3 (HR = 0.63, 95% CI = 0.43 to 0.92, $P = .02$; and HR = 0.55, 95% CI = 0.34 to 0.90, $P = .02$, respectively). In contrast, they had no prognostic relevance in CRC from CMS1 and CMS4 (HR = 0.46, 95% CI = 0.10 to 2.10, $P = .32$; and HR = 1.13, 95% CI = 0.79 to 1.63, $P = .50$, respectively) (Figure 1E; Supplementary Table 2, available online).

In univariate models, the overexpression of CTL/Th1/cytotoxicity/Immunoscore markers and metagenes was also associated with adverse prognosis in MSI CRC (Figure 1, C and E; Supplementary Figure 3, A and B, available online). We therefore hypothesized that high expression levels of ICKs in MSI CRC could counterbalance and mask the expected positive effect of CTL/Th1/cytotoxic cells or Immunoscore-related cells on prognosis. Bivariate Cox models at the metagene level were consistent with this assumption (Figure 1F). All together, these data underline that ICKs and Immunoscore biomarkers constitute an independent prognostic factor for overall survival in MSI and MSS tumors, respectively.

Expression and Prognostic Value of Immune Checkpoints in an Independent Metastatic MSI CRC Patient Series

The CIT and TCGA series included mostly non-metastatic MSI CRC patients (n = 220/232, 94.8%). Because ICK blockade was recently proposed as a promising new therapy for metastatic MSI CRC, we endeavored to further evaluate the prognostic relevance of ICK expression in an additional retrospective, multisite series of 28 stage IV primary MSI CRCs treated with standard care that were analyzed separately for gene expression as part of an independent, ongoing study using the NanoString nCounter platform. To do this, we analyzed the expression of the seven ICKs that were previously screened (CD274, PDCD1LG2, HAVCR2, LAG3, ICOS, CTLA4, PDCD1).

As with non-metastatic MSI colon tumors, we observed statistically significant association of PD-L1 (CD274) expression with worse OS and worse survival after relapse (SAR) (Figure 2A). Associations of TIM-3 (HAVCR2) and LAG3 expression, although not statistically significant, were suggested. Again, the overexpression of metagenes corresponding to CTL/Th1/cytotoxicity/Immunoscore markers (CTL = CD3D, CD3G, CD8A, PTPRC; CYTOX = GNLY, GZMK; Th1 = IFNG) tended to associate with adverse prognosis in univariate models (Figure 2B). However, in bivariate Cox models, the expression of CTL/Th1/cytotoxicity/Immunoscore-related metagenes was associated with good prognosis (hazard ratio [HR] < 1.00), as expected (Figure 2C). Several ICK markers, in particular the druggable PD-L1 (CD274) and TIM-3 (HAVCR2) molecules (23), are therefore likely to constitute biomarkers for poor prognosis in both metastatic and non-metastatic MSI CRC patients.

Immune Checkpoint Gene Expression Distribution in Colorectal Cancer

We next investigated the level of variation in ICK expression among CRC tumors in order to further assess their relevance as prognostic and theranostic markers. ICK expression was analyzed in stage I through IV CRC and in nontumor colonic

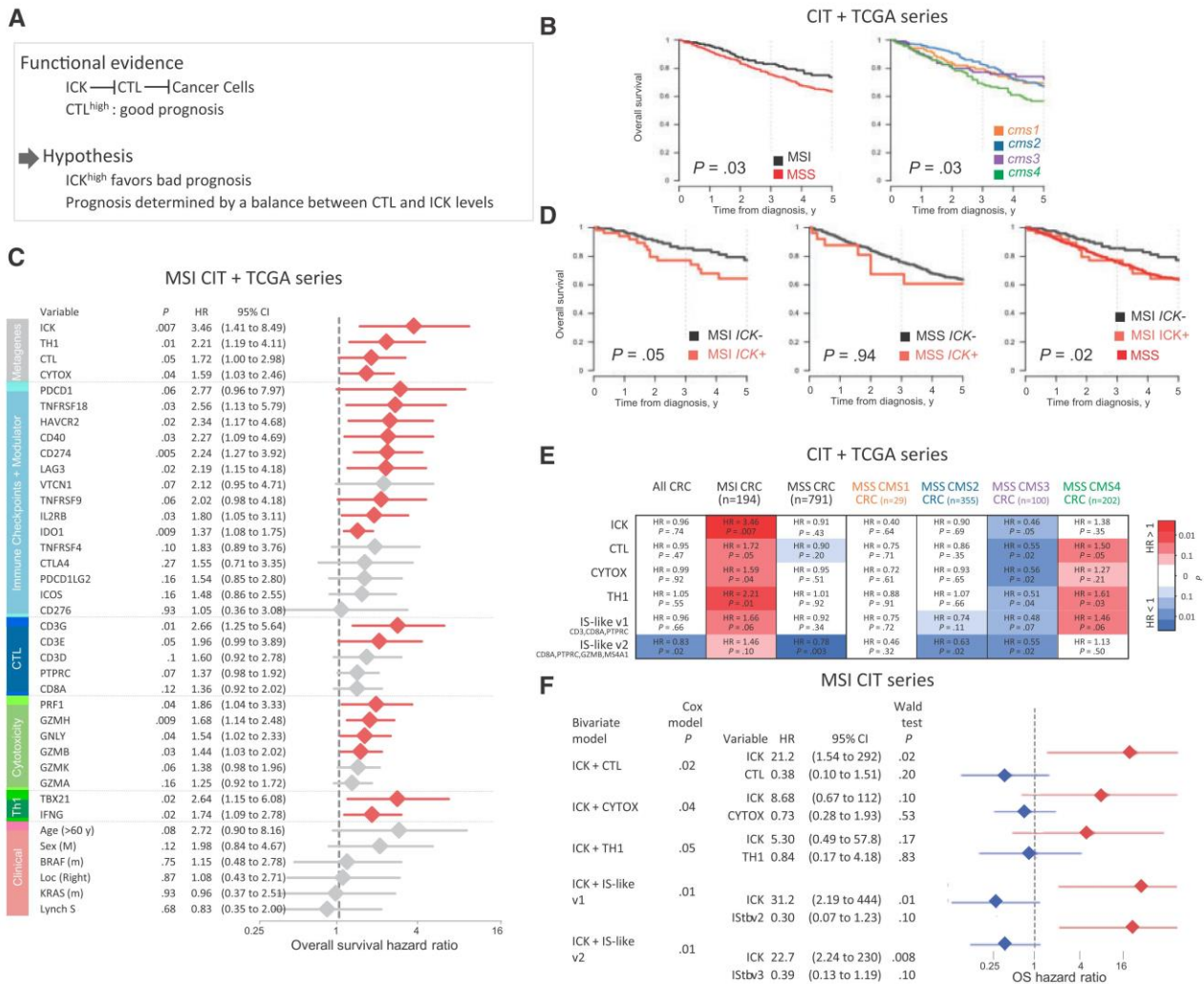


Figure 1. Prognostic value of immune gene expression. **A**) Schematic representation of the working hypothesis on immune checkpoint prognosis. **Arrows** represent inhibition. **B**) Overall survival stratified by microsatellite instable (MSI)/microsatellite stable (MSS) status and Consensus Molecular Subgroups (CMS) subtypes (right). Curves of overall survival (OS) rate (y-axis) according to time from diagnosis (in years; x-axis) were obtained by the method of Kaplan-Meier for both the Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) series. Differences between survival distributions were assessed by the log-rank test using an end point of five years. **C**) Prognostic values of immune gene/metagene expression and of clinical factors in MSI tumors. Forest plot of overall survival (OS) hazard ratios (HRs) estimated by combining independent univariate Cox analyses on the CIT and TCGA series, adjusted for TNM stage. Hazard ratio, as well as related Wald test P value and 95% confidence intervals (CIs), are given for metagenes (which aggregate the gene expression values of a gene set related to the four immune categories [immune checkpoints (ICK), cytotoxic T lymphocytes (CTL), cytotoxicity, Th1 functional orientation]), individual immune genes, and clinical annotations. **Diamonds** represent the hazard ratios, and **horizontal bars** represent the 95% confidence intervals. **Red** indicates a hazard ratio greater than 1 with a P value of less than .1 (worse prognosis), **blue** a hazard ratio of less than 1 with a P value of less than .1 (better prognosis), and **gray** a hazard ratio with a Wald test P value of .1 or less. **D**) Overall survival stratified by overexpression of immune checkpoint genes within MSI (left), MSS (middle), and both CRCs (right). MSI tumors in the higher quartile of ICK metagene values, in CIT and TCGA series independently, were assigned ICK+ (n = 55), and the other tumors ICK- (n = 139). The minimal ICK metagene value within MSI ICK+ tumors was used to divide MSS tumors into ICK+ (n = 26) and ICK- (n = 765). Curves of overall survival rate (y-axis) according to time from diagnosis (in years; x-axis) were obtained by the method of Kaplan and Meier for both the CIT and TCGA series. Differences between survival distributions were assessed by the log-rank test using an end point of five years. **E**) Prognostic value of immune metagenes according to the type of CRC. Each column defines a specific type of CRC (all CRC, MSI CRC, MSS CRC, MSS CMS1 CRC, MSS CMS2 CRC, MSS CMS3 CRC, MSS CMS4 CRC) and the number of related samples with available survival data in the combined CIT + TCGA series. Each row defines a given metagene (ICK, CTL, CYTOX, TH1, IS-like v1, IS-like v2). Each cell shows the hazard ratio for overall survival of the relevant metagene expression for the specific CRC type (obtained via a Cox model). Each cell also contains the P value for the Wald test for equality of this hazard ratio to 1. The hazard ratio shown in each cell was calculated by combining the hazard ratios for each of the CIT and TCGA data sets using the meta-analysis approach of DerSimonian. The genes relevant to each metagene are indicated in **(C)** (ICK, CTL, CYTOX, TH1, IS-like v1, IS-like v2) or are given below the metagene name. **F**) Bivariate Cox models of OS, combining the ICK metagene with other metagenes, in MSI tumors. Forest plot of OS hazard ratio estimated by bivariate Cox analysis of ICK, CTL, CYTOX, Th1, and Immunoscore-like metagene expression in the CIT series, adjusted by TNM stage. All statistical tests were two-sided. CIT = Cartes d'Identité des Tumeurs; CRC = colorectal cancer; CMS = Consensus Molecular Subgroups; CTL = cytotoxic T lymphocytes; high = high expression level; ICK = immune checkpoint genes; MSI = microsatellite instable; MSS = microsatellite stable; OS = overall survival; TCGA = The Cancer Genome Atlas.

mucosa from our CIT cohort (590 CRC, 56 NT) and in the TCGA cohort (613 CRC, 51 NT). In both cohorts, the metagenes corresponding to ICKs, CTL, cytotoxicity, and Th1 orientation were

overexpressed in MSI and in MSS tumors belonging to CMS1 and CMS4, as compared with MSS CRCs from CMS2 and CMS3 (Figure 3A). Variable expression of ICKs relative to NT was noted

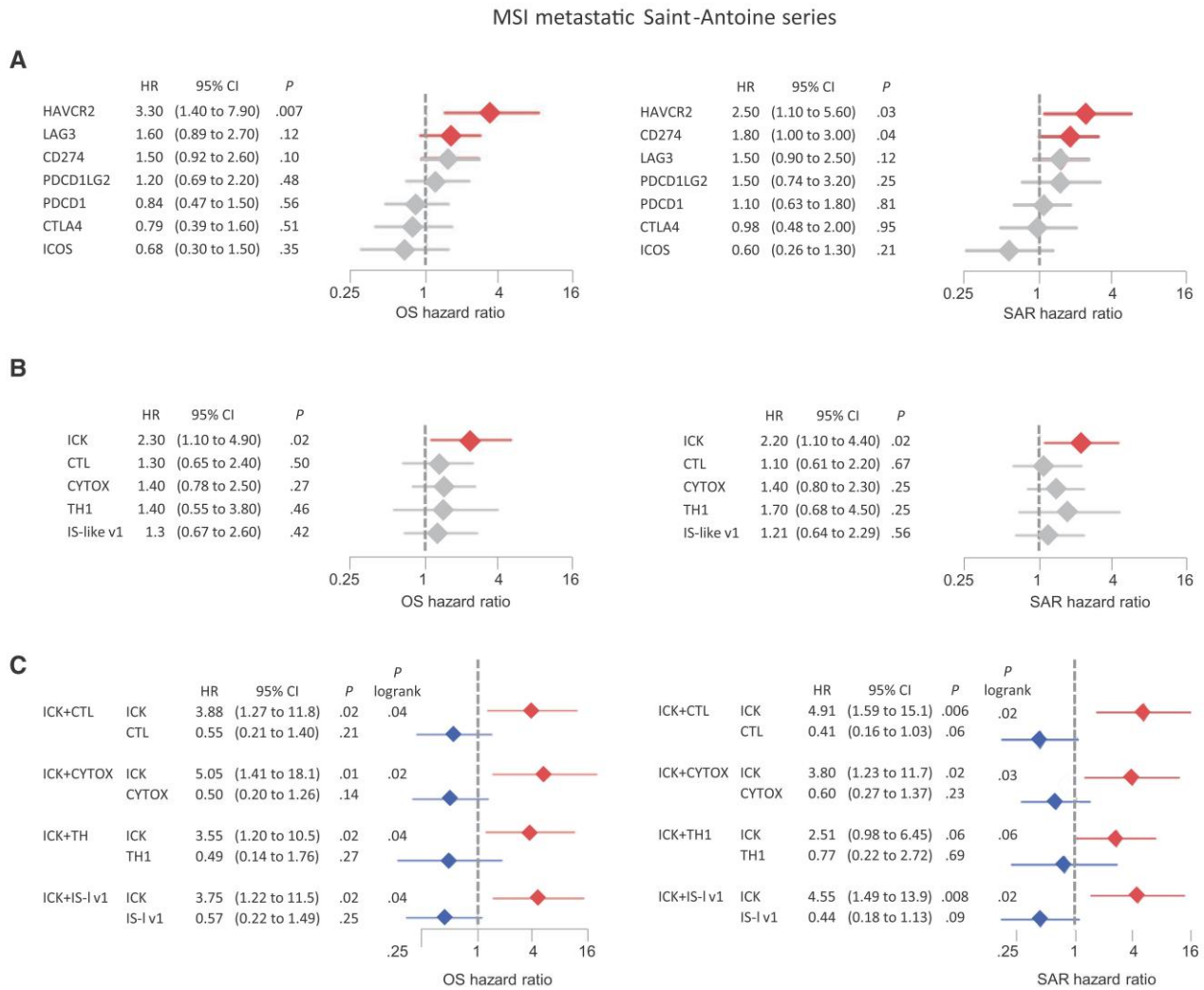


Figure 2. Prognostic value of immune checkpoints in an independent metastatic microsatellite instable (MSI) colorectal cancer (CRC) patient series. **A)** Prognostic value of ICK gene expression in metastatic MSI tumors. Forest plot of hazard ratios (HRs) estimated by univariate Cox analysis of overall survival (OS; left panel) and survival after relapse (SAR; right panel) on all ICK genes available in the NanoString data. Diamonds represent hazard ratio estimates, and bars the related 95% confidence intervals (CIs). Red indicates a worse prognosis hazard ratio, blue a better prognosis, and gray a hazard ratio with a Wald test P value of .1 or less. **B)** Prognostic value of metagene expression in MSI metastatic tumors. Forest plot of hazard ratios estimated by univariate Cox analysis of survival after relapse for metagene expression. The ICK metagene aggregates the three most associated ICK genes in univariate analysis (HAVCR2, CD274, and LAG3). The other metagene aggregate genes available in the NanoString data set for the corresponding category were CTL = CD3D, CD3G, CD8A, PTPRC; CYTOX = GNLY, GZMK; Th1 = IFNG. Metagene expression values were calculated by averaging the expression values obtained within the corresponding gene set. **C)** Bivariate Cox models of OS and SAR, combining the ICK metagene with other metagenes, in metastatic MSI tumors. Forest plot of SAR hazard ratios estimated by bivariate Cox analysis of ICK, CTL, CYTOX, Th1, and Immunoscore-like metagene expression in the independent MSI metastatic series. All statistical tests were two-sided. CI = confidence interval; CTL = cytotoxic T lymphocytes; HR = hazard ratio; ICK = immune checkpoint genes; OS = overall survival; SAR = survival after relapse.

in all CMS subtypes in both cohorts (Figure 3B). A high degree of heterogeneity was observed in CMS1 tumors (Figure 3B), particularly in MSI tumors, where high to very high expression levels of ICKs were observed in a large proportion of cases (Figure 3B).

Expression levels for all of the 28 immune markers were highly correlated in the MSI CRCs from both cohorts (Figure 3C). The present results highlight the extent of heterogeneity of MSI CRC with respect to immunity and to the overexpression of ICK molecules. This was observed regardless of MSI CRC origin (inherited or sporadic) or of other clinical or molecular parameters such as sex, tumor location, tumor stage, CMS, or KRAS/BRAF mutations (Supplementary Figure 4, available online). Considerable variation in the expression of ICK markers was

also observed in the independent metastatic MSI CRC series evaluated by NanoString (Figure 3D).

Functional Relevance of Immune Checkpoint Expression in CRC

We next addressed the possible physiological relevance of ICK overexpression in CRC. Tumor infiltration by immune cells was quantified using MCP counter software (28) in both the CIT and TCGA cohorts. A strong correlation was observed between ICK expression and infiltration by lymphoid (NK, T cells, cytotoxic cells) and myeloid cells. In contrast, B cells, fibroblasts, vessels, and granulocytes were less, or not at all, associated with ICK

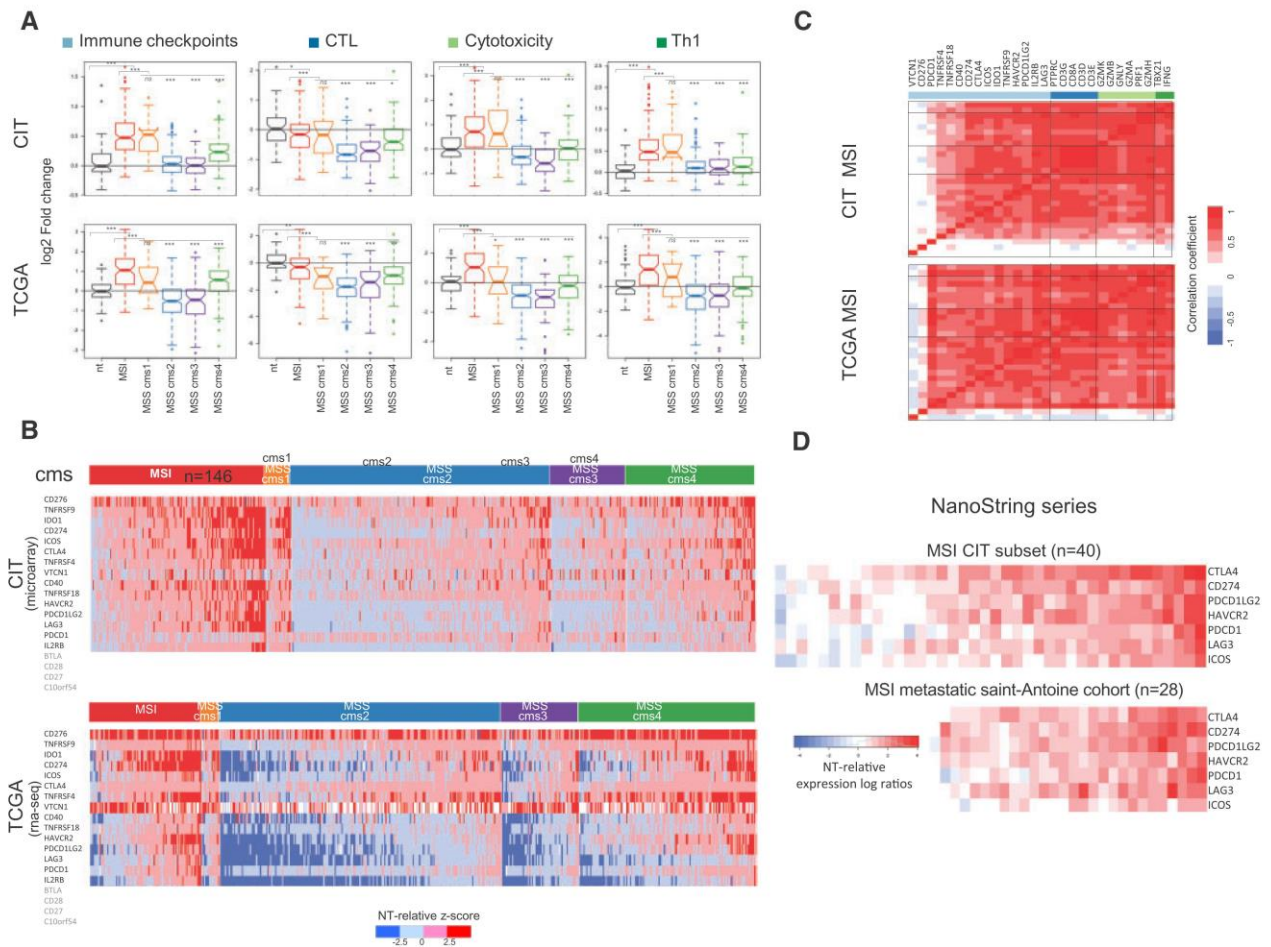


Figure 3. Immune gene expression distribution in colorectal cancer (CRC). **A**) Immune metagene expression relative to nontumoral colonic mucosa across CRC subtypes. **Height panels** show expression values for four metagenes (**columns**) in two series (**rows**): Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT; **top**) and The Cancer Genome Atlas (TCGA; **bottom**). Each metagene aggregates the gene expression values of a gene set related to one of four immune categories (immune checkpoints [ICK], cytotoxic T lymphocytes [CTL], cytotoxicity, Th1 functional orientation). Gene (and metagene) expression values are relative to the median expression in nontumor samples. Within each panel, the metagene values are presented in six boxplots related to six sample types (nontumor tissue [NT], MSI tumors, MSS tumors subdivided into the four consensus molecular subtypes [CMS]). *P* values were calculated using a Student's *t* test. *P* values were calculated using a Student's *t* test to assess the statistical significance of differences between MSI and NT and between MSI and MSS/CMS ($***P < .001$, $**P < .01$, $*P < .05$). **B**) Heterogeneous expression of ICK genes among MSI and MSS CRCs. Heatmap shows the gene expression z-scores of ICK genes in MSI and MSS tumor samples in CIT (**top**) and TCGA (**bottom**) series. Central and dispersion parameters used to generate z-scores correspond to the median and median absolute deviation (mad) in NT samples. Samples are ordered according to MSI/MSS status, CMS within MSS, and median expression value of immune checkpoint genes. **C**) Correlation of expression of immune genes within MSI tumors. Heatmap of Pearson coefficients of correlation between expression values of immune genes within MSI tumors of CIT (**top**) and TCGA (**bottom**) series separately. Genes are ordered according to four immune categories (ICK, cytotoxic T lymphocytes [CTL], cytotoxicity, Th1 functional orientation). **D**) Heterogeneous expression of ICK genes among MSI metastatic tumors. Heatmaps show gene expression of ICK genes in primary tumor samples from an independent metastatic MSI CRC series (**bottom**), compared with a subset of the CIT MSI series (**top**). Expression values were obtained using NanoString technology, where only a subset of immune genes was evaluated. NT-relative gene expression ratios are displayed. All statistical tests were two-sided. CIT = Cartes d'Identité des Tumeurs; CMS = Consensus Molecular Subgroups; CTL = cytotoxic T lymphocytes; ICK = immune checkpoint genes; high = high expression level; MSI = microsatellite instable; MSS = microsatellite stable; NT = nontumoral tissue samples; TCGA = The Cancer Genome Atlas.

expression (Figure 4A). These results suggest that ICK expression occurs in response to an efficient *in situ* adaptive T cell immune response. Pathway enrichment analysis was performed to compare the expression profiles of MSI tumors with low vs high ICK expression levels. Statistically significant associations were observed between ICK expression and immune response gene sets, including positive activation of T cell response, negative regulation of T cell activation, T cell exhaustion, IL-10 response, and chronic viral infection (29) (Figure 4B). Hence, we conclude that there is a strong correlation between ICK expression and the presence of an exhausted T cell immune response in MSI CRC.

To further investigate the functional relevance of ICKs in MSI tumors, we studied eight primary MSI tumors showing upregulation of ICKs and 12 without. PD-L1 and CD8 expression were examined using immunohistochemistry (IHC). PD-L1 expression was observed only in the tumor bed, whereas CD8 was present both in the tumor core and in stromal areas (Figure 4C). Moreover, PD-L1 expression correlated strongly with ICK expression (Supplementary Figure 5, available online), while we observed concomitant increases of CD8 infiltrates in both the tumor bed and in the peritumoral stroma with PD-L1 IHC staining (Figure 4D). Proliferation and functional activity of CD8 T cells were then determined using multiparametric

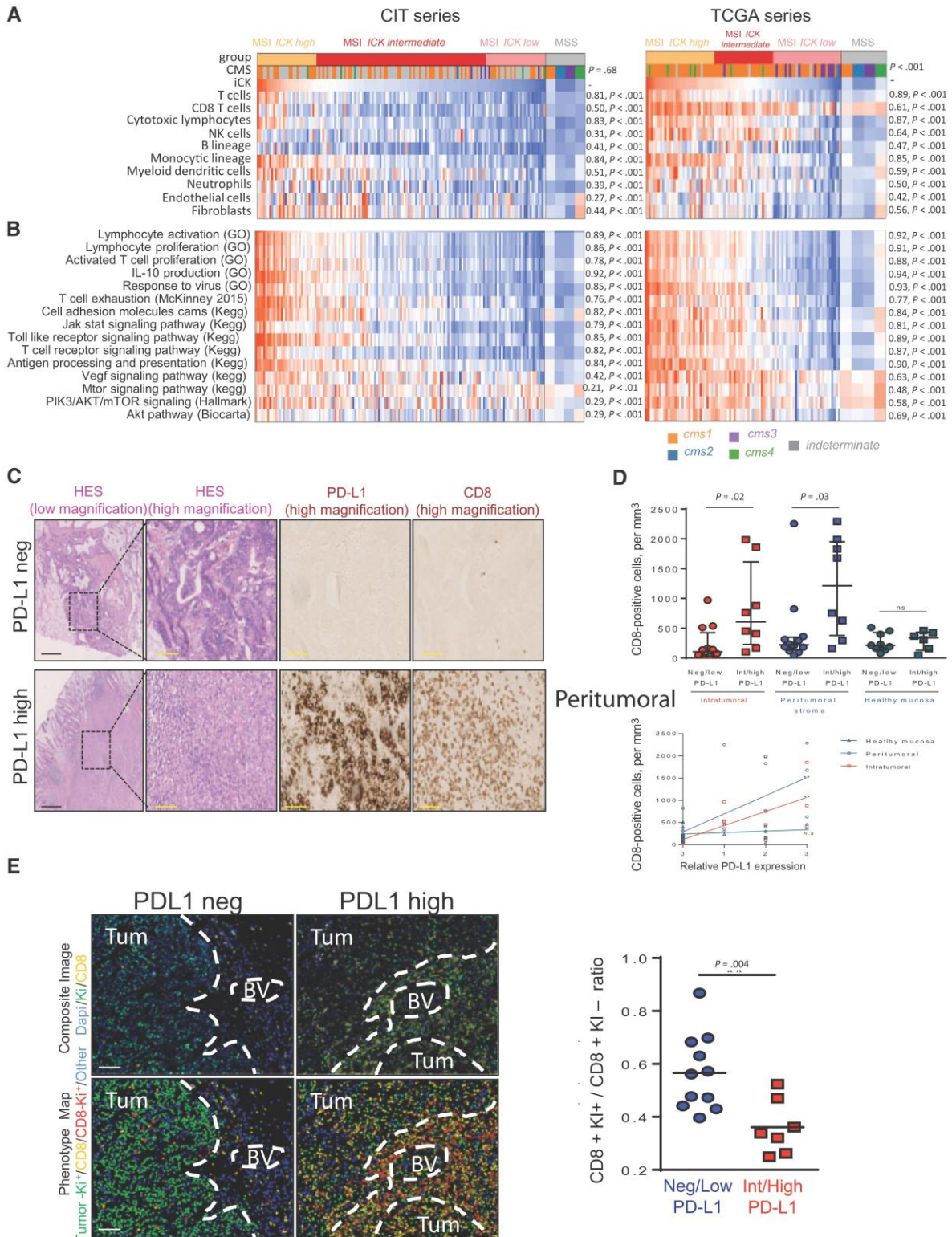


Figure 4. Functional relevance of immune checkpoint expression in colorectal cancer (CRC). **A**) Transcriptome-based abundance estimates of microenvironment cell populations (MCPcounter) and relation to ICK gene expression. Heatmap showing the abundance estimates for nine immune (Lymphoid, natural killer [NK] or T, T derived, NK, Cytotoxic, B derived, myeloid, monocyte derived, granulocyte) and two nonimmune (vessels, fibroblasts) cell populations in microsatellite instable (MSI) tumors and microsatellite stable (MSS) Consensus Molecular Subgroups (CMS) in the Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT; left) and The Cancer Genome Atlas (TCGA; right) series. For each of these 11 cell populations, abundance estimates were calculated using MCP counter software as the average NT-relative expression ratios of corresponding markers. ICK metagene expression and CMS classification are also shown. MSI tumor samples are divided into three groups according to ICK metagene expression (high, intermediate, and low). These three groups are compared with CMS subtypes; analysis of variance test P values are reported on the right of the

immunofluorescence microscopy (Figure 4E, left panel). CD8 T cells that were close to or in contact with PD-L1-expressing tumors were less proliferative, as observed with Ki67 labeling (median = 0.56 in ICK low vs median = 0.34 in ICK high, $P = .004$) (Figure 4E, right panel). These results indicate that interactions between CD8 T cells and ICK ligands in MSI primary tumors can impede CD8 T cell function.

