



HAL
open science

Modélisation statistique de la valeur pronostique d'un paramètre et proposition d'un score intégratif: application dans le cancer du colon localisé

Édouard Auclin

► **To cite this version:**

Édouard Auclin. Modélisation statistique de la valeur pronostique d'un paramètre et proposition d'un score intégratif: application dans le cancer du colon localisé. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCE010 . tel-03201801

HAL Id: tel-03201801

<https://theses.hal.science/tel-03201801v1>

Submitted on 19 Apr 2021

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

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

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE Ecole Doctorale n°554

DOCTORAT DE SANTE PUBLIQUE
EPIDEMIOLOGIE ET RECHERCHE CLINIQUE

**MODELISATION STATISTIQUE DE LA VALEUR PRONOSTIQUE
D'UN PARAMETRE ET PROPOSITION D'UN SCORE INTEGRATIF :
APPLICATION DANS LE CANCER DU COLON LOCALISE**

Edouard AUCLIN
Né le 13 mai 1987

Thèse codirigée par le Professeur Christophe BORG et le Docteur Dewi VERNEREY

Thèse présentée et soutenue à Paris le 18 Décembre 2019

Composition du jury :

Président : Professeur Michel DUCREUX

Examineur : Professeur Julien TAIEB

Rapporteur : Professeur Jean-Baptiste BACHET

Rapporteur : Professeur Christophe TOURNIGAND

Directeur : Professeur Christophe BORG

Co directeur : Docteur Dewi VERNEREY

REMERCIEMENTS

Au Professeur Franck Bonnetain, qui nous a quittés, merci d'avoir été à la genèse de ce travail de thèse.

Au Docteur Dewi Vernerey, merci pour ton encadrement et ta patience. Tu m'as appris la rigueur et la précision, toujours dans la bonne humeur. J'espère que ce travail n'est que le début d'une longue collaboration.

Au Professeur Julien Taieb, de m'avoir suivi depuis mon premier semestre, et d'avoir fait naître en moi l'envie d'aller toujours plus loin. J'espère pouvoir continuer à apprendre à vos côtés malgré mon changement de service.

Au Professeur Christophe Borg, d'avoir repris le flambeau du Professeur Bonnetain, et de m'avoir permis de poursuivre ce travail entamé avec lui.

Je remercie sincèrement chacun des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse : Professeur Michel Ducreux, d'avoir accepté d'être le président de mon jury, Professeurs Jean-Baptiste Bachet et Christophe Tournigand, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

A tous mes collègues de l'Unité de Méthodologie et Qualité de Vie en Oncologie de l'hôpital de Besançon : Sophie Paget-Bailly, Julie Henriques, merci pour votre gentillesse et bonne humeur, grâce à vous mes venues à Besançon étaient bien agréables !

Au service d'Oncologie digestive de l'Hôpital Européen Georges Pompidou : Docteur Céline Lepère, Docteur Bruno Landi, Docteur Jean-Nicolas Vaillant, Docteur Géraldine Perkins, Docteur Aziz Zaanani, Docteur Claire Gallois, Docteur Clélia Coutzac, Docteur Simon Pernot, Docteur Alexandra Lapeyre-Prost, Docteur Widad Lahlou, Stéphanie Gaudin. Votre bienveillance à mon égard m'a permis de terminer ce travail de thèse.

Au Docteur Claire Gallois, merci d'avoir partagé mon bureau pendant ces deux merveilleuses années d'assistantat, et d'avoir été bon public à mes blagues ;-).

A tous les médecins qui ont compté dans ma jeune carrière : Professeur Karim Fizazi, Professeur Christophe Massard, Professeur Stéphane Oudard, Professeur Olivier Lortholary, Docteur Laurence Albigès, Docteur David Lebeaux, Docteur Elizabeth Fabre.

Au Docteur Laura Mezquita et au Professeur Benjamin Besse, de m'avoir intégré dans le Comité poumon de l'Institut Gustave Roussy et de m'avoir permis de maintenir le lien avec cette institution que j'aime tant et de m'épanouir dans la recherche.

Au Docteur Claire Petit, co interne, co master 2, co thésarde, et amie depuis de longues années.

Au Docteur Constance Thibault pour ton oreille attentive et tes conseils avisés. A très vite au 4ème étage pour de nouvelles aventures !