Discussion

During cancer progression, tumor-infiltrating T cells have been shown to display increased chronic expression of different antagonist ICKs, causing functional exhaustion and unresponsiveness of T cells (30). The exhausted CD8 T cells fail to proliferate in response to antigen and lack critical anticancer effector functions (31). Checkpoint inhibitors could boost the anticancer immune response, and the potential relevance of these inhibitors for the treatment of metastatic MSI CRC patients was highlighted (16). In the present study, we showed that ICK overexpression represents a more accurate prognostic biomarker for MSI CRC patients treated with standard care than the classical assessment of T cell number by Immunoscore (1). This may be explained by the presence of exhausted nonproliferative CD8 T cells in the core of these neoplasms. More generally, our data indicate that assessment of the prognostic significance of anti-tumor immunity in CRC needs to take into account ICK expression. This is particularly relevant for colon tumors displaying immunogenic profiles with both high Immunoscopes and ICK expression, such as in MSI tumors and probably a substantial proportion of MSS CRCs.

The current results were obtained using univariate Cox models for survival analysis and a transcriptome-based method to quantify both ICK and CTL/Th1/cytotoxicity (Immunoscore) markers. We validated our method by building Immunoscore-like surrogates that were associated with statistically significantly improved survival of CRC patients. Under the same conditions, the CTL/Th1/cytotoxicity and Immunoscore markers were both associated with worse prognosis in MSI CRC. These results are potentially in conflict with a recent publication that observed a statistically significant association between Immunoscore and improved outcome in a single series of 105 MSI CRC patients (17). Although the studies are not directly comparable, here we assessed three independent cohorts of CRC patients, totaling more than 1200 cases and including 260 MSI CRCs. However, it does not include classical Immunoscore evaluation by immunohistochemistry.

Bivariate Cox analysis, combining ICK metagene with CTL or Th1 or cytotoxicity or Immunoscore-like metagene, revealed

that expression of metagenes related to CTL/Th1/cytotoxicity and Immunoscore markers was associated with trends for better prognosis in MSI CRC from both the CIT and NanoString metastatic series, whereas the ICK metagene was statistically significantly associated with worse prognosis. However, this association was not observed in the TCGA cohort as it had too few events ($n = 5$) to get sufficient statistical power. Therefore, validation in another larger cohort is required. In contrast with the earlier study that focused only on the PD1/PDL1 couple (17), a more global assessment of ICK gene expression in the tumor core, as proposed in the present study, allows a more holistic view of the T cell immune response in CRC. Moreover, the transcriptome-based method reported here is easier to use and more amenable to standardization. It can be also used to test publicly available clinical data sets, whereas this is not possible with Immunoscore because of the need to assess primary tumor samples.

Recent clinical trials have demonstrated that antibodies targeting PD-1 or PD-L1 can induce a major response in many types of cancers (32). The overall survival rate with more than five years' follow-up for stage II and III MSI CRC patients is approximately 70% without adjuvant chemotherapy and 75% to 90% with standard care adjuvant chemotherapy (33–35), whereas it is less than 5% for stage IV MSI CRC patients. We report here for the first time the prognostic significance of ICK overexpression in both metastatic and nonmetastatic MSI CRC and in the absence of immunotherapy. These findings should help to better inform the prognosis of MSI CRC patients. They may be useful for guiding future immunotherapy involving antibody blockade of ICKs in nonmetastatic MSI CRC patients and for having predictive factors of immunotherapy efficacy for patients with metastatic disease.

The limitations of our study are mainly related to the fact that it is not yet ready for routine clinical use. First, it will be necessary to confirm in large and prospective series of patients from randomized trials that the outcome of CRC patients is determined by the CTL/ICK balance. Second, it will be necessary to further assess the prognostic relevance of combined ICK and CTL marker expression in MSI CRC. This should allow patients who are at high risk of relapse to be identified and thus indicated for more intensive treatments linked to these molecular markers. Such work will help to confirm ICK molecules as clinically relevant therapeutic factors for the treatment of MSI CRC.

To conclude, our results highlight the extent of heterogeneity of CRC with respect to immunity, and the overexpression of ICK molecules in particular. They suggest that prediction of CRC patient outcomes through evaluation of immune components in the tumor microenvironment will likely be improved by the

Figure 4. Continued

heatmap. Associations between abundance estimates of immune cell populations and the ICK metagene expression within MSI tumors were measured by Pearson's correlations. Coefficients and associated P values are reported on the **right of the heatmap**. For MSS tumors, the median values within each CMS are displayed. Samples are ordered according to the ICK metagene values. **B)** Functional associations with overexpression of ICK genes. MSI samples are divided into three groups according to ICK metagene expression (high, intermediate, and low). Heatmap showing the expression score of a selection of immune gene sets statistically significantly enriched in genes that were differentially expressed between high- and low-ICK-expressing MSI tumor groups, in CIT (**left**) and TCGA (**right**) series. For each gene set, expression scores are calculated as the mean NT-relative expression ratios across all genes in the gene set. Pearson's correlation coefficients and associated P values are reported. **C)** Representative slide of PD-L1 and CD8 immunohistochemical (IHC) staining of MSI CRC with high expression of ICK genes on transcriptomic data. **Black scale bar** is 1 mm. **Yellow Scale bar** is 100 μm . **D)** CD8 cell density according to PD-L1 expression within tumors, stroma, and healthy mucosa. **Upper panel:** number of CD8 cells per mm^2 in intratumoral area, peritumoral stromal area, and healthy mucosa in patients with high PD-L1 expression vs low or no PD-L1 expression. **Lower panel:** correlation between semiquantitative PD-L1 expression with IHC staining and CD8 number per mm^2 in intratumoral area, peritumoral stromal area, and healthy mucosa. **E)** Representative slide of CD8 cell infiltration and PD-L1 expression. **Left panel:** representative slide of CD8, DAPI, and Ki67 staining with classical composite immunofluorescence image and phenotype map using Inform software to recognize tumor cells, proliferating and nonproliferating CD8 cells, and other cells. **Scale bar** is 100 μm . **Right panel:** quantification of proliferating CD8 or nonproliferating CD8 cells in PDL-L1 high vs low or negative tumor. All statistical tests were two-sided. **Error bars** represent standard deviation. CIT = Cartes d'Identité des Tumeurs; CMS = Consensus Molecular Subgroups; ICK = immune checkpoint genes; MSI = microsatellite instable; MSS = microsatellite stable; TCGA = The Cancer Genome Atlas.

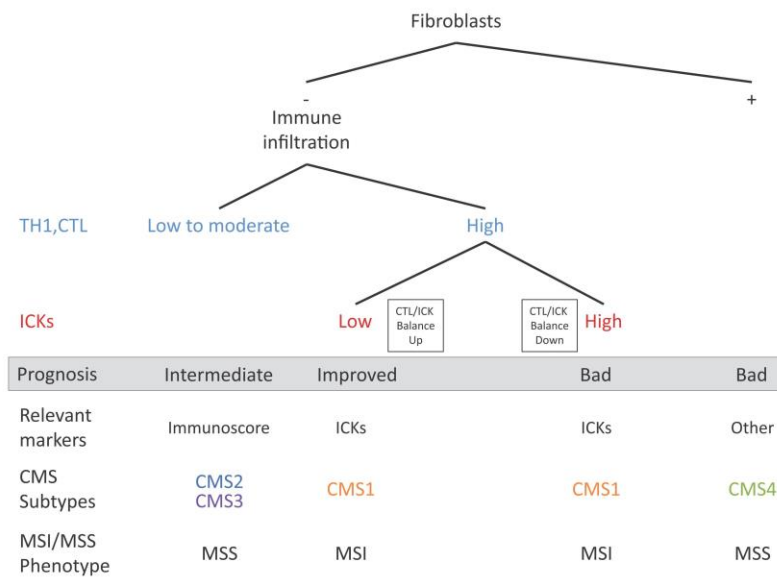


Figure 5. Immune model for prognostication of colorectal cancer (CRC) patients. The diagram shows a model of decision tree based on the three criteria, fibroblast presence, immune infiltration, and immune checkpoint expression, to define the four distinct prognosis groups according to immunity observed in CRC patients. Expected prognosis, relevant markers, subtypes, and microsatellite instable status are given for each group. CMS = Consensus Molecular Subgroups; CTL = cytotoxic T lymphocytes; ICK = immune checkpoint genes; high = high expression level; MSI = microsatellite instable; MSS = microsatellite stable.

integration of ICK markers, the prognosis of colon tumors being determined by the CTL/ICK balance (Figure 5). More particularly, our results indicate that ICK expression impacts the prognosis of MSI tumors. To inform future immunotherapy involving antibody blockade of ICKs and resistance to these molecules in MSI CRC patients, additional studies on the molecular mechanisms underlying the immune reaction against MSI tumor cells are required, for example, the number and type of MSI-driven mutational events that drive the synthesis of aberrant, immunogenic peptides (36). Identifying these somatic events with respect to quantitative and qualitative antitumoral immunity may improve the personalized treatment of MSI CRC patients with ICK inhibitors, in both metastatic and nonmetastatic settings.

Funding

This work was supported by the Inserm Institute, UPMC, and the “Cartes d’Identité des Tumeurs” (CIT) research program, funded and directed by the “Ligue Nationale Contre le Cancer,” and by grants from the “Institut National du Cancer” (INCa to AD). AD group has the label “La Ligue Contre le Cancer.”

Notes

Laetitia Marisa, Magali Svrcek, Ada Collura, Etienne Becht, Pascale Cervera, Kristell Wanherdrick, Olivier Buhard, Anastasia Goloudina, Vincent Jonchère, Janick Selves, Gerard Milano, Dominique Guenot, Romain Cohen, Chrystelle Colas, Pierre Laurent-Puig, Sylviane Olschwang, Jérémie H. Lefèvre, Yann Parc, Valérie Boige, Côme Lepage, Thierry André, Jean-François Fléjoux, Valentin Dérangère, François Ghiringhelli*, Aurélien de Reynies*, Alex Duval*

*Authors contributed equally to this work.

Affiliations of authors: Programme “Cartes d’Identité des Tumeurs,” Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France (LM,

EB, AdR); INSERM, UMRS 938 - Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe “Instabilité des Microsatellites et Cancers,” Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France (MS, AC, PC, KW, OB, AG, VJ, RC, CC, JHL, YP, TA, JFF, AD); Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Paris, France (MS, AC, PC, KW, OB, AG, VJ, RC, CC, JHL, YP, TA, JFF, AD); AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d’Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France (MS, PC, JFF); Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR 1037 INSERM - Université Toulouse III, Department of Pathology, CHU, Toulouse, France (JS); Laboratoire d’Oncopharmacologie, EA 3836, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France (GM); INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l’Intestin et du Pancréas, Strasbourg, France (DG); AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d’Oncologie Médicale, Paris, France (RC, TA); AP-HP, Laboratoire d’oncogénétique et d’Angiogénétique, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France (CC); INSERM, Unité Mixte de Recherche, Paris Sorbonne Cité, Université Paris Descartes, Paris, France (PLP); Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France and RGDS, HP Clairval, Marseille, France (SO); AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France (JHL, YP); Department of Oncologic Medicine, Gustave-Roussy, Villejuif, France (VB); Université Paris Descartes, Paris Sorbonne Cité INSERM UMR-S775, Paris, France (VB); INSERM, Burgundy Cancer Registry, U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, BP 87900 21079 Dijon, France (CL); Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France (VD, FG); INSERM, UMR866, Burgundy University (VD, FG); Platform of transfer in oncology, Burgundy University, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France (VD, FG).

The funder, the French League Against Cancer, participated in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of the data; the writing of the manuscript; and the decision to submit the manuscript for publication.

We thank Prof. W. H. Fridman for his scientific assistance.

Study concept and design: L. Marisa, F. Ghiringhelli, A. de Reynies, A. Duval; acquisition of data: all other authors; analysis

and interpretation of data: L. Marisa, V. Dérensère, E. Becht, F. Ghiringhelli, A. de Reynies, A. Duval; drafting of the manuscript: L. Marisa, M. Svrcek, A. Collura, E. Becht, P. Cervera, K. Wanherdrick, O. Buhard, A. Goloudina, V. Jonchère, J. Selves, G. Milano, D. Guenot, R. Cohen, C. Colas, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, J. H Lefèvre, Y. Parc, V. Boige, C. Lepage, T. André, JF Fléjou, V. Dérensère, F. Ghiringhelli, A. de Reynies, A Duval; statistical analysis: L. Marisa, A. de Reynies; study supervision: A. Duval; biological material suppliers: all other authors.

References

- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–1964.
- Angell HK, Gray N, Womack C, Pritchard DI, Wilkinson RW, Cumberbatch M. Digital pattern recognition-based image analysis quantifies immune infiltrates in distinct tissue regions of colorectal cancer and identifies a metastatic phenotype. *Br J Cancer*. 2013;109(6):1618–1624.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):610–618.
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*. 1993;53(24):5849–5852.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000;342(2):69–77.
- Bauer K, Nelius N, Reuschenbach M, et al. T cell responses against microsatellite instability-induced frameshift peptides and influence of regulatory T cells in colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(1):27–37.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812–816.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993;75(6):1215–1225.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260(5109):816–819.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363(6429):558–561.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993;75(5):1027–1038.
- Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med*. 2011;17:1283–1289.
- Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: Toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*. 2002;62(9):2447–2454.
- Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, et al. [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bull Cancer*. 2008;95(1):121–132.
- Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015;5(1):43–51.
- Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–2520.
- Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity*. 2016;44(3):698–711.
- Dunne PD, McArt DG, O'Reilly PG, et al. Immune-derived PD-L1 gene expression defines a subgroup of stage II/III colorectal cancer patients with favorable prognosis who may be harmed by adjuvant chemotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(7):582–591.
- Masugi Y, Nishihara R, Yang J, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut*. 2016; in press.
- Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, et al. The patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2016; in press.
- Li Y, Liang L, Dai W, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2016;15(1):55.
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350–1356.
- Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Perez Gracia JL, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(8):457–472.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298–306.
- Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: Characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10(5):e1001453.
- McCall MN, Bolstad BM, Irizarry RA. Frozen robust multiarray analysis (FRMA). *Biostatistics*. 2010;11(2):242–253.
- Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 2007;8(1):118–127.
- Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol*. 2016;17(1):218.
- Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486–499.
- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29–37.
- Ferris RL, Lu B, Kane LP. Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion. *J Immunol*. 2014;193(4):1525–1530.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450–461.
- Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219–3226.
- Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res*. 2014;20(20):5322–5330.
- Andre T, de Gramont A, Vermaere D, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4176–4187.
- Saeterdal I, BJORHEIM J, LISLERUD K, et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(23):13255–13260.
- Becht E, de Reynies A, Giraldo NA, et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4057–4066.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

The Balance between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression Determines Prognosis in Colon Tumors

Laetitia Marisa ¹, Magali Svrcek ^{2,3,4}, Ada Collura ^{2,3}, Etienne Becht ¹, Pascale Cervera ^{2,3,4}, Kristell Wanherdrick ^{2,3}, Olivier Buhard ^{2,3}, Anastasia Goloudina ^{2,3}, Vincent Jonchère ^{2,3}, Janick Selves ⁵, Gerard Milano ⁶, Dominique Guenet ⁷, Romain Cohen ^{2,3,8}, Chrystelle Colas ^{2,3,9}, Pierre Laurent-Puig ¹⁰, Sylviane Olschwang ¹¹, Jérémie H Lefèvre ^{2,3,12}, Yann Parc ^{2,3,12}, Valérie Boige ¹³, Côme Lepage ¹⁴, Thierry André ^{2,3,8}, Jean-François Fléjou ^{2,3,4}, Valentin Dérangère ^{15,16,17}, François Ghiringhelli * ^{15,16,17}, Aurélien de Reynies * ¹, Alex Duval * ^{2,3}

- (1) Programme “Cartes d'Identité des Tumeurs”, Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France;
- (2) INSERM, UMRS 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;
- (3) Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, F-75012 Paris, France ;
- (4) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France;
- (5) Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR 1037 INSERM - Université Toulouse III, Department of Pathology, CHU, Toulouse, France ;
- (6) Laboratoire d'Oncopharmacologie, EA 3836, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France ;
- (7) INSERM, U682, Développement et Physiopathologie de l'Intestin et du Pancréas, 67200 Strasbourg, France;
- (8) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Oncologie Médicale, Paris, France;

- (9) AP-HP, Laboratoire d'oncogénétique et d'Angiogénétique, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France ;
- (10)INSERM, Unité Mixte de Recherche S1147, Paris Sorbonne Cité', Université Paris Descartes, Paris, France ;
- (11)Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France and RGDS, HP Clairval, Marseille, France
- (12)AP-HP, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France ;
- (13)Department of Oncologic Medicine, Gustave-Roussy, Villejuif, France2Université Paris Descartes, Paris Sorbonne Cité INSERM UMR-S775, Paris, France.
- (14)INSERM, Burgundy Cancer Registry, U866, Burgundy University, Dijon University Hospital, BP 87900 21079 Dijon, France;
- (15)Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France.
- (16)INSERM, UMR866, Burgundy University.
- (17)Platform of transfer in oncology, Burgundy University, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

Abbreviations

ICK, Immune Checkpoint; CTL, tumor-infiltrating T cells; CMS, Consensus Molecular Subgroups; IHC, immunohistochemical; MMR, mismatch repair; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability.

* Equal contribution, co- last authors

[§] Corresponding Author: Alex Duval
e-mail: alex.duval@inserm.fr
Phone: 0033-1-49286680

Supplementary Materials and Methods

Immune genes

We investigated 32 immune markers classified into four gene groups: (i) immune checkpoints and modulators (ICK, n=19; CD40, CD274, ICOS, LAG3, IL2RB, HAVCR2, TNFRSF4/9/18, CD276, CTLA4, PDCD1LG2, VTCN1, PDCD1, BTLA, CD28, C10orf54, CD27, IDO1); (ii) cytotoxicity (CYTOX, n=6; GZMA/B/K/H, GLNY, PRF1); (iii) Th1 orientation (n=2; TBX21, IFNG); and (iv) cytotoxic lymphocytes (CTL, n=5; CD8A, CD3D/E/G, PTPRC) (for review, see (1)).

TCGA Cohort

For the CRC cohort from TCGA consortium, preprocessed gene expression RNA-seq data were downloaded at the *Broad Institute TCGA Genome Data Analysis Center (2015): Firehose stddata__2015_06_01 run. Broad Institute of MIT and Harvard. doi:10.7908/C1251HBG*. Data were combined and normalized according to TCGA RNA-seq pipeline using RSEM quantification. The dataset contained 86 MSI, 527 MSS and 51 NT samples.

Metastatic Cohort

The metastatic cohort from Saint-Antoine Hospital was a retrospective, multisite series of 28 primary MSI CRC classified as stage 4 according to the TNM classification (11 synchronous metastatic lesions, 17 metachronous metastatic lesions). As part of a separate and on-going study, this cohort was screened in parallel with other tumor cohorts for the expression of 196 genes associated with CRC subtypes, including immune-related genes (Guinney et al (2), Becht et al (3)). This included transcriptome analysis of a subset of 40 MSI tumor samples for which sufficient RNA material was available. The NanoString nCounter® technology was used

since this platform is suitable for low amounts of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (ffpe) samples and without the need for an amplification step. Amongst the 196 genes screened, a subset of immune genes was assessed for relevance following review of the literature. Only 14 of the 32 genes used in this study were available: (i) 7 immune checkpoints (CD274, CTLA4, HAVCR2, ICOS, LAG3, PDCD1, PDCD1LG2); (ii) 2 markers for cytotoxicity (GZMK, GLNY); (iii) 1 marker for Th1 orientation (IFNG); and (iv) 4 markers of cytotoxic lymphocytes (CD8A, CD3D/G, PTPRC).

Survival Analysis

Associations between gene expression and survival were assessed by univariate and bivariate Cox proportional-hazards regression analyses using the R package survival. All Cox models were stratified by TNM stage and, for the CIT cohort, by clinical centers. For the CIT and TCGA cohorts, overall survival was used as the end point and was defined as the time from surgery to death (any cause) of the patient, or to last contact. The delays were censored at 5 years. Survival annotations were available for 137 MSI and 439 MSS CRC patients in the CIT cohort, and for 57 MSI and 352 MSS CRC patients in the TCGA cohort. Separate analyses were performed independently on both data sets. Results from these two series were combined using a meta-analysis approach from DerSimonian *et al.* (4) using the inverse variance method for pooling of survival data, implemented in the R package meta (function metagen). For the metastatic patient cohort, survival after relapse was used. This was defined as the time from metastasis diagnosis to death from any cause, or last contact with the patient.

Functional Analysis

An enrichment analysis was performed to evaluate pathways associated with overexpression of ICKs using MSigDB gene sets. Statistically significant genes associated with ICK overexpression were selected by a moderated t-test between low and high ICK expression level in MSI tumors (the top and bottom 30 samples based on the ICK metagene). The top 100 to 500 statistically significant genes were evaluated for gene set enrichments by hypergeometric tests. The median p -value across gene selections was used to select statistically significant gene sets. Only a selection amongst the statistically significant gene sets, based on functional interest, was shown. The abundance of immune cell populations was estimated using MCP-counter software (5).

Immunohistochemistry and ImmunoFluorescence procedures

20 FFPE tumor samples of MSI colon cancers were sliced in thin tissue sections of 4 μ m. For IHC, automated routine staining procedures were carried out for HE, PD-L1 (Ventana, SP142) and CD8 (Dako, M7103) using Ventana Benchmark. Relative quantification for PD-L1 staining was performed independently by two pathologists. Absolute CD8 quantification was carried out with Definiens Tissue Studio software. Briefly, after numeration using Nanozoomer 2.0HT and NDPscan software (both from Hamamatsu), slides for each sample were processed and analyzed in several areas that were manually defined by a pathologist. Screen captures were made with NDPview software (Hamamatsu). PD-L1 staining without nuclei counterstaining was also performed and merged with HE staining using Paint.net free software (dotPDN LLC).

For IF procedures, the same samples from MSI patients were stained using Ki67-Alexa-Fluor 488 labelled (BD Pharmingen, 558616, dilution 1/10 incubated overnight) and CD8 (Dako, M7103, dilution 1/100 during one hour) antibodies. Secondary goat-anti-mouse

Alexa-Fluor 555 was also used (Life Technologies, A21422, dilution 1/500 during 30 minutes) for CD8 staining (see also Supplementary Materials and Methods). Slides were then mounted using DAPI-containing mounting medium (Sigma, F6057), kept at 4°C and imaged the following day using spectral microscopy technology (Mantra Workstation, PerkinElmer) at X20 magnification. DAPI-only positive cells, Ki67-only positive cells, CD8-only positive cells and CD8/Ki67 double positive cells were phenotyped using a trainable algorithm from inForm software (PerkinElmer).

NanoString nCounter Gene Expression Profiling

The NanoString nCounter® technology is a simple to use, highly automated, cost- and time-effective platform for the direct quantification of up to 800 nucleic-acid targets in a single reaction, without the need of any amplification processing. It is suitable for low amounts of material, and has been shown to work well even on degraded nucleic acids as material from formalin-fixed paraffin-embedded (ffpe) samples (6). Two probes are used to detect each target: a target-specific reporter probe that carries the fluorescent barcode to identify the target (and the sample in case of multiplex experiments), and a biotinylated non-target-specific capture probe to immobilize complex for data measurements. Up to 800 unique probe pairs can be combined with internal controls (six positive controls, spiked-in at fixed, proportional concentrations (from 0.125–128 fM), and eight negative controls (probes without a corresponding target) used to assess background and non-specific binding) to form a CodeSet. One color barcode measured corresponds to one molecule/one count (7).

For our study including 2464 samples, among which the metastatic cohort and the CIT colorectal cancer cohort, we designed a Codeset of 196 genes of subtype specific genes, immune genes and 5 house-keeping genes for normalization purposes. Because of the

number of samples processed, experiments were multiplexed by 4 samples. Therefore, the Codeset was divided into 4 subcodesets with the same 196 reporter probes but with a color in the barcode dedicated to sample identification.

Total RNA were extracted using the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) for the metastatic cohort samples and the RNeasy (Qiagen) kit for the CIT cohort samples. 150 ng of total RNA of each sample were hybridized with a subcodeset independently and hybridized at 65°C overnight. Then samples were merged by 4 and loaded into the nCounter Prep Station for probe purification and immobilization. A standard NanoString cartridge holds 12 lanes, allowing for 12x4, 48, samples to be processed in a given run. For multiplex normalization purpose, a calibrator sample (CS), composed of a pool of 30 RNA samples randomly selected among samples with enough material, were added and hybridized with each subcodeset in each cartridge. The cartridges were then placed into the nCounter™ Digital Analyzer for gene expression counting.

The NanoString digital gene specific counts were normalized by dividing the counts of each sample by the geometric mean of the 5 housekeeping genes and then corrected for multiplex effect using the CS (for each cartridge, one of the 4 CS is used as a reference sample denominator for the correction factor of the other subcodeset). The data were then log₂ transformed.

REFERENCES

1. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.

2. Guinney, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21, 1350–1356 (2015).
3. Becht, E. et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2879
4. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986;7(3):177-88.
5. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* 2016;17(1):218.
6. Talhouk, A. et al. Single-Patient Molecular Testing with NanoString nCounter Data Using a Reference-Based Strategy for Batch Effect Correction. *PLoS One* 11, (2016).
7. Geiss, G. K. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology* 26, 317–325 (2008).

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Description of all the cohorts investigated in this study.