Au Docteur Ronan Flippot, merci pour ton humour, ton amitié et la motivation que tu fais naître en moi !

Aux Docteurs Frédéric Bigot, Clément Bonnet, Raphaël Colle, Antoine Schernberg et Romain Geiss, pour votre amitié.

Au Docteur Elie Kassouf, même à distance nos liens sont restés forts.

A tous mes amis proches, qui m'ont permis d'avancer pendant ces trois années : Olivier et Cécile Guerrier (et Jeanne), l'équipe de la Triflette, Marie et Julien, Marie et FX, Henri.

A ma famille, toujours présente depuis le premier jour de la P1 : mes parents, Astrid et Julien.

A Martial et Augustine, qui remplissent ma vie de bonheur et d'amour.

LISTE DES ARTICLES PUBLIES COMPOSANT LA THESE

- ❖ **Subgroups and Prognostication in Stage III Colon Cancer: Future Perspectives for Adjuvant Therapy.**

Auclin E, Zaanan A, Vernerey D, Douard R, Gallois C, Laurent-Puig P, Bonnetain F, Taieb J.
Ann Oncol. **2017** Jan 27.

- ❖ **Low-level postoperative carcinoembryonic antigen improves survival outcomes stratification in patients with stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments.**

Auclin E, André T, Taieb J, Benetkiewicz M, de Gramont A, Vernerey D.
Eur J Cancer. **2018** Jul;97:55-56. doi:10.1016/j.ejca.2018.03.032. Epub 2018 May 3. PubMed PMID: 29731226.

- ❖ **Association of post-operative CEA with survival and oxaliplatin benefit in patients with stage II colon cancer : a post hoc analysis of the MOSAIC trial.**

Auclin E, André T, Taieb J, Banzi M, Van Laethem JL, Tabernero J, Hickish T, de Gramont A, Vernerey D.
Br J Cancer. **2019 Jul 12.** doi: 10.1038/s41416-019-0521-7.

- ❖ **Carcinoembryonic Antigen Levels and Survival in Stage III Colon Cancer : *Post hoc* Analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials.**

Auclin E, Taieb J, Lepage C, Aparicio T, Faroux R, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Benetkiewicz M, Banzi M, Louvet C, Van Laethem JL, Tabernero J, Hickish T, de Gramont A, André T, Vernerey D.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **2019 Jul;28(7):1153-1161.** doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0867.

VALORISATION SCIENTIFIQUE DES TRAVAUX DE LA THESE

- ❖ **Association of post-operative CEA with survival and oxaliplatin benefit in patients with stage II colon cancer : a post hoc analysis of the MOSAIC trial.**

Auclin E, André T, Taieb J, Banzi M, Van Laethem JL, Tabernero J, Hickish T, de Gramont A, Vernerey D.

Br J Cancer. 2019 Jul 12. doi: 10.1038/s41416-019-0521-7.

Poster Discussion, European Society of Medical Oncology Congress, 2018

- ❖ **Carcinoembryonic Antigen Levels and Survival in Stage III Colon Cancer : *Post hoc* Analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials.**

Auclin E, Taieb J, Lepage C, Aparicio T, Faroux R, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Benetkiewicz M, Banzi M, Louvet C, Van Laethem JL, Tabernero J, Hickish T, de Gramont A, André T, Vernerey D.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2019 Jul;28(7):1153-1161. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0867.

Poster Presentation, American Society of Clinical Oncology Congress, 2018

- ❖ **Precise analysis of prognostic factors in stage III colon cancer and construction of a prognostic score : post-hoc analysis of the PETACC-8 study**

Auclin E, Vernerey D, Lepage C, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Van Laethem JL, Tabernero J, Blons H, Laurent-Puig P, Taieb J. *En cours de préparation.*

Poster, Journée Francophones de Hépatogastro-entérologie et Oncologie Digestive, 2017

RESUME

L'étude du pronostic des patients, c'est-à-dire la capacité à prédire la survenue d'un événement, est une problématique centrale en Oncologie. Plusieurs recommandations existent sur la bonne pratique pour l'étude d'un paramètre et la création d'un score pronostique, notamment une méthodologie développée par D. Vernerey (NNT : 2016BESA3004) ainsi que des recommandations concernant le rapport des résultats (*TRIPODS statements*). L'intérêt de l'étude du pronostic des patients dans le cancer du colon localisé est triple: i) aider à la prise de décision pour l'introduction d'une chimiothérapie adjuvante chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade II ii) diminuer le sur-traitement par chimiothérapie après une chirurgie chez les patients ayant un cancer du colon de stade III et ainsi réduire les séquelles neurologiques liées à l'oxaliplatine, iii) aider à la stratification et au design des essais thérapeutiques.