Annotation and Modality	MSI CIT cohort, No. (%)	MSI TCGA cohort, No. (%)	MSI P*	MSI Metastatic (NanoString), No. (%)	MSI CIT cohort subset (NanoString), No. (%)	MSS CIT cohort, No. (%)	MSS TCGA cohort, No. (%)	MSS P*
Sample type								
Tumor	146	86		28	40	444	527	
Normal	56	51		0	16	56	51	
TNM Stage								
I	15 (10.3)	16 (19.0)	0.02	0 (0.0)	6 (15.0)	30 (6.8)	89 (17.3)	<0.001
II	75 (51.4)	51 (60.7)		0 (0.0)	20 (50.0)	181 (40.8)	173 (33.6)	
III	46 (31.5)	15 (17.9)		0 (0.0)	13 (32.5)	177 (49.9)	166 (32.2)	
IV	10 (6.8)	2 (2.4)		28 (100.0)	1 (2.5)	56 (12.6)	87 (16.9)	
TP Localization								
Left colon	32 (22.5)	7 (8.2)	0.02	3 (10.7)	11 (27.5)	290 (65.3)	221 (42.4)	<0.001
Rectum	5 (3.5)	2 (2.4)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	108 (20.7)	
Right colon	105 (73.9%)	76 (89.4)		25 (89.3)	29 (72.5)	154 (34.7)	192 (36.9)	
Sex								
Female	79 (54.1)	49 (57.0)	0.77	16 (57.1)	25 (62.5)	191 (43.0)	236 (44.8)	0.63
Male	67 (45.9)	37 (43.0)		12 (42.9)	15 (37.5)	253 (57.0)	291 (55.2)	
Lynch Syndrome (estimated)†								
Yes	78 (56.9)	39 (66.1)	0.30	8 (100)	13 (36.1)	0 (0)	0 (0)	-
None	59 (43.1)	20 (33.9)		0 (0)	23 (63.9)	444 (100)	527 (100)	
Mucinous								
No	142 (97.3)	63 (73.3)	<0.001	10 (35.7)	39 (97.5)	439 (98.9)	476 (90.3)	<0.001
Yes	4 (2.7)	23 (26.7)	1	18 (64.3)	1 (2.5)	5 (1.1)	51 (9.7)	
BRAF mutation								
Mutated	59 (43.4)	23 (41.8)	0.97	1 (10.0)	19 (48.7)	14 (3.6)	15 (5.1)	0.42
Wild-type	77 (56.6)	32 (58.2)		9 (90.0)	20 (51.3)	378 (96.4)	278 (94.9)	
KRAS mutation								
Mutated	34 (25.2)	14 (25.5)	1	5 (38.5)	9 (23.1)	182 (42.7)	115 (39.2)	0.39
Wild-type	101 (74.8)	41 (74.5)		8 (61.5)	30 (76.9)	244 (57.3)	178 (60.8)	
Age, years old								
<60	41 (28.1)	17 (19.8)	0.21	12 (42.9)	8 (20.0)	118 (26.6)	155 (29.4)	0.36
≥60	105 (71.9)	69 (80.2)		16 (57.1)	32 (80.0)	326 (73.4)	372 (70.6)	
Used in survival analysis‡								
No	9 (6.2)	29 (33.7)	-	0 (0.0)	0 (0)	5 (1.1)	175 (33.2)	-
Yes	137 (93.8)	57 (66.3)		28 (100.0)	40 (100)	439 (98.9)	352 (66.8)	
RFS event								
No	109 (80.1)	48 (84.2)	0.65	0 (0.0)	35 (87.5)	268 (61.8)	278 (79.0)	<0.001
Yes	27 (19.9)	9 (15.8)		28 (100.0)	5 (12.5)	166 (38.2)	74 (21.0)	
OS event								
No	103 (75.2)	52 (91.2)	0.02	13 (46.4)	31 (77.5)	279 (63.6)	294 (83.5)	<0.001
Yes	34 (24.8)	5 (8.8)		15 (53.6)	9 (22.5)	160 (36.4)	58 (16.5)	
Median Follow up, mo	51	10		28	63	61	8	

* Two-sided Chi-square test. MSI = Microsatellite instable; MSS = Microsatellite stable; RFS = Relapse Free Survival; OS = Overall Survival.

†Lynch Syndrome estimated from BRAF mutation and Age, Yes if BRAF wild-type and Age <60 year old

‡ filtering criteria: follow up filled and superior to 0 month. Chi-square test p -value is not given as there is no biological/clinical signification.

Supplementary Table 2. Association of Immunoscore® metagenes to overall survival (TNM adjusted) across all tumors and intra MSI and MSS tumors in CIT (left) and TCGA (right) series*

Cohort	All CRC		MSI CRC		MSS CRC		MSS CMS1 CRC		MSS CMS2 CRC		MSS CMS3 CRC		MSS CMS4 CRC	
	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†	HR (95%CI)	P†
Both CIT+TCGA														
ICK	0.96 (0.78-1.19)	0.74	3.46 (1.41-8.49)	0.007	0.91 (0.72-1.15)	0.43	0.40 (0.01-18.98)	0.64	0.90 (0.53-1.53)	0.69	0.46 (0.21-1.00)	0.05	1.38 (0.70-2.70)	0.35
CTL	0.95 (0.81-1.10)	0.47	1.72 (1.00-2.98)	0.05	0.90 (0.76-1.06)	0.20	0.75 (0.16-3.49)	0.71	0.86 (0.63-1.18)	0.35	0.55 (0.33-0.92)	0.02	1.50 (1.00-2.26)	0.05
CYTOX	0.99 (0.87-1.14)	0.92	1.59 (1.03-2.46)	0.04	0.95 (0.81-1.11)	0.51	0.72 (0.20-2.52)	0.61	0.93 (0.67-1.28)	0.65	0.56 (0.34-0.93)	0.02	1.27 (0.88-1.83)	0.21
TH	1.05 (0.90-1.22)	0.55	2.21 (1.19-4.11)	0.01	1.01 (0.85-1.20)	0.92	0.88 (0.11-7.37)	0.91	1.07 (0.78-1.48)	0.66	0.51 (0.27-0.96)	0.04	1.61 (1.04-2.49)	0.03
Cytotoxic-Th1 IFNA1,IFNA5,IFNGRL,MIC A,MICB,IRF1, GNLY,IFNG,GZMA,ITGAE,P RF1	1.08 (0.85-1.37)	0.51	2.76 (1.12-6.81)	0.03	1.07 (0.80-1.42)	0.66	0.38 (0.02-9.16)	0.55	1.17 (0.68-2.00)	0.58	0.28 (0.09-0.83)	0.02	1.22 (0.64-2.34)	0.54
Immunoscore-like	0.98 (0.84-1.15)	0.80	1.60 (0.96-2.66)	0.07	0.94 (0.78-1.12)	0.47	0.85 (0.25-2.95)	0.8	0.74 (0.51-1.08)	0.11	0.60 (0.31-1.17)	0.13	1.47 (1.01-2.14)	0.04
CD3,CD8A	0.96 (0.82-1.13)	0.66	1.66 (0.97-2.82)	0.06	0.92 (0.76-1.10)	0.34	0.75 (0.16-3.55)	0.72	0.74 (0.50-1.08)	0.11	0.48 (0.22-1.05)	0.07	1.46 (0.99-2.17)	0.06
Immunoscore-like	0.83 (0.71-0.97)	0.02	1.46 (0.93-2.31)	0.10	0.78 (0.66-0.92)	0.003	0.46 (0.10-2.10)	0.32	0.63 (0.43-0.92)	0.02	0.55 (0.34-0.90)	0.02	1.13 (0.79-1.63)	0.5
CD3,CD8A,PTPRC	0.84 (0.70-1.00)	0.05	1.63 (0.96-2.79)	0.07	0.77 (0.63-0.94)	0.01	0.37 (0.05-2.52)	0.31	0.61 (0.39-0.95)	0.03	0.50 (0.27-0.93)	0.03	1.15 (0.75-1.76)	0.53
Immunoscore-like	0.85 (0.72-1.01)	0.062	1.54 (0.94-2.53)	0.09	0.79 (0.66-0.95)	0.01	0.48 (0.10-2.31)	0.36	0.56 (0.36-0.86)	0.009	0.48 (0.24-0.96)	0.04	1.20 (0.81-1.77)	0.37
CD8A,PTPRC,GZMB,MS4A 1,CD68														

CD3,CD8A,PTPRC,GZMB,
MS4A1,CD68

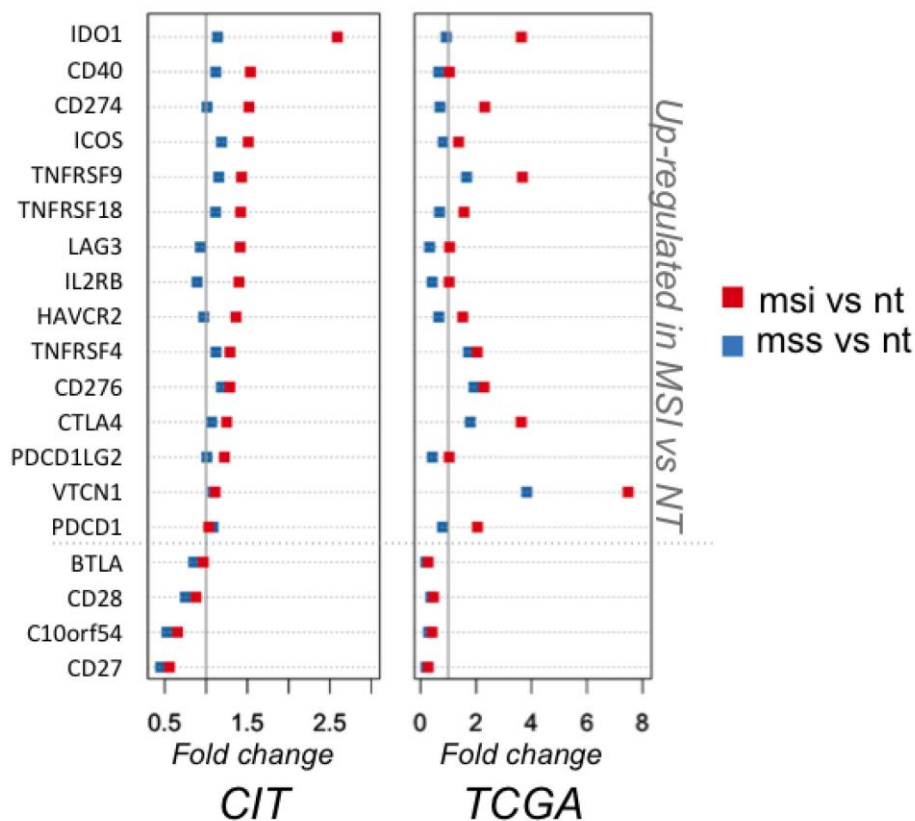
TCGA

ICK	0.96 (0.76-1.21)	0.72	2.67 (0.68-10.47)	0.16	0.93 (0.72-1.20)	0.59	1e6 (0-Inf)	1	0.91 (0.51-1.61)	0.74	0.50 (0.23-1.10)	0.08	1.58 (0.75-3.34)	0.23
CTL	0.91 (0.76-1.09)	0.32	2.17 (0.68-6.92)	0.19	0.87 (0.72-1.06)	0.18	3.9e10 (0-Inf)	1	0.87 (0.60-1.25)	0.45	0.58 (0.34-0.98)	0.04	1.64 (0.96-2.8)	0.07
CYTOX	0.99 (0.83-1.19)	0.93	6.98 (0.61-80.09)	0.12	0.96 (0.79-1.18)	0.73	850 (0-Inf)	1	1.14 (0.76-1.71)	0.51	0.59 (0.35-1.00)	0.05	1.21 (0.70-2.09)	0.49
TH	1 (0.85-1.18)	0.99	2.15 (0.78-5.94)	0.14	0.97 (0.81-1.17)	0.76	48000 (0-Inf)	1	1.03 (0.74-1.45)	0.84	0.53 (0.28-1.01)	0.05	1.40 (0.85-2.31)	0.19
Cytotoxic-Th1	1.1 (0.81-1.47)	0.59	8.96 (0.39-204)	0.17	1.10 (0.77-1.57)	0.60	3.2e8 (0-Inf)	1	1.24 (0.62-2.48)	0.54	0.34 (0.11-1.06)	0.06	1.27 (0.54-2.98)	0.58
IFNA1,IFNA5,IFNGR1,MIC A,MICB,IRF1, GNLY,IFNG,GZMA,ITGAE,P RF1	0.95 (0.78-1.15)	0.60	1.92 (0.74-4.99)	0.18	0.91 (0.74-1.12)	0.39	3.2e6 (0-Inf)	1	0.77 (0.48-1.21)	0.26	0.59 (0.28-1.23)	0.16	1.51 (0.91-2.50)	0.11
Immunoscore-like	0.93 (0.76-1.13)	0.45	1.94 (0.72-5.24)	0.19	0.88 (0.71-1.10)	0.26	1.3e10 (0-Inf)	1	0.73 (0.46-1.16)	0.18	0.51 (0.22-1.20)	0.12	1.51 (0.91-2.51)	0.11
CD3,CD8A	0.82 (0.68-0.99)	0.04	1.63 (0.73-3.65)	0.24	0.78 (0.64-0.96)	0.02	41000 (0-Inf)	1	0.73 (0.44-1.21)	0.22	0.57 (0.34-0.95)	0.03	1.13 (0.70-1.84)	0.62
CD8A,PTPRC,GZMB,MS4A 1	0.81 (0.65-1.01)	0.07	1.81 (0.70-4.73)	0.22	0.77 (0.60-0.97)	0.03	2.7e6 (0-Inf)	1	0.67 (0.37-1.23)	0.20	0.51 (0.27-0.98)	0.04	1.11 (0.63-1.96)	0.72
Immunoscore-like	0.85 (0.69-1.05)	0.13	1.74 (0.71-4.26)	0.23	0.81 (0.64-1.01)	0.06	170000 (0-Inf)	1	0.59 (0.32-1.08)	0.09	0.49 (0.23-1.05)	0.07	1.22 (0.73-2.06)	0.45
CD3,CD8A,PTPRC,GZMB, MS4A1	0.85 (0.67-1.07)	0.17	1.91 (0.68-5.36)	0.22	0.79 (0.62-1.02)	0.08	8.5e6 (0-Inf)	1	0.53 (0.26-1.06)	0.07	0.47 (0.19-1.13)	0.09	1.21 (0.67-2.18)	0.53
Immunoscore-like														
CD3,CD8A,PTPRC,GZMB, MS4A1,CD68														

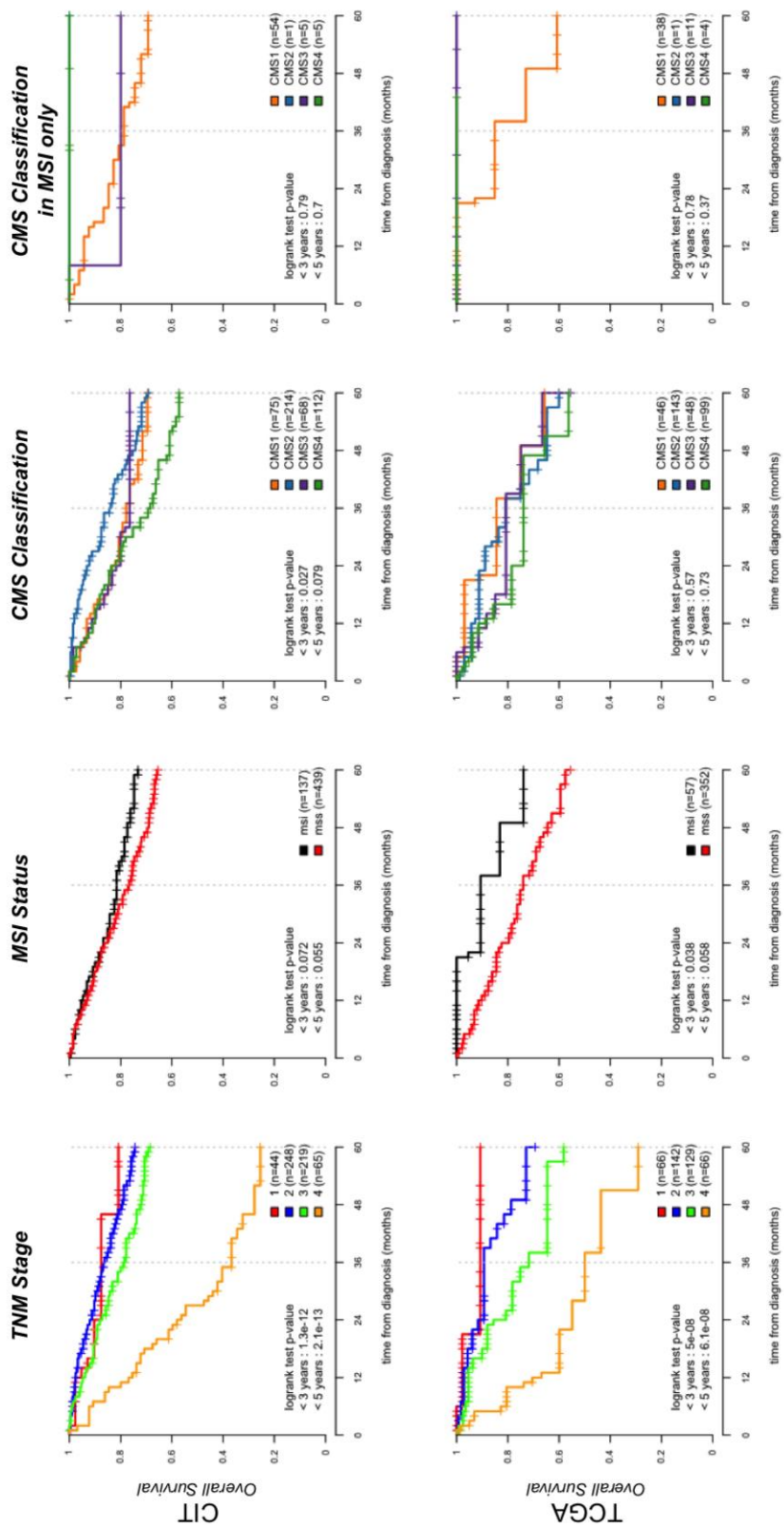
*Immune metagenes and different versions of the Immunoscore® along publications are given. V = version; CRC = Colorectal cancer; MSI = Microsatellite instable; MSS = Microsatellite stable; ICK = Immune checkpoint metagene; CTL = tumor-infiltrating T cells metagene; CTL =

Cytotoxic T lymphocytes metagene; CYTOX = Cytotoxicity metagene; TH= T helper 1 cells metagene; CMS = Consensus Molecular Subtypes; HR = Hazard Ratio; CI = Confidence Interval
† Two-sided Wald test *p*-value for each hazard ratio estimated by univariate Cox proportional hazards regression model, adjusted for TNM stage, when independent CIT and TCGA cohort analysis. For CIT and TCGA combined analysis, cohort independent HR were pooled and *p*-value estimated using the generic inverse variance meta-analysis method (see supplementary materials and methods for details).

Supplementary Figures

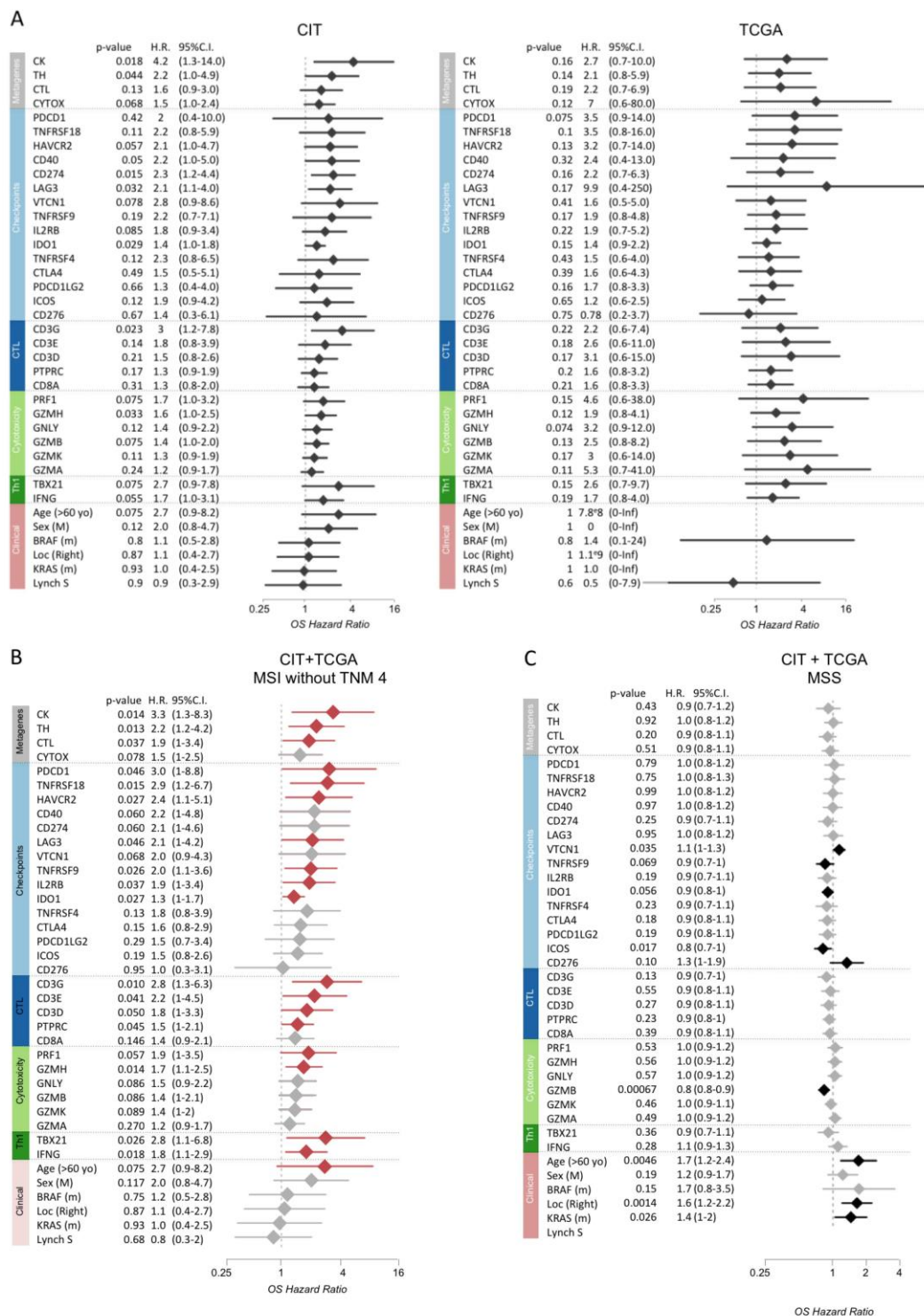


Supplementary Figure 1. NT-relative expression of immune checkpoint genes. For each of 19 ICK genes, the expression fold-change between its median value in MSI tumors and NT (red square) and MSS tumors and NT (blue square) is shown for the CIT (left) and TCGA (right) series. Genes are vertically ordered according to MSI vs NT fold change in the CIT series. The vertical dash line delineates a fold change of 1. The four genes down-regulated in MSI CRC (fold change < 1) in both series (BTLA, CD28, C10orf54, CD27) were eliminated from further analyses. MSI = Microsatellite unstable; MSS = Microsatellite stable; NT = Normal tissue



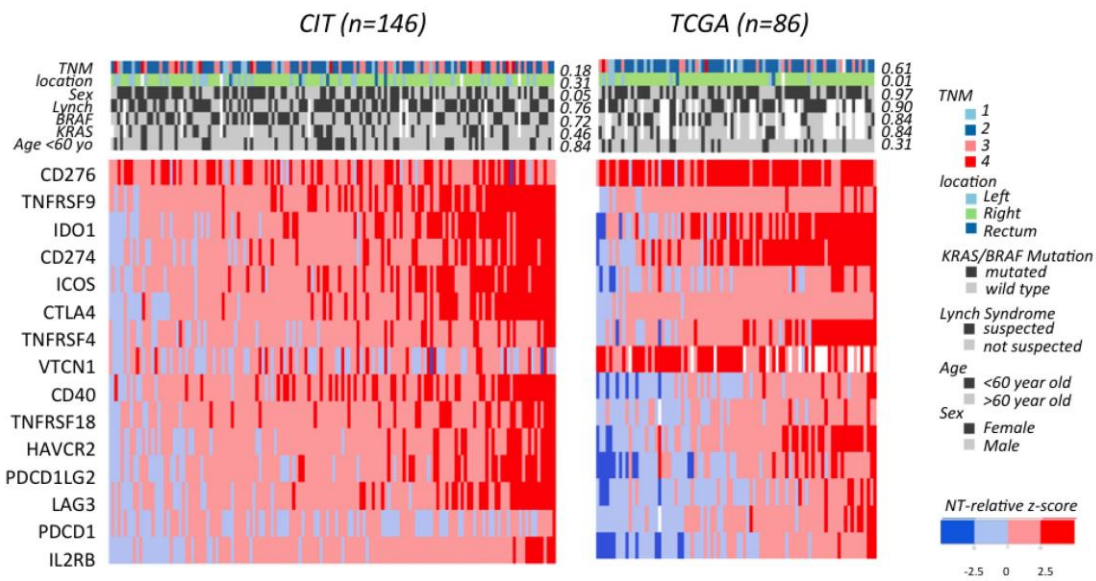
Supplementary Figure 2. Overall survival according to staging, MSI status and CMS classification in both CIT and TCGA series.

Overall survival curves were obtained using Kaplan-Meier estimates. Differences between curves were assessed using the log-rank test with a end point at 3 and 5 years. All statistical tests were two-sided. MSI = Microsatellite instability; CMS = Consensus molecular subtypes.

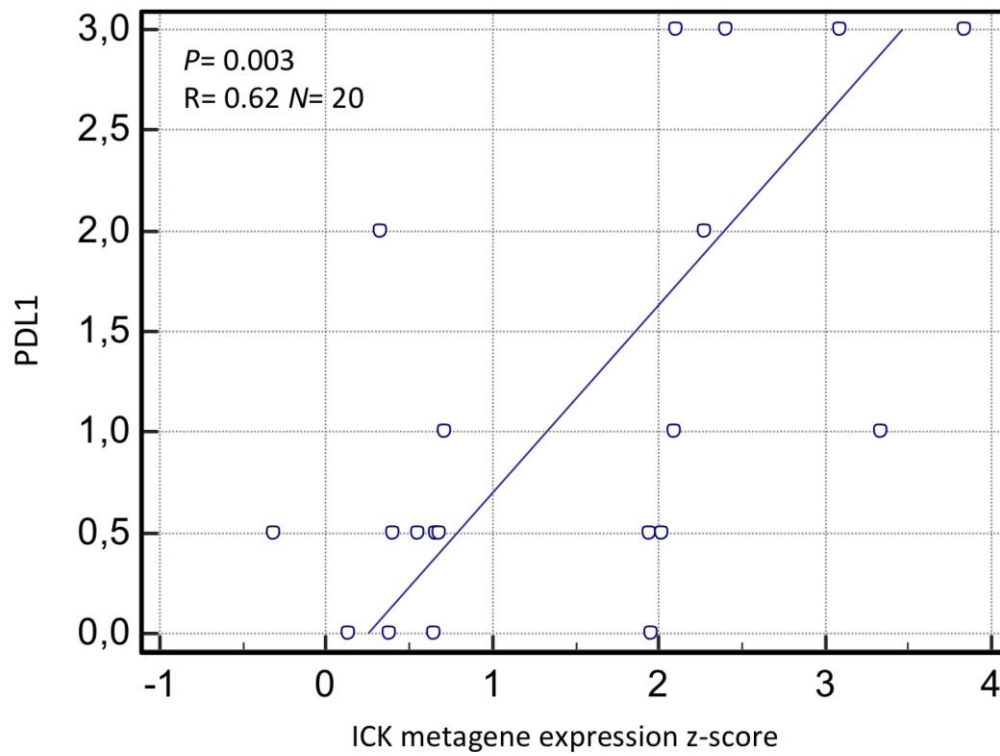


Supplementary Figure 3. Prognostic values of immune gene/metagene expression and of clinical factors in MSI tumors in CIT and TCGA cohorts independently and in CRC subgroups **A)** Overall survival TNM-Adjusted forest plots of immune genes within MSI CRC patients from the CIT and TCGA cohorts. **B)** TNM-Adjusted forest plots of immune genes in MSI CRC from the CIT + TCGA cohorts discarding metastatic patients. **C)** TNM-Adjusted forest plots of immune genes in MSS CRC from the CIT + TCGA cohorts. Diamonds represent hazard ratios

and bars the 95% confidence intervals. Red indicates a worse prognosis hazard ratio with a Wald test p -value <0.05 . All statistical tests were two-sided. MSI = Microsatellite Instable; MSS= MicroSatellite Stable; TNM 4 = TNM stage 4 metastatic tumors.



Supplementary Figure 4. Associations between overexpression of ICK genes expression and clinical annotations. Heatmap of ICK gene expression z-scores in MSI tumor samples in CIT (left) and TCGA (right) series ordered by the ICK metagene. Clinical variables are shown at the top with two-sided Anova test *p*-values. TNM = Tumor Node Metastasis Stages; BRAF/KRAS = BRAF/KRAS mutation status.



Supplementary Figure 5. Correlation between PD-L1 protein expression (IHC) and ICK metagene expression (microarray) in MSI CRC. Pearson coefficient correlation two-sided test was performed. R = correlation coefficient; N = number of samples.

2. Revue de la littérature publiées

Le travail effectué sur les CCR métastatiques MSI nous a amené à faire une revue systématique de la littérature sur ce sujet. Trois manuscrits ont ainsi été publiés dans le cadre de notre thèse.

a) Intérêt thérapeutique des statuts BRAF et MMR

Dans cette revue de la littérature publiée au moment de la première publication montrant l'efficacité de l'immunothérapie dans les cancers MSI [12], nous étudions l'état des connaissances concernant l'impact pronostique et prédictif du statut MMR et également de la mutation V600E de *BRAF* dans les cancers colorectaux localisés et métastatiques.

Cette revue a été publiée dans le *Bulletin du Cancer* [194] : Cohen R, Cervera P, Svrcek M, et al (2015) [DNA mismatch repair and BRAF status in colorectal cancer: Interest for the therapeutic management?]. Bull Cancer (Paris) 102:S72-81

Statuts MMR et BRAF dans les cancers colorectaux : intérêts pour la prise en charge thérapeutique ?

Romain Cohen^{1,3}, Pascale Cervera¹, Magali Svrcek^{1,2}, Clément Dumont¹, Marie-Line Garcia¹, Benoist Chibaudel^{3,5}, Aimery de Gramont^{3,5}, Marc Pocard^{6,7}, Alex Duval², Jean-François Fléjou^{1,4}, Thierry André^{1,4}

Reçu le 2 avril 2015
Accepté le 9 avril 2015

1. Service d'oncologie médicale, Hôpitaux universitaires de l'Est Parisien (AP-HP), Site Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France
2. Inserm, Unité mixte de recherche scientifique 938, Centre de recherche Saint-Antoine, Équipe Instabilité des microsatellites et cancers, Équipe labellisée par la Ligue nationale contre le cancer, Paris, France
3. Groupe coopérateur multidisciplinaire en oncologie (GERCOR), Paris, France
4. Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris VI, Paris, France
5. Institut hospitalier franco-britannique, 4 rue Kléber, 92300 Levallois-Perret, France
6. Hôpital Lariboisière, Paris, France
7. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, CART, Inserm U965, Paris, France

Correspondance :

Thierry André, Service d'oncologie médicale, Hôpitaux universitaires de l'Est Parisien, Site Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France.
thierry.andre@sat.aphp.fr

Mots clés

Cancer colorectal
Statut microsatellite
BRAF
Traitement adjuvant
Thérapies ciblées

Keywords

Colorectal cancer
Mismatch repair system
BRAF
Adjuvant treatment
Targeted therapies

■ Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est responsable du 2^e plus grand nombre de décès par cancer en France. Dans la nouvelle classification moléculaire du CCR, les tumeurs présentant une mutation activatrice de *BRAF* et celles associées à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (dMMR) sont réunies en un groupe caractérisé par une survie sans récurrence prolongée et à l'inverse un pronostic profondément péjoratif en cas de récurrence. L'objectif de cette revue est de mettre en avant les caractéristiques pronostiques et prédictives des statuts MMR et *BRAF*, aux stades localisé et métastatique. Nous expliquerons en quoi le ciblage des *checkpoints* immunologiques représente un espoir thérapeutique pour les patients avec CCR dMMR. Un intérêt particulier sera porté à la prise en charge thérapeutique des CCR avec la mutation V600E de *BRAF*. Nous mettrons également l'accent sur la prise en charge des CRC métastatiques *BRAF* mutant, avec un intérêt particulier pour les thérapies ciblées.

■ Summary

DNA mismatch repair and BRAF status in colorectal cancer: Interest for the therapeutic management?

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related mortality in France. Recently, colorectal cancer subtyping consortium (CRCSC) identified 4 consensus molecular subtypes (CMS). CMS1 is enriched for CRC with deficient DNA mismatch repair system (dMMR) and tumors with mutated *BRAF*. Intriguingly, CMS1 is characterized by better relapse-free survival but worse survi-

val after relapse, compared with the other subtypes. In this review, we provide a comprehensive overview of prognostic and predictive impacts of MMR and *BRAF* status. We highlight immune checkpoints inhibitors as potentially future therapeutics for CRC with deficient MMR. We also focus on the management of *BRAF* mutant metastatic CRC, with a particular interest on targeted therapies.

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est responsable du 2^e plus grand nombre de décès par cancer en France (INCa 2013). L'hétérogénéité moléculaire des tumeurs de patients avec un CCR représente une difficulté importante dans l'avancement de la recherche sur cette maladie. C'est à ce défi majeur qu'a essayé de répondre un consortium international d'experts en présentant lors du congrès de la Société américaine de cancérologie de 2014 une classification moléculaire commune du CCR [1]. À partir de 4 562 tumeurs de stades I à V, ce groupe a réussi à dégager 4 grands sous-types de CCR (CMS1-4 : *Consensus molecular subtypes*), caractérisés par des facteurs moléculaires, biologiques et cliniques, et des pronostics particuliers (tableau I).

De cette classification se dégage le CMS1, qui regroupe les patients atteints de CCR associés à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (dMMR) et à une mutation V600 du proto-oncogène *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). Ce groupe présente un profil pronostique particulièrement intrigant. Il est en effet associé à la

meilleure médiane de survie sans récurrence (SSR) des 4 groupes mais, à l'inverse, à la médiane de survie après rechute (SAR) la plus défavorable.

L'objectif de cette revue est de faire la synthèse des connaissances actuelles sur l'impact pronostique et prédictif du statut MMR et du statut *BRAF* dans le CCR. Nous repositionnerons ainsi cette maladie dans son contexte moléculaire afin d'envisager différentes perspectives vers une prise en charge spécifique et orientée des patients.

Instabilité des microsatellites

Système MMR

L'instabilité microsatellite (MSI : *MicroSatellite Instability*) correspond à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (dMMR : *deficient Mismatch Repair*), responsable d'un raccourcissement de séquences d'ADN hautement répétées appelées microsatellites. La déficience MMR est secondaire à une inactivation épigénétique du gène MMR *MLH1* (*MutL homolog 1*) dans la grande majorité des formes sporadiques de CCR, ou à une inactivation d'un gène MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) par mutation germinale correspondant aux 2 à 5 % de CCR liés au syndrome de prédisposition au cancer dit syndrome de Lynch [2]. Les CCR dMMR présentent des caractéristiques clinico-pathologiques particulières. Généralement situées au niveau du côlon droit, ce sont des tumeurs peu différenciées, souvent mucineuses avec une importante infiltration lymphocytaire péri- et intra-tumorale. Les CCR dMMR sont retrouvés dans 15 à 20 % des CCR localisés ; ce sont plus souvent des tumeurs de stade II que de stade III. Le phénotype MSI est moins fréquent au stade IV, représentant environ 3 à 5 % des CCR métastatiques. Cette fréquence pourrait être plus importante en cas de carcinose péritonéale.

La détermination du statut MSI a un objectif double : en premier lieu l'identification des patients atteints d'un syndrome de Lynch, secondairement, la caractérisation du pronostic des patients atteints de CCR. C'est dans ce cadre qu'avaient été élaborées les recommandations de Bethesda en 1998, révisées en 2004 [3,4]. Jugés trop complexes, les critères de Bethesda sont également modérément sensibles. Comparés à des stratégies de test systématique sur tous les patients, il a été montré que 12 à 28 % des cas de syndrome de Lynch identifiés auraient été manqués avec les critères de Bethesda révisés [2,5]. Les dernières recommandations publiées par un groupe d'experts européens proposent de tester les CCR de tous les patients de moins de

TABLEAU I
Classification moléculaire des cancers colorectaux d'après la présentation de Rodrigo Dienstmann, ASCO 2014 [1]

CMS1	13 %	MSI, hypermuté, <i>BRAF</i> muté, activation immunitaire, sexe féminin, âge élevé, côlon droit	Meilleure SSR SG intermédiaire Mauvaise SAR
CMS2	35 %	MSS, CIN <i>high</i> , TP53 muté, côlon gauche, EGFR surexprimé/amplifié, activation de la voie WNT/CMYC	SSR intermédiaire Meilleure OS Meilleure SAR
CMS3	11 %	Épithélial, MSI/CIN, KRAS muté, MYC amplifié, IGF1R2 surexprimé	SSR, OS et SAR intermédiaires
CMS4	20 %	Jeune âge, stades III/IV, CIN/MSI, TGFβ/VEGF activés, NOTCH3 surexprimé	Mauvaise SSR Mauvaise OS SAR intermédiaire
Inclassés	21 %		SSR, OS et SAR intermédiaires

CMS : *Consensus Molecular Subtype*

70 ans [6]. Ce test doit être réalisé par PCR pentaplex sur un panel de 5 microsatellites quasi monomorphiques (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, et NR-27) [7], ou bien par immunohistochimie des 4 protéines du système MMR, les deux systèmes étant hautement concordants.

Impact pronostique positif du statut dMMR aux stades localisés indépendamment de la chimiothérapie par fluoropyrimidines

Aux stades localisés (stades I à III), les CCR dMMR sont de meilleur pronostic que les CCR pMMR (*proficient Mismatch Repair*). 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 [8]. L'étude complémentaire de Sargent et al. validait ces résultats avec des HR à 0,46 pour la survie sans maladie et à 0,51 pour la SG ; ces tendances perdaient cependant leur significativité en analyse multivariée [9].

En 2011, l'étude de Sinicrope analysait 2 141 patients inclus dans différents essais randomisés de chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidines. En analyse multivariée, les 344 patients avec une tumeur dMMR avaient une SSR et une SG significativement prolongées (HR 0,80 et 0,79, respectivement) par rapport au groupe pMMR [10]. Ces résultats étaient retrouvés chez les patients traités et non traités avec des tumeurs dMMR de stade II et de stade III, résultats confirmés spécifiquement pour le groupe des stades II par l'étude QUASAR où 10 % des patients avec tumeur dMMR ont eu un événement (rechute ou décès) *versus* 27 % pour les patients pMMR ($p < 0,00001$) [11]. Dans cette étude, le statut dMMR était un facteur de bon pronostic avec un HR à 0,32 (0,15-0,69 ; $p < 0,001$).

L'étude PETACC-3, qui a analysé les CCR de stades II et III, a confirmé le caractère pronostique positif du statut MMR [12]. Cet impact pronostique est majeur pour les tumeurs de stade II, sur la SSR (HR 0,26 ; IC 95 % 0,10-0,65) et la SG (HR

0,16 ; 0,04-0,64). Pour les stades III, il reste significatif sur la SSR (HR 0,67 ; 0,46-0,99), mais pas sur la SG (HR 0,70 ; 0,44-1,09) [13]. Sinicrope et al. ont montré que l'impact pronostique du statut MMR est fonction de la localisation de la tumeur primitive de patients avec CCR stade III. Dans cette étude, le statut dMMR avait un impact pronostique négatif pour les patients avec tumeur du côlon gauche sur la SSR (HR 1,75 ; $p = 0,03$) et la SG (HR 1,85 ; $p = 0,05$). Le statut dMMR avait un impact pronostique positif pour les tumeurs du côlon droit, sur la SSR (HR 0,71 ; $p = 0,018$) et la SG (HR 0,71 ; $p = 0,030$) [14,15].

Valeur prédictive du statut MMR aux stades localisés

Intérêt du 5-fluorouracile

Le caractère prédictif du statut MMR quant à l'efficacité des chimiothérapies adjuvantes contenant du 5-fluorouracile a été complexe à appréhender. Tout d'abord, l'analyse de Ribic ($n = 570$) a montré que les patients avec des tumeurs pMMR de stades II et III avaient une meilleure SSR et survie globale lorsqu'ils recevaient une chimiothérapie adjuvante par fluoropyrimidine (HR 0,69 ; $p = 0,002$), contrairement au groupe dMMR (HR 2,17 ; $p = 0,10$) [8]. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de Sargent sur une cohorte plus importante ($n = 1 027$), analyse qui retrouvait en outre une diminution de la SSP chez les patients traités du groupe des CCR dMMR de stade II (HR 2,30 ; $p = 0,09$), mais pas pour les stades III (HR 1,01 ; $p = 0,98$). La survie des patients avec tumeur dMMR de stade II traitée par fluoropyrimidines était statistiquement diminuée par rapport à ceux n'ayant pas reçu de chimiothérapie (HR 2,95 ; $p = 0,04$) [9].

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 (*tableau II*). Dans le groupe chirurgie seule, cette étude confirme le caractère de bon pronostic du statut dMMR sur la SSR et la SG pour les stades II ($n = 307$) et III ($n = 264$). Dans le groupe chirurgie suivie d'une chimiothérapie contenant une fluoropyrimidine, dMMR reste un facteur de bon pronostic mais avec des *hazard ratios* plus faibles, non significatifs [16]. Cette

TABLEAU II
Résultats de la méta-analyse ACCENT (*Adjuvant Colon Cancer Endpoints*), d'après Dan Sargent, ASCO 2014 [16]

		SSR à 5 ans			SG à 5 ans		
		dMMR	pMMR		dMMR	pMMR	
Stades II	Chirurgie (n = 307)	89 %	74 %	HR 0,27 $p = ,012$	90 %	78 %	HR 0,27 $p = ,011$
	5-FU (n = 1 155)	88 %	83 %	HR 0,81 $p = ,28$	88 %	87 %	HR 0,87 $p = ,47$
Stades III	Chirurgie (n = 264)	60 %	47 %	HR 0,59 $p = ,16$	59 %	54 %	HR 0,69 $p = ,28$
	5-FU (n = 2 723)	72 %	64 %	HR 0,80 $p = ,025$	77 %	71 %	HR 0,79 $p = ,097$

SSR : survie sans rechute ; SG : survie globale ; dMMR : *deficient Mismatch Repair* ; pMMR : *proficient Mismatch Repair*

étude permet d'affirmer que le statut dMMR est un facteur pronostique chez les patients non traités par chimiothérapie, avec une valeur pronostique beaucoup plus importante pour les stades II que pour les stades III. Ce statut a également une valeur pronostique chez les patients de stade II ou III traités par fluoropyrimidines, mais moins importante. 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 a pas d'indication à une chimiothérapie par fluoropyrimidines en raison de leur pronostic excellent et de l'absence d'impact de la chimiothérapie adjuvante dans cette situation. Le statut dMMR n'a à ce jour pas démontré son intérêt dans l'indication d'un traitement adjuvant dans les stades III.

La distinction qu'a apportée Sinicrope entre tumeurs dMMR sporadiques et liées au syndrome de Lynch permet de nuancer ces résultats [10]. Il a en effet 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 (HR 0,31 ; $p = 0,006$), tandis que les patients avec une inactivation somatique du système MMR ne présentaient pas d'amélioration de la DFS avec le 5-fluorouracile (HR 1,50 ; $p = 0,182$). 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 syndrome HNPCC. Ces résultats nécessitent d'être confirmés.

Intérêt de l'oxaliplatine

La problématique du bénéfice apporté par l'ajout de l'oxaliplatine en situation adjuvante selon le statut MMR a été initialement soulevée par Zaanan et al., dans une étude rétrospective, montrant un effet sur la SSR des patients avec un CCR dMMR de stade III traités par folfox [17]. Une seconde étude française a repris 433 CCR dMMR dont 186 tumeurs de stade III, traitées par 5-FU seul ou folfox [18]. En analyse multivariée, l'ajout de l'oxaliplatine était associé à une amélioration significative de la SSR (HR 0,29 ; $p = 0,003$). Le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine était retrouvé de manière significative dans les tumeurs de stade III (HR 0,39 ; $p = 0,0014$) et avec une tendance forte dans les stades II de haut risque (HR 0,141 ; $p = 0,549$).

L'analyse de l'essai MOSAIC, qui a démontré la supériorité du FOLFOX4 sur le LV5FU2 sur la SSR et la SG pour les CC réséqués de stade II ou III a permis de suggérer l'intérêt du folfox pour les tumeurs dMMR [19,20]. Les résultats à 10 ans de cette étude ($n = 1\ 008$) sur les 95 patients dMMR sont en faveur de l'oxaliplatine sur la SSR (HR 0,48 ; IC 95 % 0,207-1,16) et la SG (HR 0,41 ; IC 95 % 0,16-1,07), mais le nombre de patients dMMR dans cette étude est insuffisant pour être statistiquement significatif [20]. Dans les études C-07 et C-08 du NSABP, le statut MMR n'était pas prédictif de l'efficacité de l'oxaliplatine, mais avec un manque de puissance important (seulement 12 et 16 rechutes dans les groupes dMMR des études C-07 et C-08, respectivement) [21,22]. Une analyse poolée de l'étude MOSAIC et de l'étude C-07 est en cours pour essayer d'apporter une réponse avec une puissance statistique suffisante.

CCR dMMR de stade IV

En situation métastatique, l'impact du statut MMR est resté longtemps incertain. Si la faible fréquence des CCR dMMR de stade IV (3 à 5 %) confirme le faible pouvoir métastasiant de ces tumeurs, elle n'en rend que plus difficile l'évaluation du caractère pronostique de ce statut à ce stade de la maladie. Par ailleurs, les protocoles de chimiothérapies validés en situation métastatique comportant systématiquement du 5-fluorouracile, il n'est pas méthodologiquement possible ni cliniquement pertinent d'évaluer la valeur prédictive du statut MMR concernant l'efficacité du 5-FU.

Les résultats des premières études publiées s'intéressant à l'impact pronostique du statut MMR dans les CCR de stade IV étaient non concordants ou non concluants (tableau III), du fait de faibles échantillons [23-26]. L'étude de Venderbosch et al. a permis de clore le débat en démontrant le caractère pronostique péjoratif du statut dMMR en situation métastatique [27]. Parmi les 3 063 patients inclus dans 4 études de phase III en 1^{re} ligne métastatique, 153 patients avaient une tumeur dMMR (5 %), patients dont la SSP et la SG étaient significativement réduites par rapport aux patients pMMR (HR 1,33 ; IC 95 % 1,12-1,57 et HR 1,35 ; IC 95 % 1,13-1,61, respectivement).

Heat Shock Protein 110

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 [28,29]. Dans les tumeurs dMMR, HSP110 est systématiquement muté 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 dont la taille corrèle avec la synthèse d'un ARN messager délété au niveau de l'exon 9, nommé HSP110 DE9, au détriment de la synthèse d'un ARN messager sauvage (HSP110 wt). La protéine HSP110 DE9 joue le rôle de dominant négatif inhibant l'activité de la chaperonne HSP110 sauvage *via* une interaction directe [30]. La mutation d'HSP110 dans les tumeurs dMMR

TABLEAU III
Valeur pronostique du statut *MisMatch Repair* pour les patients avec cancer colorectal de stade IV

Auteur	N (dMMR/ pMMR)	Survie globale
Brueckl et al. [23]	43 (7/36)	33 vs 19 mois ($p = ,021$)*
Des Guetz et al. [24]	40 (9/31)	16 vs 22,5 mois ($p = ,16$)
Koopman et al. [25]	515 (18/497)	10,2 vs 17,9 mois ($p = ,41$)
Tran et al. [26]	350 (40/310)	11,1 vs 22,1 mois ($p = ,001$)*
Venderbosch et al. [27]	3 063 (153/2 910)	13,6 vs 16,8 mois ($p = ,001$)*

* : statistiquement significatif

semble associée à un meilleur pronostic chez les patients ; en outre, elle confère une sensibilité accrue au 5-FU des cellules tumorales. Dans une série de 329 tumeurs dMMR de stade II ou III, la présence de larges délétions de *Hsp110* T17 était associée à une efficacité de la chimiothérapie adjuvante (HR 0,16 ; $p = 0,03$) [31]. D'autres études seront nécessaires afin de mieux appréhender ce biomarqueur potentiel et l'intégrer dans la pratique clinique.

Immune checkpoints et CCR dMMR

La déficience du système MMR n'est pas un événement transformant *per se*, mais elle facilite l'accumulation d'erreurs de réplication. Ce fort taux mutationnel des tumeurs dMMR, environ 10 à 50 fois plus élevé que dans les tumeurs pMMR, induit la création de très nombreux néo-antigènes tumoraux [32]. Ces néo-antigènes pourraient être l'une des explications de l'importante infiltration lymphocytaire caractéristique des tumeurs dMMR. Il a été démontré que les signes de réponse immunitaire intra-tumorale étaient associés à l'absence d'invasion métastatique précoce (critères VELIPI : embolus veineux et lymphatiques, invasion périnerveuse) et à une amélioration de la SSR et de la SG [33]. La présence de lymphocytes T régulateurs (Treg) intra-tumoraux est ainsi de bon pronostic, notamment dans les CCR dMMR [34,35]. Ces résultats sont particulièrement intéressants car les Treg, associés aux tumeurs sont classiquement considérés de mauvais pronostic dans les autres localisations tumorales, ce d'autant que les Treg inhibent la réponse immunitaire. Des investigations sont en cours pour explorer l'impact des Treg sur le microenvironnement tumoral et la progression tumorale. Par ailleurs, il est possible de quantifier cette infiltration immunitaire *in situ* pour compléter la classification TNM actuelle [36]. Il faut également noter que le nombre de ganglions retrouvés lors de l'examen macroscopique des pièces d'exérèse de CCR localisés est plus important pour les tumeurs dMMR que les tumeurs pMMR, et que ce nombre influe sur le pronostic des patients [37-40].

Malgré cette réponse immunitaire, des tumeurs dMMR apparaissent, suggérant une résistance tumorale adaptative spécifique à ce microenvironnement immun. Llose et al. ont récemment montré que les CCR dMMR présentent de manière spécifique une surexpression de multiples *immune checkpoints*. Parmi ceux-ci, sont retrouvés PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 et IDO, 5 *immune checkpoints* pour lesquels des inhibiteurs sont développés en clinique [41]. Le groupe des CCR dMMR semble donc être une cible prometteuse de l'immunothérapie.

Les anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 ont démontré leur efficacité dans différentes pathologies cancéreuses (mélanome, cancer bronchique, cancer de la vessie, lymphome de Hodgkin...). Les premiers essais thérapeutiques testant les anticorps anti-PD-1 et PD-L1 dans le CCR ont été décevants [42,43]. Les CCR dMMR représentent environ 5 % de l'ensemble des CCR de stade IV ; il est donc possible que très peu de tumeurs dMMR aient été traitées dans ces essais, ne permettant d'évaluer ce type de thérapeutique dans ce groupe de patient.

Deux anticorps ciblant PD-1, le pembrolizumab et le nivolumab, seul ou associé à l'ipilimumab (anticorps anti-CTLA4), sont en cours d'évaluation spécifiquement chez les patients avec des CCR métastatiques dMMR (NCT01876511, NCT02060188).

BRAF Dans le cancer colorectal

Épidémiologie

BRAF est une kinase clé de la voie de signalisation des MAP kinases. Elle a pour fonction d'induire la phosphorylation et donc l'activation de MEK en aval. La mutation V600E, correspondant au remplacement d'une valine par un acide glutamique au niveau du domaine kinase, entraîne l'activation constitutive de BRAF. Cette mutation faux-sens, retrouvée dans environ 60 % des mélanomes, est prédictive de réponse aux inhibiteurs de BRAF, tels que le vémurafénib [44]. Dans le cadre du CCR, des mutations de BRAF sont retrouvées dans environ 10 % des tumeurs, tous stades confondus. Il s'agit de la mutation V600E dans l'immense majorité des cas. D'autres mutations peuvent être retrouvées, mais leur valeur pronostique est inconnue [45]. BRAF V600E est retrouvée préférentiellement dans les tumeurs dMMR (20-70 % des tumeurs dMMR versus 5-10 % des tumeurs pMMR). Elle signe de manière quasiment certaine l'origine sporadique des CCR dMMR et peut donc être utile dans la recherche d'un syndrome de Lynch [46].

Valeur pronostique en adjuvant

BRAF V600E est retrouvé dans 6 à 15 % des CCR de stade II ou III (*tableau IV*) [11,12,20,47-49]. Les caractéristiques clinico-pathologiques associées au statut BRAF muté sont : sexe féminin, âge avancé, côlon droit, tumeurs indifférenciées, mucineuses, T4, nombre élevé de ganglions analysés, instabilité des microsatellites, méthylation de *MLH1*.

Aucun des essais adjuvants ayant analysé le statut mutationnel BRAF ne retrouve d'impact de BRAF sur la SSR, que ce soit dans

TABLEAU IV
Fréquence de la mutation BRAF V600E dans les cancers colorectaux localisés

Essai	BRAF muté	BRAF sauvage	Pourcentage
PETACC-3 [12]	103	1 307	7,9 %
QUASAR [11]	125	1 459	8 %
Intergroup 0135 [50]	77	490	15,7 %
N0147 [48]	346	2 169	13,8 %
PETACC-8 [47]	150	2 344	6,4 %
NSABP C07 et C08 [21]	176	1 358	11,5 %
MOSAIC [20]	94	808	10,4 %

PETACC : Pan European Trial in Adjuvant Colon Cancer ; QUASAR : Quick And Simple And Reliable study ; MOSAIC : Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer

les études QUASAR, Intergroup 0135 ou MOSAIC [11,20,49]. Dans l'étude MOSAIC, *BRAF* V600E n'était pas non plus pronostique de la SG ; le bénéfice du folfox était conservé chez les patients *BRAF* muté. Cependant, Roth et al. retrouvaient dans l'essai PETACC-3 un impact pronostique significatif de *BRAF* V600E, non pas sur la SSR, mais sur la SG, particulièrement pour les tumeurs pMMR (HR 2,2 ; $p = 0,0003$) [12]. Dans l'analyse de Gavin et al. des essais C-07 et C-08, la survie à la rechute (SAR) était significativement réduite pour les patients avec des tumeurs *BRAF* muté, de même que la SG (HR 2,31 ; $p < 0,0001$ et HR 1,46 ; $p < 0,0002$, respectivement), sans différence retrouvée pour la SSR [21]. *BRAF* V600E semble donc associé à un mauvais pronostic en SG et en SAR, mais pas en SSR. Lorsque ces analyses de survie sont effectuées en classant les patients selon les statuts *BRAF* et MMR, l'impact péjoratif de *BRAF* est particulièrement visible chez les patients pMMR : le groupe pMMR *BRAF* muté est associé au plus mauvais pronostic [21,50,51].

Valeur pronostique en métastatique

Les données apportées par Gavin et al. concernant la SAR montrent clairement l'impact pronostique péjoratif de *BRAF* V600E dans les CCR de stade IV. L'analyse de Venderbosch, qui a poolé les données des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS, a retrouvé 8,2 % de tumeurs *BRAF* muté [27]. La SSP et la SG étaient significativement réduites dans le groupe *BRAF* muté, comparé au groupe *BRAF* sauvage (HR 1,34 ; 1,17-1,54 et HR 1,91 ; 1,66-2,19, respectivement). En classant les patients selon leurs statuts *BRAF* et MMR, la SG médiane varie de 17,3 mois pour le groupe pMMR *BRAF* sauvage à seulement 11,3 mois pour le groupe pMMR *BRAF* muté (HR 1,94 ; 1,57-2,40) et de 15 mois pour le groupe dMMR *BRAF* sauvage à 11,7 mois pour le groupe dMMR *BRAF* muté (HR 1,51 ; 0,93-2,46). Les patients avec des tumeurs *BRAF* muté de stade IV ont ainsi une SG de seulement 11 à 12 mois, quel que soit le statut MMR (HR 1,05 ; 0,68-1,63). L'impact pronostique péjoratif du statut dMMR n'est plus retrouvé lorsque l'on s'intéresse uniquement au groupe *BRAF* sauvage (HR 1,22 ; 0,91-1,65). Il semble donc que l'impact pronostique péjoratif du statut dMMR en situation métastatique soit dépendant du statut *BRAF*.

La prévalence de la mutation *BRAF* V600E rapportée par Venderbosch dans les CCR métastatiques dMMR (34,6 %) est plus importante que pour les CCR localisés (25 % pour l'étude PETACC-3, 30 % pour l'étude QUASAR). Il semble que la fréquence de cette mutation augmente entre les tumeurs dMMR localisées et métastatiques, ce qui pourrait expliquer que l'impact pronostique de *BRAF* ne soit visible qu'au stade métastatique. Par ailleurs, il a été montré que le profil métastatique des tumeurs *BRAF* V600E était différent de celui des tumeurs *BRAF* sauvage. La présence de la mutation *BRAF* V600E est associée à une plus grande fréquence de métastases péritonéales (46 % vs 24 % ; $p = 0,001$) et ganglionnaires à distance (53 % vs 38 % ; $p = 0,008$), et à moins d'atteintes pulmonaires secondaires (35 % vs 49 % ; $p = 0,049$) [26]. Cette différence de sites d'extension métastatique pourrait participer au pronostic péjoratif des tumeurs *BRAF* V600E.