Les objectifs de cette thèse étaient de résumer les facteurs pronostiques connus dans les cancers du colon localisé, et notamment les cancers du colon de stade III, d'identifier et de s'approprier une méthodologie adaptée pour l'évaluation précise des paramètres potentiellement associés avec la survie, et d'appliquer cette méthodologie pour la création d'un outil pronostique visant à expliquer le plus précisément possible le pronostic des patients atteints d'un cancer du colon localisé.

Dans un premier temps, nous avons analysé de façon précise la valeur pronostique du dosage biologique d'un marqueur tumoral connu de longue date : l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). En effet, celui-ci est utilisé de façon peu précise dans la littérature avec un seuil de positivité très débattu. Nous avons montré que les patients ayant une valeur de l'ACE en post-opératoire considérée comme normale selon les seuils usuels constituaient une population très hétérogène en terme de risque de rechute et de décès. Nous avons modélisé la relation entre l'ACE et les survies sans maladie et globale, puis validé un seuil inférieur à celui utilisé usuellement pour la détection optimale du risque de progression et de décès. Cette étude a été menée dans 2 cohortes différentes : une cohorte de patients ayant un cancer du colon de stade II (étude MOSAIC), et une cohorte de patients traités pour un cancer du colon de stade III (étude MOSAIC puis validation externe dans l'étude PETACC-8). Chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade II à haut risque de rechute, le dosage de l'ACE permettait d'identifier les patients bénéficiant de l'ajout de l'oxaliplatine à une chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidines seules.

Après avoir validé la méthodologie de Vernerey et al pour l'étude d'un paramètre pronostique, nous avons appliqué ses recommandations pour la création d'un score pronostique dans le cancer du colon de stade III. Dans cette optique plusieurs modèles ont été créés afin de déterminer l'apport des différents groupes de variables à notre disposition (clinique, anatomopathologiques, biologiques, et moléculaires) dans l'estimation du pronostic de ces patients. Nous avons montré que l'ajout successif de ces différents paramètres améliorerait significativement l'estimation du pronostic des patients. Enfin, à partir d'un modèle regroupant toutes ces variables, nous avons, toujours en suivant une méthodologie rigoureuse, créé un score pronostique et un nomogramme permettant d'expliquer avec des bonnes performances la survie sans maladie (c-index 0,70) et la survie globale (c-index 0,73). Ces outils n'avaient pas de caractère prédictif pour prédire le bénéfice de l'ajout du cetuximab à une chimiothérapie par FOLFOX chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade III et inclus dans l'étude PETACC-8. Cette étude nécessitera une validation externe dans le futur.

En conclusion, une approche méthodologique rigoureuse permet de mieux évaluer et exploiter des facteurs pronostiques, même connus, et de créer des outils permettant de répondre à des questions cliniques contemporaines pertinentes.

SUMMARY

The study of patients' prognosis, that is to say the ability to predict the occurrence of an event, is a central issue in oncology. Several guidelines for the study of the prognostic capacity of a factor and the creation of a prognostic score exist, in particular the one by D. Vernerey et al (NNT 2016BESA3004) for the methodology and the statistical tools and the TRIPOD statement for the reporting of the results. The aims of studying prognosis for patients with a localized colon cancer are: i) to help clinician decide whether adjuvant chemotherapy should be administered for stage II colon cancer, ii) to decrease over treatment for stage III colon cancer and thus decrease the oxaliplatin related neuropathy, iii) to better stratify and design the clinical trials.

The aims of this PhD thesis were, firstly, to summarize the known prognostic factors for localized colon cancer (specifically for stage III colon cancer), secondly to identify and better understand an appropriate and rigorous methodology for the precise evaluation of a prognostic factor and score, and finally to apply this methodology in order to construct a prognostic tool for the prediction of recurrence or death in localized colon cancer.