Valeur prédictive du statut *BRAF*

Les mutations *BRAF* et *KRAS* étant presque toujours mutuellement exclusives, il a été suggéré que la mutation *BRAF* V600E soit prédictive de l'absence d'efficacité des thérapies ciblant l'EGFR et donc un outil dans la prise de décision thérapeutique. Cependant, les résultats des études indiquent que *BRAF* V600E n'est pas prédictif de la réponse aux anti-EGFR mais uniquement associé à un pronostic défavorable, indépendamment du statut MMR [52]. Dans l'étude CRYSTAL qui évaluait l'ajout du cétuximab au folfiri en 1^{re} ligne métastatique, l'analyse des 60 patients *BRAF* muté ne révélait pas de différence significative de SSP ou de SG selon le bras de traitement (HR 0,93 ; $p = 0,87$ et HR 0,91 ; $p = 0,74$, respectivement) [53]. Des résultats similaires étaient retrouvés dans l'étude PRIME qui testait le panitumumab en association au folfox [54], et dans l'étude FIRE-3 qui comparait le cétuximab au bévécizumab en association au folfiri [55,56], en 1^{re} ligne (tableau V). Les résultats des études du ciblage de l'EGFR après la 1^{re} ligne confirment que *BRAF* V600E n'est pas prédictif de l'efficacité des anticorps anti-EGFR [57-59]. Le statut *BRAF* ne permet pas de discriminer les patients répondeurs ou non répondeurs aux anti-EGFR au sein des patients RAS sauvage, les HRs semblant cependant meilleurs pour les patients ayant reçu un anticorps anti-EGFR (tableau V).

Compte-tenu du pronostic particulièrement péjoratif des patients avec un CCR métastatique *BRAF* muté et du fait que ces patients ne pourront pas tous recevoir plusieurs lignes thérapeutiques, une intensification thérapeutique d'emblée pourrait être une voie d'approche pragmatique et efficace dans la prise en charge de ces patients. Le protocole folfoxiri associé au bévécizumab a ainsi été évalué en 1^{re} ligne métastatique. Dans une étude de phase II, sur 57 patients, les 10 patients avec un CCR *BRAF* muté avaient une SSP de 12,8 mois et une SG de 23,8 mois [60]. L'analyse poolée de ces patients et d'une cohorte de validation de 15 autres patients traités consécutivement par folfoxiri et bévécizumab retrouvait une SSP de 11,8 mois et une SG de 23,8 mois [61]. Dans l'essai de phase III TRIBE, qui comparait ce protocole au folfiri et bévécizumab, les 28 patients avec une tumeur *BRAF* muté semblaient tirer un bénéfice du traitement intensifié par folfoxiri et bévécizumab, avec une SG passant de 10,8 mois à 19,1 mois (HR 0,55 ; 0,24-1,23) [62,63]. En termes de tolérance, 8,8 % de neutropénies fébriles et 18,8 % de diarrhées de grade 3 ou 4 étaient rapportés dans le groupe expérimental. Il est à noter que ces résultats positifs ont été obtenus à partir d'analyses de sous-groupes, sur de petits effectifs. L'association folfoxiri et bévécizumab est une sérieuse option en 1^{re} ligne de traitement pour les patients avec un CCR métastatique *BRAF* muté.

Le ciblage thérapeutique des CCR *BRAF* muté

La mutation V600E de *BRAF* est associée à un mauvais pronostic, avec des CCR très agressifs. Le ciblage thérapeutique de *BRAF* muté a été démontré efficace dans le mélanome métastatique [44]. Dans le cadre du CCR, le vémurafénib en monothérapie (inhibiteur de *BRAF*) n'a pas démontré son efficacité dans une étude de phase II [64]. Les patients avec CCR porteurs de mutation V600E de *BRAF* semblent avoir une

TABLEAU V
Valeur prédictive de la mutation V600E de *BRAF* pour la réponse aux anticorps anti-EGFR en 1^{re} ligne métastatique

Essai	N patients (% pop totale)	Survie sans progression		Survie globale	
		Médiane, mois	HR (p-value)	Médiane, mois	HR (p-value)
CRYTAL [53]	59 (6,0 %)				
Folfiri	33	5,6		10,3	
Folfiri cétuximab	26	8,0	0,83 (p = 0,87)	14,1	0,91 (p = 0,74)
PRIME [54]	53 (8,3 %)				
Folfox	29	5,4		9,2	
Folfox panitumumab	24	6,1	0,58 (p = 0,12)	10,5	0,90 (p = 0,76)
FIRE-3 [55,56]	48 (8,1 %)				
Folfiri bévacizumab	-	4,9		12,3	
Folfiri cétuximab	-	6,0	0,97 (p = 0,65)	13,7	0,87 (p = 0,65)

résistance aux inhibiteurs de *BRAF*. L'un des mécanismes principaux de résistance des cellules tumorales *BRAF* muté semble passer par la réactivation rapide de la voie des MAP kinases médiée par l'EGFR ; la combinaison d'inhibiteurs de l'EGFR (petite molécule ou anticorps) avec le vémurafénib est fortement synergique, tant *in vitro* qu'*in vivo* [65]. Il a été montré dans le mélanome que l'association du dabrafénib (inhibiteur de *BRAF*) et tramétinib (inhibiteur de MEK) est supérieure au vémurafénib seul [66]. Ces résultats suggèrent qu'une combinaison d'un inhibiteur de *BRAF* et d'une thérapie ciblant la voie des MAP kinases (notamment les inhibiteurs de MEK) pourrait être efficace dans le cadre du CCR *BRAF* muté. D'autres études ont suggéré que l'activation de la voie PI3K/AKT était également une voie de résistance à l'inhibition de *BRAF* [67,68]. Différents essais cliniques évaluant des combinaisons doubles, voire triples, d'inhibiteurs de *BRAF*, d'inhibiteurs de MEK ou d'anticorps anti-EGFR, ou d'inhibiteurs de PI3K (phases 1-2) sont actuellement en cours d'inclusion en France (tableau VI). Les résultats préliminaires de ces différents essais de combinaison sont prometteurs, avec des taux de réponse objective allant de 12 à 50 % (tableau VII). Par ailleurs, une étude internationale de phase II randomisée (promoteur Roche) est en cours avec différents centres participants, en France, évaluant le choix du traitement de maintenance guidé par les biomarqueurs, en 1^{re} ligne métastatique. Après une phase de traitement d'induction par folfox et bévacizumab, les patients avec CCR porteurs d'une mutation *BRAF* V600 seront randomisés entre un traitement d'entretien conventionnel par fluoropyrimidine et bévacizumab ou par vémurafénib, cétuximab et fluoropyrimidine (NCT02291289). Il est utile d'orienter les patients avec des tumeurs *BRAF* muté vers ce type d'essai.

Conclusion

La prise en compte des statuts MMR et *BRAF* dans le CCR permet de distinguer des histoires naturelles différentes et des réponses

TABLEAU VI
Thérapies ciblant *BRAF* V600E, essais cliniques ouverts aux inclusions.

Essai	Type d'essai	Protocole	Centres participant
CLGX818X2103	Phase I-II	LGX818 + cétuximab ± BYL719	1
MEK116833	Phase I-II	Dabrafénib + panitumumab ± tramétinib	2, 3
CLGX818X2101	Phase I	LGX818	1, 3
M028072	Phase II	Vémurafénib	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

D'après le registre des essais cliniques, Institut national du cancer, mars 2015 :

- 1 : Institut Claudius-Regaud, Toulouse
- 2 : Hôpital Saint-Antoine, Paris
- 3 : Gustave Roussy, Villejuif
- 4 : Institut Paoli-Calmettes, Marseille
- 5 : Centre François-Baclesse, Caen
- 6 : Centre Georges-François-Leclerc, Dijon
- 7 : Institut Bergonié, Bordeaux
- 8 : Institut de cancérologie de l'Ouest - Centre René Gauducheau, Saint-Herblain
- 9 : Centre Léon-Bérard, Lyon

différentes aux thérapeutiques anticancéreuses. Pour autant, ces biomarqueurs ont un impact qui reste encore relativement marginal dans la prise de décision médicale, ce qui va probablement être amené à changer dans les années à venir, notamment pour les patients avec un CCR *BRAF* muté. De nombreuses questions restent en suspens et la recherche translationnelle semble être ici d'une nécessité majeure. L'impact clairement péjoratif de *BRAF* V600E au stade métastatique, quel que soit le statut MMR, amène à considérer comme primordial le ciblage thérapeutique de *BRAF*. D'importants efforts de recherche doivent être faits pour comprendre et dépasser les mécanismes de résistance primaire

Statuts MMR et BRAF dans les cancers colorectaux : intérêts pour la prise en charge thérapeutique ?

TABLEAU VII
Essais de phase Ib/II ciblant les CCR BRAF muté, ASCO 2014

Traitements	N	OR (%)	SD (%)	OR + SD (%)
Dabrafénib + tramétinib [69]	43	12	51	63
Dabrafénib + panitumumab [70,71]	15	13	73	86
Dabrafénib + tramétinib + panitumumab [70,71]	15	40	40	80
Vémurafénib + cétuximab [72]	11	-	36	36
Vémurafénib + panitumumab [73]	14	14	57	71
Vémurafénib + cétuximab + CPT11 [74]	8	50	50	100
Encorafénib + cétuximab [75]	26	29	50	79
Encorafénib + cétuximab + BYL719 [75]	26	30	60	90

OR : objective response ; SD : stable disease

observés dans le cadre du CCR traité par les inhibiteurs de BRAF en monothérapie.

Par ailleurs, l'avènement actuel des « checkpoints immunologiques », principalement développés dans le cadre du mélanome, doit être pris en compte dans la recherche sur le CCR. Différents éléments laissent à penser que les CCR dMMR pourraient être un sous-groupe d'intérêt dans le cadre du développement de ces thérapeutiques immunologiques.

Le ciblage de BRAF, l'étude de HSP110 et l'intégration des thérapeutiques immunologiques seront autant de pistes à développer pour améliorer la prise en charge de nos patients.

Déclaration d'intérêts : Thierry André déclare être consultant pour Roche et Amgen, et principal investigateur d'essais cliniques pour Roche, GlaxoSmithKline et Bristol Mayer Squib. Aimery de Gramont déclare board et honoraire de Roche.

Romain Cohen, Pascale Cervera, Magali Svrcek, Clément Dumont, Marie-Line Garcia, Benoist Chibaudel, Marc Pocard, Alex Duval, Jean-François Fléjou déclarant ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, Reynies AD, Roepman P, Sadanandam A, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol* 2014;32:55.
- [2] Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5783-8.
- [3] Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2004;96:261-8.
- [4] Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 2015;15:181-94.
- [5] Moreira L, Balaguer F, Lindor N, de la Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012;308:1555.
- [6] Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013;62:812-23.
- [7] Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004;20:251-7.
- [8] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
- [9] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective Mismatch Repair as a predictive marker for lack of efficacy of Fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.
- [10] Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA Mismatch Repair Status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-Fluorouracil-based adjuvant therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2011;103:863-75.
- [11] Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1261-70.
- [12] Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. 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* 2010;28:466-74.
- [13] Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann Oncol* 2015;26:126-32.
- [14] Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, et al. Prognostic impact of deficient DNA Mismatch Repair in Patients With Stage III Colon Cancer From a Randomized Trial of FOLFOX-Based Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31:3664-72.
- [15] Sinicrope FA, Yoon HH, Mahoney MR, Nelson GD, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. Overall survival result and outcomes by KRAS, BRAF, and DNA mismatch repair in relation to primary tumor site in colon cancers from a randomized trial of adjuvant chemotherapy: NCCTG (Alliance) N0147. *J Clin Oncol* 2014;32:55.
- [16] Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, Tejpar S, Bertagnolli MM, Thibodeau SN, et al. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *J Clin Oncol* 2014;32:55.
- [17] Zaanen A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, de Gramont A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010;21:772-80.
- [18] Tougeron D, Sickersen G, Lecomte T, Mouillet G, Trouilloud I, Coriat R, et al. Impact of adjuvant chemotherapy with 5-FU or FOLFOX in colon cancers with microsatellite instability: An AGEO multicenter study. *J Clin Oncol* 2014;32:55.
- [19] André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-51.

- [20] André T, de Gramont A, Chibaudel B, Tijeras-Raballand A, Duval A, Hickish T, et al. MOSAIC study: Actualization of overall survival (OS) with 10 years follow up and evaluation of BRAF. By GERCOR and MOSAIC investigators. *Ann Oncol* 2014;25(suppl 4):iv167-209.
- [21] Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation Profiling and Microsatellite Instability in Stage II and III Colon Cancer: An Assessment of Their Prognostic and Oxaliplatin Predictive Value. *Clin Cancer Res* 2012;18:6531-41.
- [22] Gavin PG, Paik S, Yothers G, Pogue-Geile KL. Colon Cancer Mutation: Prognosis/Prediction – Response. *Clin Cancer Res* 2013;19:1301.
- [23] Brueckl WM, Moesch C, Brabletz T, Koebnick C, Riedel C, Jung A, et al. Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy. *Anticancer Res* 2003;23:1773-7.
- [24] Des Guetz G, Mariani P, Cucherousset J, Benamoun M, Lagorce C, Sastre X, et al. Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27:2715-9.
- [25] Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;100:266-73.
- [26] Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623-32.
- [27] Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clin Cancer Res* 2014;20:5322-30.
- [28] Slaby O, Sobkova K, Svoboda M, Garajova I, Fabian P, Hrstka R, et al. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol Rep* 2009;21:1235-41.
- [29] Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 2003;10:1777-82.
- [30] Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283-9.
- [31] Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, et al. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil – Based Chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401-11.
- [32] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013;339:1546-58.
- [33] Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654-66.
- [34] Tougeron D, Maby P, Elie N, Fauquembergue É, Le Pessot F, Cornic M, et al. Regulatory T Lymphocytes Are Associated with Less Aggressive Histologic Features in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancers. *PLoS ONE* 2013;8:e61001.
- [35] Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y, et al. Intratumoral CD8 + T/FOXP3 + cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:653-61.
- [36] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014;232:199-209.
- [37] Flejou J, Svrcek M, Parc Y, Lascols O, Colas C, Louvet C, et al. The number of lymph nodes is influenced by the MSI phenotype in resected colorectal cancers (CRC): A study in a large monocentric series. *J Clin Oncol* 2010;28:15s.
- [38] Eveno C, Nemeth J, Soliman H, et al. Association between a high number of isolated lymph nodes in T1 to T4 NOM0 colorectal cancer and the microsatellite instability phenotype. *Arch Surg* 2010;145:12-7.
- [39] Søreide K, Nedrebo BS, Søreide JA, Slewa A, Körner H. Lymph Node Harvest in Colon Cancer: Influence of Microsatellite Instability and Proximal Tumor Location. *World J Surg* 2009;33:2695-703.
- [40] Berg M, Guriby M, Nordgard O, Nedrebo BS, Ahlquist TC, Smaaland R, et al. Influence of Microsatellite Instability and KRAS and BRAF Mutations on Lymph Node Harvest in Stage I – III Colon Cancers. *Mol Med* 2013;286-93.
- [41] Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The Vigorous Immune Microenvironment of Microsatellite Instable Colon Cancer Is Balanced by Multiple Counter-Inhibitory Checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5:43-51.
- [42] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti – PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455-65.
- [43] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti – PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-54.
- [44] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507-16.
- [45] Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418:934-934.
- [46] Capper D, Voigt A, Bozkovova G, Ahadova A, Kickingederer P, von Deimling A, et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer: BRAF V600E Immunohistochemistry in MSI-H Colorectal Cancer. *Int J Cancer* 2013;133:1624-30.
- [47] Taieb J, Taberero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colorectal cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:862-73.
- [48] Gonsalves WJ, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and Tumor Characteristics and BRAF and KRAS Mutations in Colon Cancer, NCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju106.
- [49] French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic Significance of Defective Mismatch Repair and BRAF V600E in Patients with Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:3408-15.
- [50] Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, McCleary NJ, Ng K, Hollis D, et al. Predictive and Prognostic Roles of BRAF Mutation in Stage III Colon Cancer: Results from Intergroup Trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2012;18:890-900.
- [51] Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2013;105:1151-6.
- [52] Thiel A, Ristimäki A. Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of BRAF. *Gastrointest Cancers* 2013;3:281.
- [53] Cutsem EV, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J Clin Oncol* 2011;29:2011-9.
- [54] Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Taberero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2013;369:102334.
- [55] Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1065-75.
- [56] Stintzing S, Jung A, Rossius L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF muta-

- tions in FIRE-3: A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. Eur Cancer Congr 2013;Abstract 17.
- [57] Peeters M, Price TJ, Cervantes Ruiperez A, Sobrero A, Ducreux M, André T, et al. Impact of baseline covariates and prior therapy on the efficacy of second-line panitumumab (pmab) + FOLFIRI vs FOLFIRI treatment. Ann Oncol 2014;25(suppl 4):iv167-209.
- [58] André T, Blons H, Mabro M, Chibaudel B, Bacht JB, Tournigand C, et al. Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. Ann Oncol 2013;24:412-9.
- [59] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol 2010;11:753-62.
- [60] Masi G, Loupakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S, et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. Lancet Oncol 2010;11:845-52.
- [61] Salvatore L, Loupakis F, Cremolini C, Schirripa M, Masi G, Antoniotti C, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. J Clin Oncol 2012;30.
- [62] Loupakis F, Cremolini C, Lonardi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, et al. Subgroup analyses in RAS mutant, BRAF mutant and all-wt mCRC pts treated with FOLFOXIRI plus bevacizumab (bev) or FOLFIRI plus bev in the TRIBE study. J Clin Oncol 2014;32:5s.
- [63] Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. N Engl J Med 2014;371:1609-18.
- [64] Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Lee RJ, et al. PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. J Clin Oncol 2010;28:15s.
- [65] Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature 2012;483:100-3.
- [66] Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. N Engl J Med 2015;372:30-9.
- [67] Mao M, Tian F, Mariadason JM, Tsao CC, Lemos R, Dayyani F, et al. Resistance to BRAF Inhibition in BRAF-Mutant Colon Cancer Can Be Overcome with PI3K Inhibition or Demethylating Agents. Clin Cancer Res 2013;19:657-67.
- [68] Coffee EM, Faber AC, Roper J, Sinnamon MJ, Goel G, Keung L, et al. Concomitant BRAF and PI3K/mTOR Blockade Is Required for Effective Treatment of BRAFV600E Colorectal Cancer. Clin Cancer Res 2013;19:2688-98.
- [69] Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, Infante JR, Hamid O, Messersmith WA, et al. Phase 1-2 trial of the BRAF inhibitor dabrafenib (D) plus MEK inhibitor trametinib (T) in BRAF V600 mutant colorectal cancer (CRC): Updated efficacy and biomarker analysis. J Clin Oncol 2014;32:5s.
- [70] Liu LI, Shi H, Bleam MR, Zhang V, Zou J, Jing J, et al. Antitumor effects of dabrafenib, trametinib, and panitumumab as single agents and in combination in BRAF-mutant colorectal carcinoma (CRC) models. J Clin Oncol 2014;32:5s.
- [71] Bendell JC, Atreya CE, André T, Tabernero J, Gordon MS, Bernards R, et al. Efficacy and tolerability in an open-label phase I/II study of MEK inhibitor trametinib (T), BRAF inhibitor dabrafenib (D), and anti-EGFR antibody panitumumab (P) in combination in patients (pts) with BRAF V600E mutated colorectal cancer (CRC). J Clin Oncol 2014;32:5s.
- [72] Tabernero J, Chan E, Baselga J, Blay JY, Chau I, Hyman DM, et al. VE-BASKET, a Simon 2-stage adaptive design, phase II, histology-independent study in nonmelanoma solid tumors harboring BRAF V600 mutations (V600m): Activity of vemurafenib (VEM) with or without cetuximab (CTX) in colorectal cancer (CRC). J Clin Oncol 2014;32:5s.
- [73] Yaeger RD, Cercek A, O'Reilly EM, Reidy DL, Kemeny NE, Wolinsky T, et al. Pilot study of vemurafenib and panitumumab combination therapy in patients with BRAF V600E mutated metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol (Meeting Abstracts)2015;33(3):suppl 611.
- [74] Hong DS, Morris VK, Fu S, Overman MJ, Piha-Paul SA, Kee BK, et al. Phase 1B study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with BRAF-mutated advanced cancers and metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol (Meeting Abstracts)2014;32(15):suppl 3516.
- [75] Geel RV, Elez E, Bendell JC, Faris JE, Lolkema MPJK, Eskens F, et al. Phase I study of the selective BRAFV600 inhibitor encorafenib (LGX818) combined with cetuximab and with or without the α -specific PI3K inhibitor BYL719 in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer. J Clin Oncol (Meeting Abstracts)2014;32(15):suppl 3514.

b) *Immunothérapie et patients traités pour un cancer MSI*

Dans le cadre de cette revue de la littérature, nous nous sommes intéressés aux conséquences physiopathologiques et aux méthodes diagnostiques du phénotype tumoral MSI, pour s'intéresser ensuite à l'épidémiologie des tumeurs MSI et aux données concernant l'immunothérapie dans ce contexte biologique, pour les cancers colorectaux et les autres cancers fréquemment associés au phénotype MSI.

Cette revue a été publiée dans le *Bulletin du Cancer* [29] : Colle R*, Cohen R*, Cochereau D, et al (2017) Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. Bull Cancer (Paris) 104:42–51



Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability

Raphaël Colle^{1,7}, Romain Cohen^{1,2,3,7}, Delphine Cochereau^{1,3}, Alex Duval^{2,3}, Olivier Lascols⁴, Daniel Lopez-Trabada¹, Pauline Afchain¹, Isabelle Trouilloud¹, Yann Parc^{2,3,5}, Jérémie H. Lefevre^{2,3,5}, Jean-François Fléjou^{2,3,6}, Magali Svrcek^{2,3,6}, Thierry André^{1,2,3}

Received 1st November 2016

Accepted 9 November 2016

Available online: 13 December 2016

1. Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France
2. INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France
3. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France
4. Department of Molecular Biology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France
5. Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France
6. Department of pathology, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Correspondence:

Thierry André, AP-HP, Saint-Antoine hospital, department of medical oncology, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75012 Paris, France.
thierry.andre@aphp.fr

Keywords

Mismatch repair deficiency
Lynch syndrome
Immune checkpoint
Nivolumab
Endometrial cancer
Colorectal cancer

Mots clés

Cancer de l'endomètre
Cancer colorectal
Checkpoint immunitaires
Déficience du système de réparation de l'ADN

Summary

Microsatellite instability (MSI) is a tumor phenotype linked to somatic or germline (Lynch syndrome) inactivating alterations of DNA mismatch repair genes. A broad spectrum of neoplasms exhibits MSI phenotype, mainly colorectal cancer, endometrial cancer, and gastric cancer. MSI tumors are characterized by dense immune infiltration and high load of tumor neo-antigens. Growing evidence is accumulating on the efficacy of immune checkpoint inhibition for patients treated for MSI solid tumors. We present a comprehensive overview of MSI phenotype, its biological landscape and current diagnostic methods. Then we focus on MSI as a predictive biomarker of response to immune checkpoint inhibition in the context of colorectal cancer and non-colorectal tumors.

Résumé

Immunothérapie et patients traités pour cancer avec instabilité des microsatellites

L'instabilité des microsatellites (MSI) est un phénotype tumoral lié à l'inactivation somatique ou constitutionnelle (syndrome de Lynch) des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN. Un

⁷ Equal contribution.

Nivolumab
Syndrome de Lynch

large spectre de localisations tumorales présente un phénotype MSI, principalement le cancer colorectal, le cancer de l'endomètre et le cancer de l'estomac. Les tumeurs MSI sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire important et une charge importante en néo-antigènes tumoraux. Les stratégies thérapeutiques ciblant les points de contrôle immunitaires semblent efficaces chez ces patients. Cette revue de la littérature présente les conséquences physiopathologiques et les méthodes diagnostiques du phénotype tumoral MSI, pour s'intéresser ensuite à l'épidémiologie des tumeurs MSI et aux données actualisées concernant l'immunothérapie chez les patients présentant des tumeurs MSI, cancer colorectal et autres tumeurs solides associées au phénotype MSI.

Introduction

The human tumor phenotype, referred to as microsatellite instability (MSI), is associated with inactivating alterations in mismatch repair (MMR) genes [1-3]. MSI was first observed in inherited tumors associated with Lynch syndrome (LS) and later in sporadic colorectal, gastric and endometrial cancers [4]. The MSI and microsatellite stable (MSS) tumor subtypes are mutually exclusive and represent 15% and 85% of colorectal cancers (CRC), respectively. MSI tumors develop through a distinctive molecular pathway characterized by genetic instability in numerous microsatellite DNA repeat sequences throughout the genome (for review, see [5,6]).

MMR deficiency is not a direct transforming event. Most oncogenic alterations found in MMR-deficient (dMMR) tumors are somatic mutation events that occur as a result of MSI [7-9]. The MSI process is expected to be oncogenic when it affects DNA repeat sequences that have a functional role. Over the past 20 years, studies have reported several loss of function truncating mutations in coding repeats. Mutations in some of these coding repetitive sequences undergo positive selection during tumor development due to the growth advantage they confer to tumor cells. Importantly, the MSI-driven pathway to cancer also leads to the synthesis of aberrant and potentially immunogenic neo-antigens by the tumor cells. A likely consequence is that MSI tumors are highly infiltrated with cytotoxic T cell lymphocytes (CTLs) expressing activation markers, as well as Tc1 and Th1 phenotypes [10]. More generally, elevated expression levels for CTL/Th1/cytotoxicity markers are thought to constitute strong and independent predictors of relapse and overall survival in CRC patients regardless of their molecular phenotype, with a high density of lymphocyte infiltration consistently shown to be a strong indicator for prolonged survival [11].

Two signals are required to initiate an adaptive immune response by T cells: MHC-antigen peptide recognition by the T cell receptor (TCR) and co-stimulation *via* an array of receptors interacting with cognate ligands on antigen-presenting cells (APCs). Signaling *via* inhibitory receptors is necessary to regulate co-stimulatory receptor activity to ensure a measured response. However, during cancer progression, tumor-infiltrating T cells

have been shown to display increased, chronic expression of different negative immune checkpoints (CK) like PD-1, LAG-3, and TIM-3, which cause T cells functional exhaustion and unresponsiveness [12]. These exhausted CD8T cells fail to proliferate in response to antigen and lack critical anticancer effector functions such as cytotoxicity and IFN gamma cytokine secretion [13]. Such data gives the rationale to develop antibodies that target these regulatory molecules. They are called checkpoint inhibitors (CKI) and could boost anticancer immune response. Importantly, the development of monoclonal antibodies (mAb) targeting CKI is going to revolutionize cancer therapy. Recent clinical trials demonstrated that mAb targeting PD-1/PD-L1 could induce a major response in many types of cancers [14]. However, the clinical benefit in most tumor types was only observed in about 20% of patients, thus leading to the development of comprehensive studies, which could explain differences between responders and non-responders and help generate predictive biomarkers for response to these therapies. Some reports suggest a better efficacy in tumors expressing PD-L1 and infiltrated by myeloid cells. Although PD-L1 is a predictive marker of efficacy for anti-PD-1/PD-L1 therapies, it is not an ideal marker because of poor sensitivity and specificity. Rivzi et al. made the important observation that, in lung cancer, tumors with high rates of mutation and high rates of neo-antigens share better sensitivity to PD-1 mAb [15].

Recently, it was shown that MSI tumors were likely to persist in their hostile immune microenvironment because of immunoevasion and dramatic co-overexpression of CK-related proteins [16]. Based on these findings, in 2015, Le et al. evaluated the clinical activity of an anti-PD-1 CKI (pembrolizumab) in a cohort of metastatic carcinoma patients with or without MSI [17]. The results of this phase 2 study, together with results from another phase 2 study evaluating nivolumab (anti-PD-1 mAb) with or without ipilimumab (anti-CTLA-4 mAb) [18], convincingly showed that MSI status was able to predict clinical benefit from CK blockade therapy. Thus, only tumors displaying MSI are likely to respond to PD-1 blockade, suggesting that MSI neoplasms are probably a useful model to study immune determinants associated with good response to anti-PD-1/PD-L1 mAb, or more generally to CK blockade therapy.

Determination of microsatellite instability and mismatch repair deficiency

Revised guidelines for the clinical management of LS by a group of European experts recommend that testing all CRC (or individuals with CRC < 70 years) by immunohistochemistry (to identify dMMR tumors) or polymerase chain reaction (PCR; to identify MSI tumors) is useful for the identification of patients with LS (category of evidence IIb). The Mallorca group recommends the investigation of all CRC (or individuals with CRC < 70 years) by immunohistochemistry of the four MMR proteins or PCR (grade of recommendation C). These tests should be accompanied by methods that identify *MLH1* promoter methylation. Investigation of all endometrial cancers in individuals less than 70 years of age by immunohistochemistry or PCR can also be considered to improve identification (grade of recommendation C) [19]. In 2015, the European Society for medical Oncology (ESMO) recommended that every CRC patient should be tested for MSI and/or DNA MMR deficiency at the time of diagnosis as a first screen for LS [20]. The recent success of immunotherapy with PD-1 inhibition in dMMR CRC is likely to necessitate evaluation of MMR or MSI in all metastatic CRCs in the near future [17]. In tumor samples, the MSI phenotype can be determined by PCR according to international criteria [21]. It is correlated with the loss of MMR protein expression affecting *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, or *PMS2* studied by immunohistochemistry [22].

Polymerase chain reaction

Microsatellites are highly repetitive DNA sequences of one to six nucleotides distributed throughout the genome, which are frequently copied incorrectly. The MMR system is responsible for the detection and the correction of these microsatellite-copying errors. Genotyping microsatellites using PCR is a standard method to detect MSI.

Held by the National Cancer Institute (NCI), Bethesda guidelines initially recommended the use of a standard panel of 5 microsatellites composed of 2 mononucleotide repeats (BAT-25 and BAT-26) and 3 dinucleotide repeats (D2S123, D5S346 et D17S250) [21]. When comparing marker length between normal and tumor tissue, MSI phenotype is defined by the instability of at least 2 microsatellites. In 2002, our group proposed a panel of 5 mononucleotide repeats that obviated the necessity to analyze simultaneously non-tumor DNA [7], panel that was approved by the NCI for the screening of MSI tumors [23], with better specificity and sensitivity than the NCI panel [8]. With this method, 2 unstable markers are sufficient to classify tumors as MSI [24]. Main pitfalls encountered in detecting MSI tumor phenotype by PCR are the contamination of DNA tumor samples by DNA from normal tissue and low levels of tumor cells, notably in the context of mucinous tumors.

Our group recently reported a high frequency of mutations for the T17 mononucleotide repeat of the chaperone HSP110 (HT17) in MSI CRC [25]. Deletion of the HT17 repeat in tumor

DNA leads to increased synthesis of a variant HSP110 isoform due to exon 9 skipping (HSP110DE9) [25,26]. We compared HT17 status with the pentaplex panel in a multicenter large cohort of patients: HT17 showed better sensitivity compared with the pentaplex panel [0.984 (95% CI: 0.968 to 0.995) versus 0.951 (95% CI: 0.925 to 0.972)] and similar specificity [0.997 (95% CI: 0.989 to 1.000) for both] for the detection of MSI. Thus, HT17 DNA repeat seems to constitute a superior marker for the diagnosis of MSI phenotype in patients with CRC compared with the standard pentaplex panel [9].

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry allows studying the expression of MMR proteins on histological section. Physiologically, these proteins are ubiquitous and are located in the nucleus. They are particularly expressed in cells of the lower third of the crypts of mucosae, in stromal elements such as inflammatory cells and/or endothelial cells. Immunohistochemical testing consists in looking for the loss of expression of the studied protein by tumor cells, the two copies of the gene being inactivated in MSI tumors. The presence of nuclear staining in tumor cells, even when it is focal and weak, is good evidence of intact MMR protein. Each protein is considered lost if there is a complete loss of nuclear staining in tumor cells. An internal positive control (intact nuclear staining of stromal elements such as inflammatory cells and/or endothelial cells) is required for adequate evaluation. Cases showing a complete absence of nuclear staining pattern in both tumor cells and stromal elements are deemed uninterpretable. In this case, repeating the stain in search for positive non-neoplastic stromal or inflammatory cells should be done [27]. In some cases, the staining of internal controls can be stronger than the positive tumor cells; this staining has to be followed by molecular MSI analysis to confirm the presence of a defective DNA MMR system [28].

In their functional state, MMR proteins form heterodimers: *MLH1* builds a functional complex with *PMS2* (MutSalpha) and *MSH2* dimerizes with *MSH6*, forming MutLalpha [29,30]. *MLH1* and *MSH2* proteins are the obligatory partners of their respective heterodimers. Mutations in the *MLH1* or *MSH2* gene result in proteolytic degradation of the respective dimer and consequent loss of both the obligatory and the secondary partner proteins. Loss of *MLH1* and *MSH2* proteins is exclusive, e.g. it concerns only one of the two proteins. In case of loss of *MLH1* protein expression, a concurrent loss of *PMS2* protein expression is also observed. In the same way, the extinction of *MSH2* protein leads to concurrent extinction of *MSH6*. On the contrary, a mutation in one of the secondary genes, i.e. *PMS2* or *MSH6*, does not usually lead to concurrent loss of the obligatory proteins (*MLH1* or *MSH2*, respectively), probably due to interactions with other components of the MMR system such as *MSH3*, *MLH3*, and *PMS1*. The extinction of *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*, although not absolute, is a good argument in favor of a germline mutation of

the gene. Loss of MLH1 protein expression can be related to either a germline mutation of *MLH1*, or a methylation of its promoter (in sporadic cases). It is worth noting that a constitutional 3' end deletion of *EPCAM*, which is immediately upstream of the *MSH2* gene, may cause LS through epigenetic silencing of *MSH2*, thus leading to a loss of MSH2 protein expression [31]. Double somatic hits in *MSH2* may also occur in patients with MSH2-negative tumors, consequently not related with LS [32,33].

Immunohistochemistry is an inexpensive and low time-consuming technique. It is routinely used in departments of pathology. It is an extremely sensitive technique, useable even for a small tumor sample (biopsy, mucinous adenocarcinoma which can be responsible of false negatives with molecular methods, rectal cancer nearly sterilized by neo-adjuvant radiotherapy). Moreover, in contrast to MSI testing, immunohistochemistry can help identify the affected gene, therefore directing germline mutation analysis to one gene, saving unnecessary analysis of other MMR genes [22].

Earlier studies focusing on MLH1 and MSH2 suggested that immunohistochemistry had lower sensitivity (85%) than MSI testing (93%) in predicting germline mutation [27]. When the four MMR proteins are tested, the correlation between the loss of MMR protein expression and MSI testing is excellent. In three main series including 1144, 1066 and 1119 patients suffering from CRC, sensitivities for detection of MSI tumors by immunohistochemistry were 92%, 93% and 94% respectively [22,34,35]. In this setting, immunohistochemical analysis could replace microsatellite analysis of tumor DNA as the practical first-line screening test.

Immunohistochemistry is reliable in screening for mutations that result in truncation or degradation of the protein. However, false positives are possible in case of missense mutations, which result in mutant proteins that are catalytically inactive, but antigenically intact [36]. Moreover, a reduction of the intensity of staining for MSH6 has been described in rectal cancers after neo-adjuvant chemoradiation [37]. In these cases, pre-treatment endoscopic biopsies, rather than operative material, may be used as the primary material for immunohistochemistry. The heterogeneity of practices of fixation of tissue samples decreases the sensibility of the technique. In our experience, best results are obtained with samples fixed in 10% formalin. We should bear in mind that immunohistochemical techniques are not standardized enough and not perfectly reproducible. Thus, immunohistochemistry should only be performed in a specialized setting by experienced pathologists and staining results have to be evaluated with feedback of the molecular background of the tumor [28].

Next-generation sequencing

Next-generation sequencing (NGS) is becoming a widespread tool in profiling tumor genomic. NGS has been proposed as a

diagnostic method to detect MSI tumors, hypothesizing that the mutational load of a multigene panel may accurately exclude pMMR cancers. Stadler et al. reported the analysis of 224 patients whose CRC had been profiled using a custom NGS assay [38]. Among these patients, 28 (13%) harbored dMMR tumors and 196 (87%) pMMR CRC. All tumors with less than 20 mutations ($n = 193$) were pMMR. Of 31 CRC with 20 mutations or more, 28 (90%) were dMMR; the 3 remaining CRC harbored *POLE* mutation and exhibited a hypermutator phenotype with more than 150 mutations (median number of mutations among dMMR tumors: 50). However, NGS remains restricted to highly specialized laboratories and requires high-quality samples from both tumor and normal tissues. Secondly, Stadler et al. used a custom multigene panel, consisting of deep sequencing of all exons and selected introns of 341 cancer-associated genes; consensus about NGS gene panel has to be found, as well as specific mutational load cut-off. NGS may be in the near future an attractive method to discriminate pMMR versus dMMR and *POLE*-mutated tumors.

MSI colorectal cancer

Epidemiology

MSI CRC are associated with specific clinico-pathological characteristics: proximal colon, poor differentiation, mucinous component, high level of inflammatory infiltrate. They represent 15% to 20% of stage II and III CRC and are associated with better prognosis than pMMR tumors [39–43]. Fluoropyrimidine-based chemotherapy is not indicated in the adjuvant setting for patients with stage II dMMR CRC, given their favorable survival and the lack of impact of chemotherapy in this situation. Oxaliplatin-based chemotherapy remains the standard of treatment for patients with stage III CRC, regardless of their MMR status [39,41,44–46].

Representing approximately 5% of metastatic CRC, dMMR CRC prevalence is inferior in advanced diseases (stage IV) than in stage II and III tumors. This lower frequency highlights the weakened capacity for dMMR CRC to develop metastasis. In metastatic stage, dMMR status is associated with poor prognosis. Among 3063 patients with stage IV CRC included in 4 randomized phase III trials, those with dMMR tumors ($n = 153$, 5%) harbored reduced progression-free and overall survivals than patients with pMMR tumors (hazard ratio = 1.33, 95%CI: 1.12–1.54; hazard ratio = 1.35, 95%CI: 1.13–1.61, respectively) [47]. dMMR CRC are strongly associated with *BRAFV600E* mutation: there are 35% of *BRAFV600E*-mutated tumors among dMMR mCRC, and 21% of dMMR tumors among *BRAFV600E*-mutated mCRC [47]. Actually, dMMR and *BRAFV600E*-mutated CRC are clustered together in the CMS 1 (consensus molecular subtype), which is characterized by favorable disease-free survival but dramatic prognosis after relapse [48]. Taking into account the negative impact of *BRAFV600E* mutation helps to decipher the prognostic profile of dMMR mCRC. Thus, the observed

unfavorable prognosis of patients with dMMR mCRC may be partially due to *BRAFV600E* mutation [47,49].

Sporadic and inherited dMMR colorectal cancer

Standard immunohistochemical and biomolecular analysis are useful to distinguish sporadic dMMR and LS-related tumors. dMMR CRC with *MLH2/MSH6*, or isolated *MSH2* or *PMS2* loss of expression, should be considered as LS-related tumors, regardless of *BRAF* mutational status, and patients should be addressed for an oncogenetic research. It is important to note that patients with constitutional mutation of a MMR gene may be diagnosed with a *BRAFV600E*-mutated tumor [50,51]. On the opposite, dMMR CRC with *MLH1* loss of expression may be from sporadic or inherited origin. Therefore, analysis of *BRAF* mutational status and *MLH1* promoter methylation should be performed for *MLH1*-negative CRC. Sporadic *MLH1*-negative tumors are *BRAFV600E*-mutated and/or harbor *MLH1* promoter hypermethylation. LS *MLH1*-negative CRC are *BRAF* wild-type without hypermethylation of *MLH1* promoter. Thus, algorithms have been developed to distinguish patients with dMMR CRC who should be searched for a constitutional mutation of MMR genes and those who should not (figure 1) [52-58]. However, double somatic mutations responsible for dMMR CRC have been reported in *MLH1* and *MSH2* genes; thus unmethylated *MLH1*-negative CRC and *MSH2*-negative tumors may not be due to LS [32,33].

Immunotherapy and dMMR colorectal cancer

CK inhibition is a promising strategy for dMMR CRC. Proof-of-concept results published in the *New England Journal of Medicine* by Le et al. showed 40% of objective response with pembrolizumab for patients with dMMR CRC versus 0% for those with pMMR tumors [17]. Updated analysis confirmed the high clinical activity of this anti-PD-1 mAb for dMMR mCRC. Objective response rate (ORR) was 50% for dMMR tumors ($n = 28$) and 0%

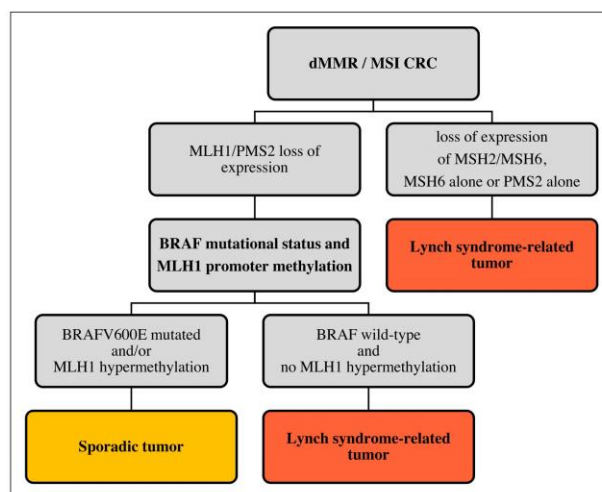


FIGURE 1 Algorithm for the identification of sporadic colorectal cancers and tumors associated with Lynch syndrome

for pMMR CRC ($n = 25$). Median progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were not reached in the dMMR cohort versus 2.4 months and 6 months in the pMMR cohort respectively (HR = 0.135, 95% CI: 0.043-0.191, $P < 0.0001$ and HR = 0.247, 95% CI: 0.117-0.589, $P = 0.001$, respectively) (table I) [59]. Pembrolizumab is currently compared in a phase 3 randomized study with first-line standard of care chemotherapy in patients with dMMR mCRC with cross-over at progression (KEYNOTE-177; NCT02563002) (table II).

Other CKI are currently evaluated for patients with dMMR mCRC. Notably, nivolumab, another anti-PD-1 mAb, has been tested alone or in combination with ipilimumab, an anti-CTLA-4 mAb. Preliminary results presented at the ESMO 2016 Congress

TABLE I Immune checkpoint inhibition in metastatic colorectal cancer

	Number of patients	CR (%)	PR (%)	SD (%)	PD (%)	NE (%)	PFS (months)	OS (months)
Pembrolizumab 10 mg/kg								
dMMR/MSI	28	11	46	32	4	7	NR	NR
pMMR/MSS	25	0	0	4	11	40	2.3	5.98
Nivolumab 3 mg/kg								
dMMR/MSI	47	0	26	30	36	9	5.3	17.1
Nivolumab 3 mg/kg + Ipilimumab 1 mg/kg								
dMMR/MSI	27	0	33	52	11	0	NR	NR
pMMR/MSS	10	0	0	20	70	10	1.3	3.7

CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progression disease; NE: not evaluable; PFS: progression-free survival; OS: overall survival; NR: not reached; dMMR: deficient mismatch repair; pMMR: proficient mismatch repair; MSI: microsatellite instability; MSS: microsatellite stable.

TABLE II
Ongoing trials evaluating immune checkpoint inhibition in MSI tumors

Study identifier	Phase	Drug treatment	Drug mechanism	Tumor type	Current status	French participating center
NCT02646748	1	Pembrolizumab INCB039110 INCB050465	Anti-PD-1 mAb JAK1 inhibitor PI3K-delta inhibitor	Advanced and metastatic dMMR/MSI cancers	Recruiting	Yes
NCT02628067	2	Pembrolizumab	Anti-PD-1 mAb	Advanced and metastatic MSI non-colorectal tumors	Recruiting	Yes
NCT01876511	2	Pembrolizumab	Anti-PD-1 mAb	Advanced and metastatic MSI cancers	Recruiting	No
NCT02563002	3	Pembrolizumab versus chemotherapy	Anti-PD-1 mAb	Stage IV dMMR/MSI colorectal cancers	Recruiting	Yes
NCT02060188	2	Nivolumab plus Ipilimumab	Anti-PD-1 mAb Anti-CTLA-4 mAb	Stage IV MSI colorectal cancers	Recruiting	Yes
NCT02912559	3	Atezolizumab plus FOLFOX versus FOLFOX	Anti-PD-L1 mAb	Stage III dMMR/MSI colorectal cancers	Not yet recruiting	No

showed encouraging antitumor activity in patients with dMMR CRC ($n = 100$) [18]. Seventy patients received nivolumab 3 mg/kg alone (N3) and 30 patients nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 1 mg/kg (N3 + I1) for 4 cycles (Q3W) followed by nivolumab alone 3 mg/kg until disease progression or unacceptable toxicity (Q2W). ORR were 25.5% (N3) and 33.3% (N3 + I1), with durable responses observed with both monotherapy and combination therapy. Only 1 partial response (5%) was reported in the pMMR cohort ($n = 20$). Median PFS among dMMR patients receiving N3 and N3 + I1 were 5.3 months and not yet reached. Median OS were 17.1 months and not yet reached, respectively. The safety profile of nivolumab with or without ipilimumab was acceptable with 14.3% (N3) and 26.7% (N3 + I1) of grade 3-4 treatment-related adverse events and only 6 treatment discontinuations (16.1%) related with drugs toxicities. Interestingly, clinical activity was observed regardless of *BRAF* mutational status (17% of *BRAF*V600E-mutated tumors in the dMMR cohort), *KRAS* mutational status and PD-L1 expression levels. Only 1 partial response (5%) was reported in the pMMR cohort ($n = 20$). Even if no biomarker has yet been discovered among MSI tumors, MMR deficiency may be considered as a predictive biomarker for the efficacy of CKI. Thus, patients with metastatic dMMR CRC should be systematically identified because of the potential innovative therapeutic opportunities offered in the ongoing clinical trials (table II).

MSI non-colorectal cancers

Epidemiology

Most of studies on MSI phenotype focusing on CRC and detection techniques used being heterogeneous, epidemiological data on MSI non-colorectal cancers are incomplete. Endometrial, gastric,

hepatocellular, thyroid carcinomas, melanoma, and sebaceous tumors harbor a MSI-high phenotype in more than 10% of cases. Ovarian and cervical cancers, oesophageal adenocarcinomas, soft tissue sarcomas, head and neck squamous cell carcinomas, kidney cancers and Ewing's sarcoma harbor a MSI phenotype in between 2 and 10% of cases. Finally, less than 2% of cutaneous squamous cell or basocellular carcinomas, prostate and non-small-cell lung cancers, osteosarcomas, glioblastomas, pancreas, breast and urothelial cancers and germ cell tumors exhibit MSI. This phenotype is rare in non-Hodgkin lymphomas (2%); however it is specifically associated with immunodeficiency-related lymphomas (table III) [4,60,61].

Approximately 20 to 30% of endometrial carcinomas harbor MMR deficiency [62–64]. MSI endometrial tumors are associated with high grade, vascular emboli and lymphatic invasion. More frequent in endometrioid tumors (30–40%), MSI phenotype is rarely observed in serous ovarian cancers (2%) but mainly related to LS [63,65].

In ovarian cancer, MMR deficiency is observed in around 10% of tumors and occurs in all histological subtypes of ovarian cancer, with endometrioid and mucinous cancers being most frequently affected. No association between MSI phenotype and prognosis has been described [66–68]. In the context of LS, dMMR tumors are associated with endometrioid low grade type and early stage disease [69].

Little is known about MSI gastric adenocarcinoma (8 to 22% of all gastric epithelial cancers). However several studies showed an association between MSI phenotype and lower stage, older age and intestinal histological subtype [70–72]. Thus, despite the fact that MSI phenotype is a promising biomarker of efficacy for immunotherapy in a broad spectrum of tumors, clinical and

TABLE III
Frequency of MSI phenotype in solid and hematological neoplasms

Tumor type	Percentage
Endometrial cancer [4,63,64]	26-33
Colorectal cancer	
Localized [44,73,74]	15-20
Metastatic [47,75]	3-12
Gastric cancer [4,71,72]	8-22
Pancreatic cancer [76,77]	8-17
Esophageal cancer [78]	7
Ovarian cancer [68]	10
Hepatocarcinoma [4,79]	2-16
Prostate cancer [4,60]	2
Head and neck cancer [4,60]	2
Melanoma [4,60]	1
Glioblastoma [4,60]	1
Non-Hodgkin lymphomas [61]	2

molecular characterization of those MSI tumors remains incomplete.

Immunotherapy and dMMR non-colorectal cancers

The phase 2 trial evaluating pembrolizumab in dMMR tumors was designed with a specific cohort including non-colorectal dMMR metastatic tumors ($n = 30$): endometrial cancers ($n = 9$), ampullary cancers ($n = 7$), pancreatic cancers ($n = 4$), small

TABLE IV
Clinical efficacy of pembrolizumab in MSI non-colorectal carcinomas

Primary location	Number of patients	CR	PR	SD	PD
Endometrial	8	2	4	2	-
Ampullary/biliary	6	2	-	3	1
Small bowel	4	1	2	1	-
Gastric	3	1	1	-	1
Pancreas	3	-	2	1	-
Sarcoma	1	-	-	-	1
Prostate	1	1	-	-	-

CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progression disease.

bowel carcinomas ($n = 4$), gastric cancers ($n = 3$) and others ($n = 3$). Pembrolizumab demonstrated impressive clinical activity with an objective response rate of 53%, of which 9 complete responses (30%) and 7 partial responses (23%) (table IV). The 1-year progression-free survival rate was 57% and the 1-year overall survival rate 81% [80]. Following these major response rates in MSI tumors, several trials have already started with immunotherapy treatment. Some of them chose MSI phenotype as main inclusion criteria (table II) whatever the type of primitive tumor, other trials are currently recruiting patients with tumors harboring frequent MSI phenotype such as endometrial and gastric cancers.

Constitutive mismatch repair deficiency

Individuals with bi-allelic germline mutation in MMR genes suffer from constitutive MMR deficiency (CMMRD). This rare syndrome (reported in less than 200 patients) is associated with early-onset tumors such as CRC, brain tumors, sarcomas, lymphomas and leukemia [81]. CMMRD is characterized by MMR deficiency, and eventually MSI phenotype in both tumor cells and immortalized lymphoblastoid cells. Presence of MSI phenotype and tolerance to methylation in lymphoblastoid cell lines define CMMRD patients, as well as the identification of bi-allelic, deleterious germline MMR defects [82].

Glioblastoma multiform due to CMMRD exhibit the highest mutational load among human cancers [83]. Interestingly, 2 cases have been reported about siblings treated with nivolumab for recurrent CMMRD glioblastoma multiform. Nivolumab demonstrated high clinical activity with profound and durable responses in both cases, whereas survival is usually inferior to 6 months after recurrence [84]. Thus, CKI may be a major breakthrough for the treatment of CMMRD-related tumors.

Conclusion

MMR deficiency is a driver of carcinogenesis is a large spectrum of human cancers. From sporadic origin or inherited (mainly related to LS, rarely due to CMMRD), MMR deficiency is responsible for MSI phenotype and can be detected through immunohistochemistry, PCR or NGS. Immune CKI is highly active in MSI/dMMR CRC and non-colorectal cancers, whereas immunotherapy is ineffective for patients with MSS CRC. Thus, MSI phenotype and MMR deficiency may be considered as positive predictive biomarkers for CKI efficacy. Determination of MSI or MMR status may be mandatory for tumors with high prevalence of MSI phenotype but this frequency cut-off remains to be defined. Clinical trial enrollment should be systematically considered for patients treated for MSI/dMMR cancers.

Disclosure of interest: Thierry André declares: consulting for Roche, AMGEN; Honoraria from Baxter, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Lilly, MSD, Merck Serono, Novartis, Sanofi, Servier.
The other authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812–6.
- [2] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027–38.
- [3] Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–61.
- [4] Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22:1342–50.
- [5] Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447–54.
- [6] Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs A-S, et al. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer* 2008;95:121–32.
- [7] Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–11.
- [8] Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou J-F, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–51.
- [9] Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, Colas C, Chouchène M, Wanherdrick K, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J Med Genet* 2016;53:377–84.
- [10] Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849–52.
- [11] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
- [12] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009;10:29–37.
- [13] Ferris RL, Lu B, Kane M. Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion. *J Immunol* 2014;193:1525–30.
- [14] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015;27:450–61.
- [15] Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348:124–8.
- [16] Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5:43–51.
- [17] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509–20.
- [18] Overman MJ, Kopetz S, Lonardi S, McDermott R, Leone F, Leach J, et al. Nivolumab ± ipilimumab treatment (Tx) efficacy, safety, and biomarkers in patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): results from the CheckMate-142 study. *Ann Oncol* 2016;27(Suppl. 6) [abstract 479P].
- [19] Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013;62:812–23.
- [20] Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk – colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015;33:209–17.
- [21] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. 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* 1998;58:5248–57.
- [22] Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851–60.
- [23] Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle AD, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–8.
- [24] Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* 2010;5:e9393.
- [25] Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–9.
- [26] Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil – based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401–11.
- [27] Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008;10:293–300.
- [28] Overbeek LH, Ligtenberg MJL, Willems RW, Hermens RPMG, Blokx WAM, Dubois SV, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1246–51.
- [29] Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell* 2006;126:297–308.
- [30] Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13629–34.
- [31] Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009;41:112–7.
- [32] Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Eyries M, Svrcek M, et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 2012;12:27–33.
- [33] Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WAG, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJB, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014;146:643–6.
- [34] Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043–8.
- [35] Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of

- hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006;118:115-22.
- [36] Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition – update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004;20:269-76.
- [37] Bao F, Panarelli NC, Rennett H, Sherr DL, Yantiss RK. Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1798-804.
- [38] Stadler ZK, Battaglin F, Middha S, Hechtman JF, Tran C, Cercek A, et al. Reliable detection of mismatch repair deficiency in colorectal cancers using mutational load in next-generation sequencing panels. *J Clin Oncol* 2016;34:2141-7.
- [39] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
- [40] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3219-26.
- [41] Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:863-75.
- [42] Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1261-70.
- [43] Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. 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* 2010;28:466-74.
- [44] André T, Gramont de A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol* 2015;33:4176-87.
- [45] Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, Gramont de A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010;21:772-80.
- [46] Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I, Lecomte T, Coriat R, Aparicio T, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in colon cancer with microsatellite instability: a large multicenter AGEO study. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv438.
- [47] Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014;20:5322-30.
- [48] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350-6.
- [49] Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* 2014;25:1032-8.
- [50] Robinson KL, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:291-9.
- [51] Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008;135:419-28.
- [52] Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2007;6:301-10.
- [53] Capper D, Voigt A, Bozukova G, Ahadova A, Kickingereder P, von Deimling A, et al. BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer: BRAF V600E immunohistochemistry in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer* 2013;133:1624-30.
- [54] Nakagawa H, Nagasaka T, Cullings HM, Notohara K, Hoshijima N, Young J, et al. Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 3' promoter methylation of the MLH1 or BRAF mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability. *Oncol Rep* 2009;21:1577-83.
- [55] Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, Korhonen M, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch* 2013;463:613-21.
- [56] Bessa X, Ballesté B, Andreu M, Castells A, Bellosillo B, Balaguer F, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:206-14.
- [57] Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 2012;49:151-7.
- [58] Roth RM, Hampel H, Arnold CA, Yearsley MM, Marsh WL, Frankel WL. A modified Lynch syndrome screening algorithm in colon cancer: BRAF immunohistochemistry is efficacious and cost beneficial. *Am J Clin Pathol* 2015;143:336-43.
- [59] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2016;34 [abstr 103].
- [60] Dudley JC, Lin M-T, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clin Cancer Res* 2016;22:813-20.
- [61] Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poiré H, Buhard O, Aubry A, et al. The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5002-7.
- [62] Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67-73.
- [63] Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F, Gibb RK, Powell MA, Rader JS, et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *J Clin Oncol* 2007;25:2042-8.
- [64] Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, et al. Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol* 2016;mdw542.
- [65] Gargiulo P, Della Pepa C, Berardi S, Califano D, Scala S, Buonaguro L, et al. Tumor genotype and immune microenvironment in POLE-ultramutated and MSI-hypermutated endometrial cancers: new candidates for checkpoint blockade immunotherapy? *Cancer Treat Rev* 2016;48:61-8.
- [66] V S, Bhagat R, C SP, V RP, Krishnamoorthy L. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics* 2014;104:257-63.
- [67] Arzimanoglou II, Lallas T, Osborne M, Barber H, Gilbert F. Microsatellite instability differences between familial and sporadic ovarian cancers. *Carcinogenesis* 1996;17:1799-804.
- [68] Murphy MA, Wentzensen N. Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review. This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. *Int J Cancer* 2011;129:1914-22.
- [69] Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* 2016;2:482-90.
- [70] Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG

- island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438-42.
- [71] Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.
- [72] Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park Y-K, Hong SW, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *J Surg Oncol* 2009;99:143-7.
- [73] Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res* 2012;18:6531-41.
- [74] Taieb J, Zaanan A, Le Malicot K, Julié C, Blons H, Mineur L, et al. Prognostic effect of BRAF and KRAS mutations in patients with stage III colon cancer treated with leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin with or without cetuximab: a post hoc analysis of the PETACC-8 trial. *JAMA Oncol* 2016;2:643.
- [75] Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011;117:4623-32.
- [76] Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, et al. Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2536-40.
- [77] Maple JT, Smyrk TC, Boardman LA, Johnson RA, Thibodeau SN, Chari ST, et al. Defective DNA mismatch repair in long-term (≥ 3 years) survivors with pancreatic cancer. *Pancreatology* 2005;5:220-8.
- [78] Farris AB, Demicco EG, Le LP, Finberg KE, Miller J, Mandal R, et al. Clinicopathologic and molecular profiles of microsatellite unstable Barrett Esophagus-associated adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2011;35:647-55.
- [79] Chiappini F, Gross-Goupil M, Saffroy R, Azoulay D, Emile J-F, Veillhan L-A, et al. Microsatellite instability mutator phenotype in hepatocellular carcinoma in non-alcoholic and non-virally infected normal livers. *Carcinogenesis* 2004;25:541-7.
- [80] Diaz LA, Uram JN, Wang H, Bartlett B, Kemberling H, Eyring A, et al. Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient cancer independent of tumor histology. *J Clin Oncol* 2016;34 [abstr 3003].
- [81] Lavoine N, Colas C, Muleris M, Bodo S, Duval A, Entz-Werle N, et al. Constitutional mismatch repair deficiency syndrome: clinical description in a French cohort. *J Med Genet* 2015;52:770-8.
- [82] Bodo S, Colas C, Buhard O, Collura A, Tinat J, Lavoine N, et al. Diagnosis of constitutional mismatch repair-deficiency syndrome based on microsatellite instability and lymphocyte tolerance to methylating agents. *Gastroenterology* 2015;149:1017-29.
- [83] Shlien A, Campbell BB, de Borja R, Alexandrov LB, Merico D, Wedge D, et al. Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermutated cancers. *Nat Genet* 2015;47:257-62.
- [84] Bouffet E, Larouche V, Campbell BB, Merico D, Borja de R, Aronson M, et al. Immune checkpoint inhibition for hypermutant glioblastoma multiforme resulting from germline biallelic mismatch repair deficiency. *J Clin Oncol* 2016;34:2206-11.

c) *Perspectives de l'immunothérapie dans le cancer colorectal*

L'objectif de cette revue de la littérature est de mettre en avant le développement clinique de l'immunothérapie dans les cancers colorectaux MSI, mais aussi d'analyser les données de la littérature pour rendre « immunosensibles » les CCR MSS qui dans leur ensemble présentent une résistance primaire à l'immunothérapie. La littérature concernant les tumeurs MSS hypermutés (mutation de la polymérase E), les agents déméthylants et la mort cellulaire immunogène chimio-induite est présentée dans ce manuscrit.