The first step of this work was to analyse precisely the prognostic value of a well known underestimated biological marker: the carcinoembryonic antigen (CEA). Indeed, the cut-point value for "normal" CEA is debated in the literature. We showed that patients with a value of post operative CEA considered as normal were in fact a very heterogeneous population in term of risk of recurrence and death. We modelled the relation between CEA level and disease free and overall survivals, and then we validated a lower cut-point value for CEA that better predicted the risk of recurrence or death. This work was led in two cohorts: one of stage II colon cancer (MOSAIC trial), and one of stage III colon cancer (MOSAIC trial and external validation in the PETACC-8 trial). In the patients with stage II colon cancer, we found a predictive value of the CEA level: only patients with high risk stage II colon cancer with a high post operative CEA level benefited from the oxaliplatin addition to the fluorouracile chemotherapy backbone.

The second step of this work was to apply Vernerey's methodology for the creation of a prognostic score in stage III colon cancer. In this study, we created four models in order to analyse the input of different kinds of variables in the prognosis assessment: clinical, pathological, biological, and molecular variables. We showed that the addition of pathological, biological and molecular variables increased significantly the performance of the prediction model. Then we created a score and a nomogram for each survival endpoint with a good discrimination (c-index=0.70 for disease free survival, and 0.73 for overall survival). However, no predictive value was found for these scores in term of chemotherapy benefit. This study will have to be validated externally.

To conclude, a rigorous methodological approach leads to better evaluation and utilisation of prognostic factors, and helps create effective prognostic tools and answer relevant clinical questions.

LABORATOIRE D'ACCUEIL

Unité de Méthodologie et Qualité de Vie en Oncologie (Dr Dewi Vernerey)

INSERM UMR1098 RIGHT,

Unité de recherche « Interactions Hôte-Greffon-Tumeur & Ingénierie Cellulaire et Génique »,

Besançon, France

Directeur : Pr Philippe SAAS

LISTE DES ABBREVIATIONS

5FU : 5-fluorouracile

ACE : antigène carcinoembryonnaire

DFS : *disease free survival*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

ESMO : *European Society of Medical Oncology*

FOLFOX : 5FU + oxaliplatine

HR : *hazard ratio*

IC95% : intervalle de confiance à 95%

LV5FU2 : leucovorine + 5FU

MSI : microsatellites instables

MSS : microsatellites stables

MMR : *mismatch repair*, pMMR : *proficient*, dMMR : *deficient*

OS : *overall survival*

SSM : survie sans maladie

SG : survie globale

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	15
1.1	Cancer du colon épidémiologie et principales caractéristiques	15
1.1.1	Epidémiologie.....	15
1.1.2	Histologie et classification.....	15
1.2	Cancer du colon localisé, traitement	17
1.2.1	Stades I et II	17
1.2.2	Stades III	18
1.2.3	Délai d'introduction du traitement adjuvant.....	21
1.2.4	Durée du traitement adjuvant	21
1.3	Facteurs pronostiques des cancers coliques localisés	22
1.3.1	Facteurs anatomopathologiques	22
1.3.2	Facteurs immunologiques.....	23
1.3.3	Facteurs moléculaires	24
1.4	Signatures moléculaires, scores pronostiques et nomogrammes	26
1.4.1	Signatures moléculaires	26
1.4.2	Scores pronostiques et nomogrammes	27
1.5	Les recommandations pour le rapport transparent d'un modèle de prédiction multivarié pour l'estimation du pronostic ou du diagnostic (<i>TRIPOD statements</i>).....	28
2	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	30
3	MATERIEL ET METHODOLOGIE	31
3.1	Données disponibles pour l'étude des facteurs pronostiques dans le cancer du colon adjuvant.....	31
3.1.1	Etude MOSAIC	31
3.1.2	Etude PETACC-8.....	32
3.2	Méthodologie de l'analyse d'un facteur pronostique	34
3.2.1	Choix et définition des événements d'intérêt	35
3.2.2	Relation entre variable continue et critère de jugement	37
3.2.2.1	Méthode des splines cubiques restreints	37
3.2.2.2	Polynômes fractionnaires.....	38
3.2.3	Catégorisation d'une variable quantitative et choix d'un seuil	39
3.2.3.1	Catégorisation avantages et inconvénients	39
3.2.3.2	Choix du seuil, méthode de maximisation du log-rank.....	40
3.2.4	Analyses de survie	40
3.2.4.1	Méthode de Kaplan Meier et test du log-rank.....	41
3.2.4.2	Modèle de Cox.....	41
3.2.4.2.1	Description du modèle de Cox.....	41
3.2.4.2.2	Conditions d'application du modèle de Cox	42
3.2.5	Bonnes pratiques pour la création d'un score pronostic et d'un nomogramme	
	43	
3.2.5.1	Construction du modèle multivarié	44
3.2.5.2	Colinéarité et facteurs de confusion	44
3.2.5.3	Transformation des variables quantitatives	46
3.2.5.4	Validation du modèle	46
3.2.5.4.1	Calibration.....	46
3.2.5.4.2	Discrimination	47