Cette revue a été publiée dans *Colorectal Cancer* [195] : Cohen R, Svrcek M, Duval A, Parc Y, Osterlund PP, André T (2017) Immune checkpoint inhibitors for patients with colorectal cancer: mismatch repair deficiency and perspectives. *Colorectal Cancer*. doi: 10.2217/crc-2017-0004

PERSPECTIVE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Immune checkpoint inhibitors for patients with colorectal cancer: mismatch repair deficiency and perspectives

Colorectal Cancer



Romain Cohen^{1,2,3}, Magali Svrcek^{2,3,4}, Alex Duval², Yann Parc^{2,3,5}, Pia P Österlund⁶ & Thierry André^{*1,2,3}

Practice points

- Consensus molecular subtype 1 is enriched with colorectal cancers (CRCs) exhibiting microsatellite instability (MSI) and/or BRAF^{V600E} mutation, and is associated with favorable outcome in stages II–III, but poor survival in stage IV.
- MSI, which is caused by a mismatch repair (dMMR) system deficiency, is a positive predictive biomarker for the efficacy of immune checkpoint inhibitors.
- Immune checkpoint inhibitors have demonstrated major clinical efficacy in Phase I and II trials in MMR-deficient (dMMR) metastatic CRC.
- All patients with dMMR metastatic CRC should be addressed to clinical trials evaluating immunotherapeutic strategies.
- Universal MSI and MMR testing should be recommended for all CRC patients.
- Combination of immune checkpoint blockade with other treatments may be a promising strategy for patients with MMR-proficient CRC.

Harnessing the immune system to fight tumor cells is becoming a promising and innovative therapeutic strategy for a large spectrum of malignancies. The evaluation of immunotherapy in the context of colorectal cancers (CRCs) has brought to light mismatch repair deficiency as a major predictive biomarker for the efficacy of immune checkpoint blockade. In this review, we summarize the promising results of immune checkpoint inhibitors for patients with metastatic CRCs harboring mismatch repair deficiency, with special emphasis on further clinical development. Given the biological determinants of sensitivity to immune checkpoint blockade, we will also elucidate points that could unlock the potential of immunotherapy for patients with mismatch repair-proficient CRC.

First draft submitted: 6 April 2017; Accepted for publication: 2 May 2017; Published online: 21 June 2017

¹Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, APHP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

²INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

³Sorbonne Universités, UPMC Univ., Paris 06, France

⁴Department of Pathology, Hôpital Saint-Antoine, APHP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

⁵Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint-Antoine, APHP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris 75012, France

⁶Department of Oncology, Tampere University Hospital, Teiskontie 35, 33520 Tampere, Finland

*Author for correspondence: Tel: +33 171 970 387; Fax: +33 149 282 344; thierry.andre@aphp.fr

KEYWORDS

- colorectal cancer
- immune checkpoint inhibitors • ipilimumab
- Lynch syndrome
- microsatellite instability
- mismatch repair deficiency • nivolumab
- PD-1 • PD-L1
- pembrolizumab

Colorectal cancer (CRC) is the third more common cancer and the fourth leading cause of death by cancer worldwide [1]. The majority of CRCs develop via the chromosomal instability pathway, whereas 12–15% arise from the microsatellite instability (MSI) pathway that is a consequence of a deficient DNA mismatch repair (dMMR) system [2]. Approximately a third of MMR-deficient (dMMR) CRCs develop from an inherited germline mutation in an MMR gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*), in other words, Lynch syndrome and constitutional MMR deficiency syndrome, or more commonly due to an epigenetic inactivation of the *MLH1* gene and the CpG island methylator phenotype. These sporadic dMMR tumors carry somatic mutations in the *BRAF* oncogene in approximately half of the cases. Studies have shown that dMMR tumors have phenotypic features including poor differentiation, proximal colon location and abundant tumor-infiltrating lymphocytes [3].

Current treatment strategies for metastatic CRC (mCRC) include surgery, chemotherapy, antiangiogenic agents and anti-EGFR monoclonal antibodies (mAb). In 2013, cancer immunotherapy was named Science's Breakthrough of the Year, based on outstanding results in several early-phase trials [4]. One approach in immunotherapy is to use of checkpoint inhibitors that take the brakes off the immune system, which then becomes more efficient in attack against cancer [5,6]. One of the most studied strategies is the antiprogrammed death 1 (anti-PD-1) or ligand 1 (anti-PD-L1) mAbs.

However, the first results were disappointing for mCRC patients. Notably, no objective responses were initially observed with pembrolizumab (anti-PD-1, Keytruda®; n = 3), nivolumab (anti-PD-1; Opdivo®; n = 19) or BMS-936559 (anti-PD-L1; clinical development stopped; n = 18) [7–9]. The breakthrough was one patient who experienced a durable complete response with nivolumab [10]. Further analysis of this serendipitous event showed that the patient's tumor harbored MSI [11].

In this review, we provide an overview of immune checkpoint inhibition for patients treated for dMMR/MSI CRC, with a highlight on future therapeutic strategies in both localized and metastatic settings. We then focus on main points that could be critical to leverage for patients with MMR-proficient/microsatellite stable (pMMR/MSS) CRC.

Immunotherapy & MMR-deficient CRCs

- Targeting MMR-deficient tumors with immune checkpoint inhibitors is a biologically relevant strategy

Results of immune checkpoint inhibition for dMMR/MSI tumors are particularly important since dMMR/MSI mCRCs are associated with poor prognosis when treated with conventional chemotherapy [12]. Strongly associated with *BRAF*^{V600E} mutation, they are characterized by favorable outcome in localized setting but poor survival after relapse [12,13]. MMR deficiency results from an epigenetic inactivation of *MLH1* or from a germline mutation of an MMR gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2*). Sporadic dMMR CRCs, but not Lynch-syndrome-related tumors, are frequently associated with the *BRAF*^{V600E} mutation.

MMR deficiency is not a direct transforming event. Most oncogenic alterations found in dMMR tumors are somatic mutations that occur as a result of MMR deficiency, causing a tumor phenotype with MSI [14,15]. The MSI-driven oncogenic pathway is associated with the synthesis of aberrant and potentially immunogenic neoantigens by the tumor cells. Indeed, dMMR/MSI CRCs exhibit a 20-fold higher tumor mutational load compared with pMMR/MSS tumors [16–19]. Moreover, mutational load appears to determine sensitivity to immune checkpoint blockade [20,21]. Hence, these data support MMR deficiency as a major predictive biomarker for immunotherapy.

As a consequence of this, hypermutated phenotype dMMR/MSI tumors are highly infiltrated with cytotoxic T-cell lymphocytes [22]. Importantly, elevated expression levels for cytotoxic T cells/Th1/cytotoxicity markers are thought to constitute strong and independent positive prognostic biomarkers in patients with CRC, whatever be the MMR status [23]. However, this active immune microenvironment is counterbalanced by the dramatic overexpression of several immune checkpoints, including PD-1, PD-L1, CTLA-4, lymphocyte activation gene 3 and indoleamine 2,3-dioxygenase [24]. Thus, harnessing the immune system to fight tumors with immune checkpoint inhibitors is particularly relevant in the context of MMR deficiency.

- Immune checkpoint inhibition displays promising clinical activity in mCRC with MMR deficiency

Immune checkpoint inhibition appears to be a promising strategy for mCRCs harboring

MMR deficiency. Proof-of-concept from KEYNOTE-164 (n = 28) published in the New England Journal of Medicine by Le *et al.* showed a preliminary objective response rate (ORR) of 40% with pembrolizumab for heavily pretreated mCRCs with dMMR/MSI tumors, but no responses (0%) for those with pMMR/MSS [16]. Updated analysis confirmed the high clinical activity in dMMR mCRC (n = 28), with an ORR of 50 versus 0% for pMMR/MSS CRC (n = 25). Median progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were not reached in the dMMR/MSI cohort versus 2.4 and 6 months, respectively, in the pMMR/MSS cohort (PFS hazard ratio: 0.135; 95% CI: 0.043–0.191; p < 0.0001 and OS hazard ratio: 0.247; 95% CI: 0.117–0.589; p = 0.001; **Table 1**) [25].

Nivolumab has been tested alone (n = 74) or in combination with ipilimumab (n = 30), a humanized anti-CTLA-4 mAb (cytotoxic T lymphocyte antigen 4; CHECKMATE-142) for patients with dMMR/MSI and dMMR/MSS (n = 23; patients treated with three different combination dosing) mCRC, based on the promising results in melanoma that were the combination enhanced ORR and nearly doubled the PFS [26].

Seventy-four patients received nivolumab 3 mg/kg alone in second (18%) or later line (82%) of therapy. ORR (primary end point) was 31% by the investigator and 27% by the independent review. Disease control rates were 69 and 62% respectively. The median time to response was approximately 2.7 months. OS and duration of response have not been reached yet. Median PFS was 9.6 months; PFS rates at 12 months were 48% and OS rates at 6 and 12 months 83 and 74%. Grade 3–4 adverse events occurred in

20%; treatment-related adverse events leading to treatment discontinuation included acute kidney injury, increased alanine amino transferase, colitis and stomatitis (one each). No treatment-related deaths occurred in this arm [27].

In the combination arm, patients (n = 30) received nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 1 mg/kg for four cycles (Q3W) followed by nivolumab alone 3 mg/kg until disease progression or unacceptable toxicity (Q2W) in second (7%) or later line (93%) of treatment. ORR was 33% with durable responses observed. Median PFS, OS and duration of response were not reached. PFS and OS rates at 6 months were 67 and 83%, respectively. The safety profile was acceptable with 27% of grade III–IV treatment-related adverse events (15% with nivolumab monotherapy) [28].

• **Ongoing immunotherapeutic studies in patients with MMR-deficient CRC**

All but one of the patients included in these two Phase II studies (KEYNOTE-177 and CHECKMATE-142) had experienced disease progression under, at least, one line of standard chemotherapy. The vast majority had been heavily pretreated with three or more lines of treatment. Future trials need to address immunotherapy in earlier lines of therapy, in the neoadjuvant and adjuvant settings in resectable and potentially resectable mCRC, and in the adjuvant setting after resection of the primary tumor (**Table 2**).

In a Phase III randomized study, single-agent pembrolizumab is compared with first-line standard-of-care chemotherapy with biologic agents (anti-angiogenic or anti-EGFR agents)

Table 1. Immune checkpoint inhibition in metastatic colorectal cancer.

	n	CR (%)	PR (%)	SD (%)	PD (%)	NE (%)	Median PFS (months)	Median OS (months)
Pembrolizumab (10 mg/kg) [16,25]								
MSI	28	11	46	32	4	7	NR	NR
MSS	25	0	0	4	11	40	2.3	5.98
Nivolumab (3 mg/kg) [27]								
MSI	74	0	31	39	24	5	9.6	NR
Nivolumab (3 mg/kg) + Ipilimumab (1 mg/kg) [28]								
MSI	30	0	33	52	11	0	NR	NR
MSS	10	0	0	20	70	10	1.3	3.7

Conditions: MSI and MSS. Response: CR, PR, SD and PD. Efficacy: PFS, OS, NE and NR. CR: Complete response; MSI: Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stable; n: number of patients; NE: Not evaluable; NR: Not reached; OS: Overall survival; PD: Progressive disease; PFS: Progression-free survival; PR: Partial response; SD: Stable disease. Adapted with permission from [54]. © Elsevier (2017).

Table 2. Ongoing randomized trials with immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer.

Identifier	Condition	Intervention	n	Target	Type	Status
<i>In the adjuvant setting</i>						
NCT02912559 NCI-2016-01417	MSI, stage III	Atezolizumab + mFOLFOX6 vs mFOLFOX6	720	PD-L1	Phase III	Not yet recruiting
<i>In the metastatic setting: first-line treatment</i>						
NCT02563002 (KEYNOTE-177)	MSI	Pembrolizumab vs standard chemotherapy + biologics	270	PD-1	Phase III	Currently recruiting
NCT02997228 (COMMIT)	MSI	Atezolizumab vs mFOLFOX6 + bevacizumab + atezolizumab vs mFOLFOX6 + bevacizumab	439	PD-L1	Phase III	Not yet recruiting
NCT02291289 (MODUL)	MSI or MSS	After induction (FOLFOX + bevacizumab), maintenance treatment: atezolizumab + fluoropyrimidine + bevacizumab vs fluoropyrimidine + bevacizumab	610	PD-L1	Phase II	Currently recruiting
<i>In the metastatic setting: third-line treatment</i>						
NCT02788279	MSI or MSS	Atezolizumab vs atezolizumab + cobimetinib vs regorafenib	360	PD-L1 MEK TKI	Phase III	Currently recruiting
<small>Condition: MSI and MSS. Intervention: mFOLFOX6. Target: anti-PD-1 antibody, anti-PD-L1 antibody, MEK and TKI. mFOLFOX6: Modified bimonthly oxaliplatin, 5FU and leucovorin; MSI: Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stable; n: number of patients; PD-1: Programmed death receptor 1; PD-L1: Programmed death receptor ligand 1; TKI: Tyrosine kinase inhibitor.</small>						

in patients with chemo-naïve dMMR/MSI mCRC. Cross-over at progression is authorized (KEYNOTE-177; NCT02563002).

A Phase III study compares mFOLFOX combined with bevacizumab (anti-VEGF-A mAb) with or without atezolizumab (Tecentriq®) with single-agent atezolizumab in first-line treatment for chemo-naïve dMMR/MSI mCRC. Cross-over is not permitted (COMMIT, NCT02997228).

A Phase II randomized study is currently evaluating atezolizumab (anti-PD-L1 mAb) with fluoropyrimidine and bevacizumab in the maintenance phase for first-line mCRC whatever the MMR status (MODUL trial, NCT02997228). After an induction treatment phase with FOLFOX plus bevacizumab, patients with BRAF wild-type tumor (dMMR/MSI or pMMR/MSS) are randomized for maintenance therapy between an experimental arm (atezolizumab + fluoropyrimidine) and a control arm (bevacizumab + fluoropyrimidine). This study includes exploratory biomarker analysis, notably MMR status and immune infiltrate.

In stage III dMMR CRC, immune checkpoint inhibition strategy will be explored in a Phase III trial (NCT02912559 not yet open) comparing the addition of atezolizumab with standard adjuvant chemotherapy. In the standard arm, patients will receive modified FOLFOX6 regimen (12 courses). In the experimental arm,

patients will receive modified FOLFOX6 regimen (12 courses) and atezolizumab every 14 days for up to 25 courses.

• **Determinants of response to immune checkpoint blockade**

Mechanisms underlying primary and secondary resistance of dMMR/MSI CRC to immune checkpoint inhibitors will have to be particularly explored. Even if around 30–60% of patients exhibit ORR with anti-PD-1 mAbs, almost a third of patients with dMMR/MSI mCRC do not benefit from these treatments. Responses were observed in patients regardless of PD-L1 expression level, RAF or KRAS mutation status, and were observed in patients with or without a history of Lynch syndrome [27]. Combinations of immune checkpoints inhibitors (indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors, anti-CTLA-4 mAb) might be a way to improve these results (Table 3). Analysis of patients’ tumors at baseline and after progression already led to the discovery of several resistance mechanisms, notably inactivating mutations of the genes encoding JAK1 or JAK2, leading to a lack of reactive PD-L1 expression and response to IFN-γ [29,30].

Immunotherapy & MMR-proficient CRCs

Approximately 95% of mCRC do not harbor MMR deficiency (i.e., pMMR/MSI) [12]. Results from both CHECKMATE-142 and

KEYNOTE-164 Phase II studies were disappointing for patients with pMMR/MSS mCRC, with only 1 (2%) objective response among 45 patients treated in these two trials [16,28].

• **Searching for CRC with hypermuted-proficient mismatch repair**

Some pMMR/MSS exhibit a hypermuted phenotype and may consequently be sensitive to immune checkpoint blockade [17,31,32]. In a genome-scale analysis of 276 CRC samples, the Cancer Genome Atlas network found 16% of hypermuted cases (defined by a somatic mutation rate superior to 12 per 10⁶ bases), with a majority being MSI tumors (77%). Interestingly,

seven cases were MSS (23%), including the six with the highest mutation rates. These hypermuted MSS CRC had polymerase ε (POLE) mutations [31]. Same results were reported by Stadler *et al.* using a custom 341-gene next-generation sequencing panel on 224 CRC specimens. Among 31 hypermuted tumors, 28 (90%) were dMMR/MSI (median number of mutations: 50). The three remaining CRCs were pMMR/MSS and POLE mutated, and exhibited a mean mutational load at least threefold higher than the dMMR group (all three tumors with more than 150 mutations) [17]. Thus, pMMR/MSS POLE-mutated CRCs harbor a highly hypermuted phenotype that may be

Table 3. Ongoing clinical trials exploring innovative strategies for immunotherapy in colorectal cancer.

Identifier	Condition	Intervention	n	Target	Type	Status
<i>In the metastatic setting: ≥second-line treatment</i>						
NCT02178722 (KEYNOTE-037)	MSI	Pembrolizumab + epacadostat	403	PD-1; IDO-1	Phases I–II	Currently recruiting
NCT02646748 (39110–107)	MSI	Pembrolizumab + INCB039110 Pembrolizumab + INCB050465	78	PD-1; JAK-1 PD-1; PI3K-delta	Phase I	Currently recruiting
NCT02260440 (14–118)	MSI or MSS	Pembrolizumab + azacytidine	40	PD-1; epigenetic	Phase II	Ongoing, not recruiting
NCT02512172 (J1538)	MSS	Pembrolizumab + azacytidine and/or romidepsin	30	PD-1; epigenetic	Phase II	Currently recruiting
NCT02636036 (ColoAd1–1003)	MSI or MSS	Pembrolizumab + enadenotucirev	30	PD-1; oncolytic virus	Phase I	Currently recruiting
NCT02437071 (15–069)	MSI or MSS	Pembrolizumab + radiotherapy/RFA	48	PD-1	Phase II	Currently recruiting
NCT02318901 (PembroMab)	KRAS/NRAS/BRAF wt.	Pembrolizumab + cetuximab	90	PD-1; EGFR	Phase II	Currently recruiting
NCT02298959 (NCI-2014–01984)	MSI or MSS	Pembrolizumab + aflibercept	36	PD-1; VEGF	Phase I	Currently ongoing
NCT02060188 (CA209–142)	MSI or MSS	Nivolumab ± ipilimumab	260	PD-1; CTLA-4	Phase II	Currently recruiting
NCT02327078 (ECHO-204)	MSI or MSS	Nivolumab + epacadostat	291	PD-1; IDO-1	Phases I–II	Currently recruiting
NCT02335918 (CDX1127–02)	MSI or MSS	Nivolumab + varlilumab	205	PD-1; CD-27	Phases I–II	Currently recruiting
NCT02860546 (TAS-102–203)	MSS	Nivolumab + trifluridine/tipiracil (TAS-102)	35	PD-1	Phase II	Currently recruiting
NCT02982694 (EORTC 1604)	MSI	Atezolizumab + bevacizumab	58	PD-L1	Phase II	Not yet recruiting
NCT02876224 (CO39083)	MSS	Atezolizumab + bevacizumab - cobimetinib	33	PD-L1; MEK	Phase I	Currently recruiting
NCT02655822 (CPI-444–001)	MSI	Atezolizumab + CPI-444	534	PD-L1; ADORA2A	Phase I	Currently recruiting
NCT02227667 (14–109)	MSI or increased TILS	Durvalumab	48	PD-L1	Phase II	Currently recruiting

Condition: MSI, MSS and wt. Intervention: RFA. Target: PD-1, PD-L1, IDO-1, JAK-1, PI3K, EGFR, VEGF, CTLA-4, CD-27, MEK and ADORA2A.

n: number of patients ADORA2A: Adenosine A2a receptor; CD-27: Cluster of differentiation 27; CTLA-4: Cytotoxic T lymphocyte antigen 4; IDO-1: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; MSI: Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stable; PD-1: Programmed death receptor 1; PD-L1: Programmed death receptor ligand 1; RFA: Radiofrequency ablation; TILS: Tumor-infiltrating lymphocytes; wt: Wild-type.

interesting to trigger with immune checkpoint inhibitors [33].

• **Creating an enabling environment for immune checkpoint blockade**

MEK inhibitors may reverse pMMR/MSS tumors resistance to immunotherapy. Indeed, MEK inhibition induces an intratumoral accumulation of T-cell lymphocytes and protects them from exhaustion driven by chronic T-cell-receptor stimulation. Thus, combination of MEK and immune checkpoint inhibitors might be synergistic [34]. The association of cobimetinib (MEK inhibitor) and atezolizumab has been evaluated in a Phase Ib trial for patients with MSS *KRAS*-mutated mCRC (NCT01988896). Preliminary results were encouraging with an ORR of 17% and a 6-month PFS rate of 72%. Tolerance profile was acceptable with 35% of grade 3–4 adverse events [35]. A Phase III, three-arm, randomized trial is currently comparing regorafenib with atezolizumab with or without cobimetinib for patients with pMMR/MSS mCRC (after a 5% cap for MSI mCRC patients) (Tables 2 & 3). Other immunotherapeutic strategies such as cancer vaccine may also sensitize pMMR CRC to immune checkpoint blockade [36,37].

• **Priming effects of immunotherapy with hypomethylating agents**

Targeting epigenetic may be an attractive strategy to sensitize pMMR/MSS CRC patients to immune checkpoint blockade [38]. Through the upregulation of tumor neoantigens and MHC proteins, hypomethylating agents, such as DNA methyltransferase inhibitors (5-azacytidine and decitabine) and histone deacetylase inhibitors (romidepsin and panobinostat), might enhance clinical activity of immunotherapy. The potential of this combination has been raised up from the analysis of six patients with advanced non-small-cell lung cancer who received immune checkpoint inhibitors after progression on epigenetic therapy. Of these six patients, two had prolonged stable disease and three had durable partial responses to immunotherapy, whereas ORR with immunotherapy alone is around 20% [39–41]. Similar observations have been made in patients with Hodgkin lymphoma [42]. Combinations of hypomethylating agents and immune checkpoint inhibitors are currently evaluating in several Phase I trials for patients with dMMR and pMMR/MSS mCRC (Table 3).

Box 1. How to diagnose microsatellite instability or mismatch repair deficiency?

- Taking into account breakthrough results of immune checkpoints inhibitors for dMMR mCRC, the identification of patients with advanced or metastatic CRC harboring MSI or dMMR appears mandatory. In the localized setting the influence on prognosis and treatment choice also merits testing of all stage II patients and possibly stage III patients. Notably, the National Comprehensive Cancer Network now recommends universal MMR and/or MSI testing for all patients with a personal history of CRC Clinical Practice Guidelines in Oncology [47]
- MMR deficiency is defined by the loss of MMR protein expression (MLH1, MSH2, MSH6 or PMS2), studied by immunochemistry. Complete loss of nuclear staining in tumor cells validates the MMR protein loss. It is worthy to note that MMR proteins act as heterodimers: MLH1 with PMS2 (MutSalpha) and MSH2 with MSH6 (MutLalpha). MLH1 and MSH2 proteins are the obligatory partners of their respective heterodimers. Consequently, in case of loss of MLH1 or MSH2 protein expression, a concurrent extinction of PMS2 or MSH6, respectively, is observed. However, the corollary is not true: MLH1 and MSH2 protein expressions may remain despite PMS2 or MSH6 loss, probably due to interactions with other components of the MMR machinery [48]. False positives are possible in case of mis-sense mutations. However, even if immunohistochemical techniques are not standardized enough and not perfectly reproducible, this technique exhibits high sensitivity, is easily available and helps to identify the mutated MMR gene
- MSI phenotype is evaluated with PCR in the tumor sample and is correlated with the loss of MMR protein expression. Main issues of PCR are the contamination of DNA tumor samples by DNA from normal tissue and low levels of tumor cells. Microsatellites are highly repetitive DNA sequences of 1–6 nucleotides scattered throughout the genome which are frequently incorrectly copied. Bethesda guidelines initially recommended the use of a standard panel of five microsatellites composed of two mononucleotidic repeats (BAT-25 and BAT-26) and three dinucleotidic repeats (D2S123, D5S346 and D17S250) [49]. When comparing marker lengths between normal and tumor tissue, MSI phenotype is defined by the instability of at least two microsatellites. In 2002, our group proposed a panel of five mononucleotidic repeats (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and NR-27) that obviate the necessity to analyze simultaneously nontumor DNA and exhibit better specificity and sensitivity than the NCI panel (National Cancer Institute) [4,50]. This Pentaplex panel was approved by the NCI for the screening of MSI tumors [51]. With this method, two unstable markers are sufficient to classify tumors as MSI [52]. More recently, our group developed a simplified and more efficient method to detect MSI tumors. We reported a high frequency of mutations for the T17 mononucleotide repeat of the chaperone HSP110 (HT17) in MSI Clinical Practice Guidelines in Oncology. The analysis of this single-marker HT17 showed better sensitivity and similar specificity for the detection of MSI than the Pentaplex panel [15,53]

CRC: Colorectal cancer; dMMR: Deficient mismatch repair; MMR: Mismatch repair; MSI: Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stable.

• Using conventional cytotoxic treatments to induce immunogenicity

Accumulating evidence is growing that conventional antitumoral agents (chemotherapy and radiotherapy) promote immunogenicity of tumor cells. Several cytotoxic agents might be interesting to combine with immunotherapy as they induce immunogenic cell death, notably oxaliplatin. Therefore, combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy such as the FOLFOX regimen might sensitize patients to immunotherapy, especially those with pMMR/MSS mCRC (Table 3) [43–46].

Conclusion & future perspective

Immunotherapy is presently emerging in the field of CRC with promising results for patients with dMMR/MSI tumors. Here, we summarized convincing evidence that immune checkpoint blockade will radically transform the therapeutic strategies for the management of these patients in both localized and metastatic settings. Randomized trials are currently ongoing for stage III dMMR CRC and in first- and later line metastatic treatment. Thus, universal MSI and MMR testings appear mandatory for all treatable CRC patients.

Even, if pMMR/MSS CRCs do not appear sensitive to immune checkpoint blockade, several targets may expand the scope of immunotherapy to patients with pMMR tumors, including POLE mutations, epigenetic-targeting agents and immunogenic cell-death-inducing cytotoxic chemotherapies. Given the potential innovative therapeutic opportunities offered by immune strategies, clinical trial enrolment should be systematically considered for dMMR CRC patients (Box 1).

Financial & competing interests disclosure

P Österlund have received lecturing fees, advisory board compensation and/or research support from Amgen, Baxter, Baxalta/Shire, Celgene, Merck, Nordic Drugs, Roche and Sanofi. T André is the principal investigator for studies in metastatic colorectal cancer sponsored by Bristol-Myers Squibb, MSD and Roche and has received compensation from Amgen, Bristol-Myers Squibb and Roche for service as a consultant and lecturing fees or advisory board compensation by Bayer, Lilly Eli, Servier and Sanofi. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M *et al*. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (2013). <http://globocan.iarc.fr>
- Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(6), 2073.e3–2087.e3 (2010).
- Sinicropo FA, Shi Q, Smyrk TC *et al*. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 148(1), 88–99 (2015).
- Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy. *Science* 342(6165), 1432–1433 (2013).
- Ribas A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N. Engl. J. Med.* 366(26), 2517–2519 (2012).
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27(4), 450–461 (2015).
- Patnaik A, Kang SP, Rasco D *et al*. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 21(19), 4286–4293 (2015).
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR *et al*. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(26), 2443–2454 (2012).
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM *et al*. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(26), 2455–2465 (2012).
- Brahmer JR, Drake CG, Wollner I *et al*. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* 28(19), 3167–3175 (2010).
- Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG *et al*. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin. Cancer Res.* 19(2), 462–468 (2013).
- Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS *et al*. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin. Cancer Res.* 20(20), 5322–5330 (2014).
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X *et al*. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21(11), 1350–1356 (2015).
- Suraweera N, Duval A, Reperant M *et al*. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123(6), 1804–1811 (2002).
- Dorard C, de Thonel A, Collura A *et al*. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat. Med.* 17(10), 1283–1289 (2011).
- Le DT, Uram JN, Wang H *et al*. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372(26), 2509–2520 (2015).
- Stadler ZK, Battaglin F, Middha S *et al*. Reliable detection of mismatch repair deficiency in colorectal cancers using mutational load in next-generation sequencing panels. *J. Clin. Oncol.* 34(18), 2141–2147 (2016).

- 18 Donnard E, Asprino PF, Correa BR *et al.* Mutational analysis of genes coding for cell surface proteins in colorectal cancer cell lines reveal novel altered pathways, druggable mutations and mutated epitopes for targeted therapy. *Oncotarget* 5(19), 9199 (2014).
- 19 Lin EI, Tseng LH, Gocke CD *et al.* Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget* 6(39), 42334–42344 (2015).
- 20 Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small-cell lung cancer. *Science* 348(6230), 124–128 (2015).
- 21 Champiat S, Féré C, Lebel-Binay S, Eggermont A, Soria JC. Exomics and immunogenics: bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncol Immunology* 3(1), e27817 (2014).
- 22 Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50(1), 113–130 (2007).
- 23 Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P *et al.* Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138(4), 1429–1440 (2010).
- 24 Llosa NJ, Cruise M, Tam A *et al.* The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 5(1), 43–51 (2015).
- 25 Le DT, Uram JN, Wang H *et al.* Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 34(Suppl.), Abstract 103 (2016).
- 26 Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R *et al.* Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373(1), 23–34 (2015).
- 27 Overman MJ, Lonardi S, Leone F *et al.* Nivolumab in patients with DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability high metastatic colorectal cancer: update from CheckMate 142. *J. Clin. Oncol.* 35(Suppl. 4S), Abstract 519 (2017).
- 28 Overman MJ, Kopetz S, Lonardi S *et al.* Nivolumab ± ipilimumab treatment (Tx) efficacy, safety, and biomarkers in patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): results from the CheckMate-142 study. *Ann. Oncol.* 27(Suppl. 6), Abstract P479 (2016).
- 29 Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS *et al.* Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 375(9), 819–829 (2016).
- 30 Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H *et al.* Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations. *Cancer Discov.* (2016). <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org>
- 31 Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407), 330–337 (2012).
- 32 Ahn SM, Ansari AA, Kim J *et al.* The somatic POLE P286R mutation defines a unique subclass of colorectal cancer featuring hypermutation, representing a potential genomic biomarker for immunotherapy. *Oncotarget* 7(42), 68638–68649 (2016).
- 33 Santin AD, Bellone S, Buza N *et al.* Regression of chemotherapy-resistant polymerase ε (POLE) ultra-mutated and MSH6 hyper-mutated endometrial tumors with nivolumab. *Clin. Cancer Res.* doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1031 (2016) (Epub ahead of print).
- 34 Ebert PJR, Cheung J, Yang Y *et al.* MAP kinase inhibition promotes t cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity* 44(3), 609–621 (2016).
- 35 Bendell JC, Kim TW, Goh BC *et al.* Clinical activity and safety of cobimetinib (cobi) and atezolizumab in colorectal cancer (CRC). *J. Clin. Oncol.* 34(Suppl.), Abstract 3502 (2016).
- 36 Berry J, Vreeland T, Trappey A *et al.* Cancer vaccines in colon and rectal cancer over the last decade: lessons learned and future directions. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13(3), 235–245 (2017).
- 37 Correale P, Botta C, Ciliberto D *et al.* Immunotherapy of colorectal cancer: new perspectives after a long path. *Immunotherapy* 8(11), 1281–1292 (2016).
- 38 Weintraub K. Take two: combining immunotherapy with epigenetic drugs to tackle cancer. *Nat. Med.* 22(1), 8–10 (2016).
- 39 Chiappinelli KB, Zahnow CA, Ahuja N, Baylin SB. Combining epigenetic and immunotherapy to combat cancer. *Cancer Res.* 76(7), 1683–1689 (2016).
- 40 Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP *et al.* Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Discov.* 1(7), 598–607 (2011).
- 41 Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L *et al.* Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 373(17), 1627–1639 (2015).
- 42 Falchi L, Sawas A, Deng C *et al.* High rate of complete responses to immune checkpoint inhibitors in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma previously exposed to epigenetic therapy. *J. Hematol. Oncol.* 9(1), 132 (2016).
- 43 Rébé C, Ghiringhelli F. Cytotoxic effects of chemotherapy on cancer and immune cells: how can it be modulated to generate novel therapeutic strategies? *Future Oncol.* 11(19), 2645–2654 (2015).
- 44 Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 28(6), 690–714 (2015).
- 45 Correale P, Tagliaferri P, Fioravanti A *et al.* Immunity feedback and clinical outcome in colon cancer patients undergoing chemoimmunotherapy with gemcitabine + FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and aldesleukin (GOLFIG-1 Trial). *Clin. Cancer Res.* 14(13), 4192–4199 (2008).
- 46 Correale P, Cusi MG, Tsang KY *et al.* Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 23(35), 8950–8958 (2005).
- 47 National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) – Colon Cancer (Version 1.2017). www.nccn.org
- 48 Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J. Mol. Diagn.* 10(4), 293–300 (2008).
- 49 Boland R, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al.* 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(22), 5248–5257 (1998).
- 50 Buhard O, Cattaneo F, Wong YF *et al.* Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status

- of human tumors. *J. Clin. Oncol.* 24(2), 241–251 (2006).
- 51 Umar A, Boland CR, Terdiman JP *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl Cancer Inst.* 96(4), 261–268 (2004).
- 52 Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 5(2), e9393 (2010).
- 53 Buhard O, Lagrange A, Guilloux A *et al.* HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J. Med. Genet.* 53(6), 377–384 (2016).
- 54 Colle R, Cohen R, Cochereau D *et al.* Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull. Cancer* 104(1), 42–51 (2017)

VII. Bibliographie

1. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchens MP (2015) Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 15:181–194
2. ©Les cancers en France, édition 2017, collection Les Données, Institut national du cancer, avril 2018.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
4. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812–816
5. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al (1993) Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53:5853–5855
6. Couzin-Frankel J (2013) Cancer Immunotherapy. *Science* 342:1432–1433
7. Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480–489
8. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al (2015) Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 372:2018–2028
9. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373:23–34
10. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al (2015) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin’s lymphoma. *N Engl J Med* 372:311–319
11. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders RA (2014) Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res* 20:5064–5074
12. Le DT, Uram JN, Wang H, et al (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372:2509–2520
13. Li G-M (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18:85–98
14. Hewish M, Lord CJ, Martin SA, Cunningham D, Ashworth A (2010) Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 7:197–208
15. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al (2011) Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 17:1283–1289

16. Duval A, Hamelin R (2002) Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers Toward a New Concept of Target Genes for Instability. *Cancer Res* 62:2447–2454
17. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674
18. Jonchere V, Marisa L, Greene M, et al (2018) Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 6:277–300
19. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa J-PJ (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8681–8686
20. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38:787–793
21. Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR (2014) The BRAF Oncoprotein Functions Through the Transcriptional Repressor MAFK to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype. *Mol Cell* 55:904–915
22. Gallois C, Laurent-Puig P, Taieb J (2016) Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol* 99:74–80
23. Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1:157–162
24. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, et al (2011) Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. *JAMA* 305:2304–2310
25. Colas C, Coulet F, Svrcek M, Collura A, Fléjou J-F, Duval A, Hamelin R (2012) Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res* 113:121–166
26. Wimmer K, Kratz CP, Vasen HFA, et al (2014) Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium “care for CMMRD” (C4CMMRD). *J Med Genet* 51:355–365
27. Bodo S, Colas C, Buhard O, et al (2015) Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome Based on Microsatellite Instability and Lymphocyte Tolerance to Methylating Agents. *Gastroenterology* 149:1017-1029.e3
28. Lavoine N, Colas C, Muleris M, et al (2015) Constitutional mismatch repair deficiency syndrome: clinical description in a French cohort. *J Med Genet* 52:770–778
29. Colle R, Cohen R, Cochereau D, et al (2017) Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull Cancer (Paris)* 104:42–51

30. Schwark AL, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, Dubard-Gault M (2018) Pan-cancer microsatellite instability to predict for presence of Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 36:suppl; abstr LBA1509
31. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ (2016) Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 22:1342–1350
32. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357:409–413
33. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y, Kim T-M, Park PJ (2017) A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 8:15180
34. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202–209
35. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa J-PJ (1999) Aberrant Methylation in Gastric Cancer Associated with the CpG Island Methylator Phenotype. *Cancer Res* 59:5438–5442
36. Pal T, Permeth-Wey J, Sellers TA (2008) A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer* 113:733–742
37. 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 Off J Am Soc Clin Oncol* 34:3062–3068
38. Shia J (2008) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn JMD* 10:293–300
39. Overbeek LIH, Ligtenberg MJL, Willems RW, et al (2008) Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* 32:1246–1251
40. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006) Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair. *Cell* 126:297–308
41. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996) hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci* 93:13629–13634
42. 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* 58:5248–5257
43. 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* 96:261–268

44. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, Seruca R, Iacopetta B, Hamelin R (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 123:1804–1811
45. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R (2004) Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 20:251–257
46. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou J-F, Duval A, Hamelin R (2006) Multipopulation Analysis of Polymorphisms in Five Mononucleotide Repeats Used to Determine the Microsatellite Instability Status of Human Tumors. *J Clin Oncol* 24:241–251
47. 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* 146:401-411.e1
48. 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* 53:377–84
49. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34:424–425
50. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453–1456
51. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al (2008) Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26:5783–5788
52. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al (2012) Identification of Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *JAMA* 308:1555
53. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, Lauwers GY, Iafrate AJ, Chung DC (2017) A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod. Pathol.*
54. Newton K, Jorgensen NM, Wallace AJ, Buchanan DD, Lalloo F, McMahon RFT, Hill J, Evans DG (2014) Tumour MLH1 promoter region methylation testing is an effective prescreen for Lynch Syndrome (HNPCC). *J Med Genet* 51:789–796
55. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB (2012) Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 49:151–157
56. Leclerc J, Flament C, Lovecchio T, et al (2018) Diversity of genetic events associated with MLH1 promoter methylation in Lynch syndrome families with heritable

- constitutional epimutation. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. doi: 10.1038/gim.2018.47
57. Goel A, Nguyen T-P, Leung H-CE, et al (2011) De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int J Cancer* 128:869–878
 58. Boland CR (2016) Recent discoveries in the molecular genetics of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 15:395–403
 59. Mas-Moya J, Dudley B, Brand RE, Thull D, Bahary N, Nikiforova MN, Pai RK (2015) Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum Pathol* 46:1616–1625
 60. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364:2507–2516
 61. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, et al (2017) Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. doi: 10.1093/jnci/djw272
 62. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ (2015) Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 112:1888–94
 63. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al (2015) Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 51:587–594
 64. Cohen R, Cervera P, Svrcek M, Pellat A, Dreyer C, de Gramont A, André T (2017) BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr Treat Options Oncol*. doi: 10.1007/s11864-017-0453-5
 65. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, et al (2017) Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Ann Oncol* 28:562–568
 66. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, et al (2015) FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00122-9
 67. Freitas M, Ferreira F, Carvalho S, et al (2018) A novel DNA methylation panel accurately detects colorectal cancer independently of molecular pathway. *J Transl Med* 16:45
 68. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J (2018) Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 7:746–756

69. Stadler ZK, Battaglin F, 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* 34:2141–2147
70. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M (2008) Immune Response Against Frameshift-Induced Neopeptides in HNPCC Patients and Healthy HNPCC Mutation Carriers. *Gastroenterology* 134:988–997
71. Germano G, Lamba S, Rospo G, et al (2017) Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature* 552:116
72. Parsons R, Li G-M, Longley MJ, Fang W, Papadopoulos N, Jen J, Chapelle A de la, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75:1227–1236
73. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, et al (2015) Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res* 75:3446–3455
74. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macrì E, Fornasarig M, Boiocchi M (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 154:1805–1813
75. Jass JR (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50:113–130
76. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, von Knebel Doeberitz M, Kloor M (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* 92:1746–1753
77. Young J, Simms LA, Biden KG, et al (2001) Features of Colorectal Cancers with High-Level Microsatellite Instability Occurring in Familial and Sporadic Settings: Parallel Pathways of Tumorigenesis. *Am J Pathol* 159:2107–2116
78. Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Møller P, Rognum TO (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849–5852
79. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21:1350–1356
80. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M (2010) Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer* 127:1001–1010
81. 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* 5:43–51

82. Marisa L, Svrcek M, Collura A, et al (2018) The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst.* doi: 10.1093/jnci/djx136
83. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN (2016) CANCER IMMUNOLOGY. The “cancer immunogram.” *Science* 352:658–660
84. Bast RC, Zbar B, Borsos T, Rapp HJ (1974) BCG and cancer. *N Engl J Med* 290:1458–1469
85. Morales A, Eidinger D, Bruce AW (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116:180–183
86. Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H, Akaza H (2013) Bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci* 104:22–27
87. Jayson GC, Middleton M, Lee SM, Ashcroft L, Thatcher N (1998) A randomized phase II trial of interleukin 2 and interleukin 2-interferon alpha in advanced renal cancer. *Br J Cancer* 78:366–369
88. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F (2007) Interferon- α and cancer: Mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* 89:884–893
89. Rosenberg SA (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411:380–384
90. Svane IM, Verdegaal EM (2014) Achievements and challenges of adoptive T cell therapy with tumor-infiltrating or blood-derived lymphocytes for metastatic melanoma: what is needed to achieve standard of care? *Cancer Immunol Immunother CII* 63:1081–1091
91. Weber J, Atkins M, Hwu P, Radvanyi L, Sznol M, Yee C, Immunotherapy Task Force of the NCI Investigational Drug Steering Committee (2011) White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:1664–1673
92. Rosenbaum L (2017) Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. *N Engl J Med* 377:1313–1315
93. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al (2017) Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377:2531–2544
94. Tran E, Longo DL, Urba WJ (2017) A Milestone for CAR T Cells. *N Engl J Med* 377:2593–2596
95. Raj D, Yang M-H, Rodgers D, et al (2018) Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut.* doi: 10.1136/gutjnl-2018-316595
96. Jindal V, Arora E, Gupta S (2018) Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T cell therapy in solid tumors. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 35:87

97. June CH, Sadelain M (2018) Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* 379:64–73
98. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al (2016) Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 375:2561–2569
99. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, et al (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 363:711–723
100. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364:2517–2526
101. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, et al (2017) Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 377:1824–1835
102. Ribas A (2012) Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *N Engl J Med* 366:2517–2519
103. Ribas A, Wolchok JD (2018) Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359:1350–1355
104. Ribas A, Hersey P, Middleton MR, Gogas H, Flaherty KT, Sondak VK, Kirkwood JM (2012) New Challenges in Endpoints for Drug Development in Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res* 18:336–341
105. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, et al (2018) Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 378:1277–1290
106. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515:558–562
107. Koshkin VS, Grivas P (2018) Emerging Role of Immunotherapy in Advanced Urothelial Carcinoma. *Curr Oncol Rep* 20:48
108. Aoun F, Rassy EE, Assi T, Albisinni S, Katan J (2017) Advances in urothelial bladder cancer immunotherapy, dawn of a new age of treatment. *Immunotherapy* 9:451–460
109. 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. *The Lancet* 387:1909–1920
110. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al (2018) Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 378:2078–2092
111. Lee CK, Man J, Lord S, Links M, GebSKI V, Mok T, Yang JC-H (2017) Checkpoint Inhibitors in Metastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer-A Meta-Analysis. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 12:403–407
112. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373:1627–1639

113. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al (2015) Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348:124–128
114. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9:34
115. Overman MJ, Bergamo F, McDermott RS, Aglietta M, Chen F, Gelsomino F, Morse MA (2018) Nivolumab in patients with DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high (dMMR/MSI-H) metastatic colorectal cancer (mCRC): Long-term survival according to prior line of treatment from CheckMate-142. *J Clin Oncol* 36:abstr 554
116. Le DT, Kavan P, Won Kim T, et al (2018) KEYNOTE-164: Pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer. *J Clin Oncol* 36:abstr 3514
117. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al (2018) Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* JCO.2017.76.9901
118. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18:1182–1191
119. Patnaik A, Kang SP, Rasco D, et al (2015) Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 21:4286–4293
120. 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* 366:2443–2454
121. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al (2012) Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* 366:2455–2465
122. Diaz LA, Uram JN, Wang H, et al (2016) Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient cancer independent of tumor histology. *J Clin Oncol* 34:suppl; abstr 3003
123. Le DT, Uram JN, Wang H, et al (2016) Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Oncol* 34:suppl; abstr 103
124. Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, et al (2016) Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 54:139–148
125. 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* 349:247–257

126. 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* 28:3219–3226
127. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al (2011) DNA Mismatch Repair Status and Colon Cancer Recurrence and Survival in Clinical Trials of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy. *J Natl Cancer Inst* 103:863–875
128. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al (2011) Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF Mutations in Predicting Recurrence and Benefits From Chemotherapy in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 29:1261–1270
129. 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* 28:466–474
130. Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S (2015) Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Ann Oncol* 26:1236–132
131. 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 pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *J Clin Oncol* 32:suppl; abstr 3507
132. Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, Nelson GD, Goldberg RM, Sargent DJ, Alberts SR (2013) Prognostic Impact of Deficient DNA Mismatch Repair in Patients With Stage III Colon Cancer From a Randomized Trial of FOLFOX-Based Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 31:3664–3672
133. Brueckl WM, Moesch C, Brabletz T, et al (2003) Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy. *Anticancer Res* 23:1773–1777
134. Des Guetz G, Mariani P, Cucherousset J, et al (2007) Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 27:2715–2719
135. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, Punt CJA, van Krieken JHJM (2009) Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 100:266–273
136. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J (2011) Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117:4623–4632
137. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al (2014) Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clin Cancer Res* 20:5322–5330

138. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al (2004) Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N Engl J Med* 350:2343–2351
139. Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, et al (2010) Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 21:772–780
140. Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I, et al (2016) Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study. *J Natl Cancer Inst* 108:djv438
141. André T, Gramont A de, Vernerey D, et al (2015) Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 33:4176–4187
142. Gavin PG, Paik S, Yothers G, Pogue-Geile KL (2013) Colon Cancer Mutation: Prognosis/Prediction–Response. *Clin Cancer Res* 19:1301–1301
143. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al (2012) Mutation Profiling and Microsatellite Instability in Stage II and III Colon Cancer: An Assessment of Their Prognostic and Oxaliplatin Predictive Value. *Clin Cancer Res* 18:6531–6541
144. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, et al (2018) Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 378:1177–1188
145. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, Esser R, Lenz H-J, Heinemann V (2016) Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol*. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3797
146. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, et al (2017) iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 18:e143–e152
147. Kim TK, Herbst RS, Chen L (2018) Defining and Understanding Adaptive Resistance in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol*. doi: 10.1016/j.it.2018.05.001
148. Kopetz S, André T, Overman MJ, Zagonel V, Lonardi S, Aglietta M, Gelsomino F (2018) Exploratory analysis of Janus kinase 1 (JAK1) loss-of-function (LoF) mutations in patients with DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high (dMMR/MSI-H) metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with nivolumab plus ipilimumab in CheckMate-142. *Proc Am Assoc Cancer Res* 59:abstr 2603
149. Sveen A, Johannessen B, Tengs T, et al (2017) Multilevel genomics of colorectal cancers with microsatellite instability—clinical impact of JAK1 mutations and consensus molecular subtype 1. *Genome Med*. doi: 10.1186/s13073-017-0434-0
150. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al (2016) Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* 375:819–829

151. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, et al (2016) Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov*. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1223
152. Cohen R, Buhard O, Cervera P, et al (2017) Clinical and molecular characterisation of hereditary and sporadic metastatic colorectal cancers harbouring microsatellite instability/DNA mismatch repair deficiency. *Eur J Cancer* 86:266–274
153. Zhang L (2008) Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing for Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Part II. The Utility of Microsatellite Instability Testing. *J Mol Diagn* 10:301–307
154. 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* 33:1639
155. How-Kit A, Daunay A, Buhard O, Meiller C, Sahbatou M, Collura A, Duval A, Deleuze J-F (2017) Major improvement in the detection of microsatellite instability in colorectal cancer using HSP110 T17 E-ice-COLD-PCR. *Hum Mutat*. doi: 10.1002/humu.23379
156. Ferrara R, Mezquita L, Texier M, et al (2018) Hyperprogressive Disease in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated With PD-1/PD-L1 Inhibitors or With Single-Agent Chemotherapy. *JAMA Oncol*. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3676
157. Champiat S, Derclé L, Ammari S, et al (2017) Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 23:1920–1928
158. Kopetz S, Lonardi S, McDermott RS, Aglietta M, Hendlisz A, Morse MA, Leach J, Neyns B, Chan E, Chen F (2018) Concordance of DNA mismatch repair deficient (dMMR)/microsatellite instability (MSI) assessment by local and central testing in patients with metastatic CRC (mCRC) receiving nivolumab (nivo) in CheckMate 142 study. *J Clin Oncol* 35:suppl; abstr 3548
159. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al (2018) Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol*. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4942
160. Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, Peltomäki P, Thompson B, Den Dunnen JT, Macrae F (2013) The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Fam Cancer* 12:175–180
161. Salem M, Grothey A, Kim E, Xiu J, Goldberg RM, Korn WM, Shields AF, Seeber A (2018) Impact of MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 alterations on tumor mutation burden (TMB) and PD-L1 expression in 1,057 microsatellite instability-high (MSI-H) tumors. *J Clin Oncol* 36:abstr 3572

162. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Eyries M, Svrcek M, Bardier-Dupas A, Parc Y, Soubrier F (2012) Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 12:27–33
163. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst–Stams WAG, Goossens M, Ouchene H, Hendriks–Cornelissen SJB, Kwint MP, Hoogerbrugge N, Nagtegaal ID, Ligtenberg MJL (2014) Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. *Gastroenterology* 146:643–646.e8
164. Ligtenberg MJL, 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* 41:112–117
165. Crépin M, Dieu M-C, Lejeune S, Escande F, Boidin D, Porchet N, Morin G, Manouvrier S, Mathieu M, Buisine M-P (2012) Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum Mutat* 33:180–188
166. Castillejo A, Hernández-Illán E, Rodríguez-Soler M, et al (2015) Prevalence of MLH1 constitutional epimutations as a cause of Lynch syndrome in unselected versus selected consecutive series of patients with colorectal cancer. *J Med Genet* 52:498–502
167. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, et al (2013) BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch* 463:613–621
168. Rodríguez–Soler M, Pérez–Carbonell L, Guarinos C, et al (2013) Risk of Cancer in Cases of Suspected Lynch Syndrome Without Germline Mutation. *Gastroenterology* 144:926–932.e1
169. Xicola RM, Llor X, Pons E, et al (2007) Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 99:244–252
170. Hall G, Clarkson A, Shi A, Langford E, Leung H, Eckstein RP, Gill AJ (2010) Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology (Phila)* 42:409–413
171. Hicks SC, Ward RL, Hawkins NJ (2011) Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology (Phila)* 43:84–85
172. Pearlman R, Markow M, Knight D, Chen W, Arnold CA, Pritchard CC, Hampel H, Frankel WL (2018) Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol* 1
173. Timmermann B, Kerick M, Roehr C, et al (2010) Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PloS One* 5:e15661

174. Zhu L, Huang Y, Fang X, Liu C, Deng W, Zhong C, Xu J, Xu D, Yuan Y (2017) A Novel and Reliable Method to Detect Microsatellite Instability in Colorectal Cancer by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn JMD*. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.007
175. Hall MJ, Gowen K, Sanford EM, et al (2016) Evaluation of microsatellite instability (MSI) status in 11,573 diverse solid tumors using comprehensive genomic profiling (CGP). *J Clin Oncol suppl*; abstr 1523
176. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC (2014) Microsatellite Instability Detection by Next Generation Sequencing. *Clin Chem* 60:1192–1199
177. Waalkes A, Smith N, Penewit K, Hempelmann J, Konnick EQ, Hause RJ, Pritchard CC, Salipante SJ (2018) Accurate Pan-Cancer Molecular Diagnosis of Microsatellite Instability by Single-Molecule Molecular Inversion Probe Capture and High-Throughput Sequencing. *Clin Chem* 64:950–958
178. Prasad V (2018) Why the US Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS) should have required a randomized trial of Foundation Medicine (F1CDx) before paying for it. *Ann Oncol* 29:298–300
179. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, et al (2018) Assessment of Tumor Sequencing as a Replacement for Lynch Syndrome Screening and Current Molecular Tests for Patients With Colorectal Cancer. *JAMA Oncol* 4:806–813
180. Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, et al (2016) STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ Open* 6:e012799
181. Remon J, Caramella C, Jovelet C, et al (2017) Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 28:784–790
182. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, et al (2018) RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGE0 RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 29:1211–1219
183. Goldberg SB, Patel AA (2018) Monitoring immunotherapy outcomes with circulating tumor DNA. *Immunotherapy* 10:1023–1025
184. Cabel L, Proudhon C, Romano E, Girard N, Lantz O, Stern M-H, Pierga J-Y, Bidard F-C (2018) Clinical potential of circulating tumour DNA in patients receiving anticancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15:639–650
185. Koeppel F, Blanchard S, Jovelet C, et al (2017) Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS One* 12:e0188174
186. Routy B, Chatelier EL, Derosa L, et al (2018) Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359:91–97
187. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al (2018) Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 359:97–103

188. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, et al (2018) Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* 4:351–357
189. Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, et al (2018) Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 29:1437–1444
190. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30789-X
191. 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* 313:1960–1964
192. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al (2016) Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44:698–711
193. Pagès F, Berger A, Camus M, et al (2005) Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 353:2654–2666
194. Cohen R, Cervera P, Svrcek M, et al (2015) [DNA mismatch repair and BRAF status in colorectal cancer: Interest for the therapeutic management?]. *Bull Cancer (Paris)* 102:S72-81
195. Cohen R, Svrcek M, Duval A, Parc Y, Osterlund PP, André T (2017) Immune checkpoint inhibitors for patients with colorectal cancer: mismatch repair deficiency and perspectives. *Colorectal Cancer*. doi: 10.2217/crc-2017-0004