3.2.5.4.3	Validation interne et <i>bootstrap</i>	48
3.2.5.4.4	Validation externe.....	48
3.2.5.5	Valeurs manquantes (imputation multiple).....	49
3.2.6	Outils pronostiques	50
3.2.6.1	Approche individuelle : nomogramme	50
3.2.6.2	Approche populationnelle : calcul du score pronostique.....	53
3.2.6.3	Choix du nombre de groupes	56
3.3	Valeur prédictive	58
4	RESULTATS.....	60
4.1	Bilan de la littérature concernant les facteurs pronostiques dans le cancer du colon localisé de stade III	60
4.2	Développement d'un facteur pronostique : exemple de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)	71
4.2.1	Remise en question de la valeur seuil de l'ACE.....	71
4.2.1.1	Référence bibliographique	71
4.2.1.2	Rationnel	71
4.2.2	Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade II.....	75
4.2.2.1	Référence bibliographique	75
4.2.2.2	Introduction.....	75
4.2.2.3	Population de l'étude	76
4.2.2.4	Méthodologie	76
4.2.2.5	Résultats	77
4.2.2.5.1	Caractéristiques de la population	77
4.2.2.5.2	ACE post opératoire et survie	79
4.2.2.5.3	ACE comme facteur pronostique indépendant	80
4.2.2.5.4	Valeur prédictive du dosage post opératoire de l'ACE	81
4.2.2.6	Conclusions de l'étude	86
4.2.2.7	Manuscrit scientifique.....	86
4.2.3	Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade III.....	93
4.2.3.1	Référence bibliographique	93
4.2.3.2	Introduction.....	93
4.2.3.3	Population de l'étude	94
4.2.3.4	Méthodologie	94
4.2.3.5	Résultats	95
4.2.3.5.1	Caractéristiques des patients.....	95
4.2.3.5.2	Association du dosage post opératoire de l'ACE avec la survie sous sa forme continue.....	98
4.2.3.5.3	Association entre les critères de jugement et l'ACE sous sa forme catégorielle.....	98
4.2.3.5.4	ACE comme facteur pronostique indépendant	99
4.2.3.5.5	Valeur pronostique additionnelle de l'ACE au sein des groupes pronostiques déjà définis par la classification TNM	102
4.2.3.5.6	Bénéfice de la chimiothérapie selon le groupe de risque défini par l'ACE	103
4.2.3.6	Conclusions de l'étude	103
4.2.3.7	Manuscrit scientifique.....	103
4.3	Du facteur pronostique au score pronostique intégratif.....	113

4.3.1.1	Référence bibliographique	113
4.3.1.2	Introduction.....	113
4.3.1.3	Méthodologie	114
4.3.1.3.1	Patients	114
4.3.1.3.2	Analyse statistique	114
4.3.1.4	Résultats	115
4.3.1.4.1	Caractéristiques de la population de l'étude.....	115
4.3.1.4.2	Construction des modèles univariés et multivariés.....	118
4.3.1.4.3	Performance du modèle et validation interne	123
4.3.1.4.4	Création du nomogramme.....	125
4.3.1.4.5	Création des scores pronostiques.....	127
4.3.1.4.6	Valeur prédictive des scores pronostiques créés	129
4.3.1.5	Conclusions de l'étude	130
5	DISCUSSION	131
5.1	Discussion des travaux de la thèse.....	131
5.1.1	Bilan des travaux de la thèse.....	131
5.1.2	ACE dans les cancers du colon de stade II.....	132
5.1.3	ACE dans les cancers du colon de stade III.....	134
5.1.4	Score pronostique	135
5.2	Forces, limitations et perspectives.....	137
5.2.1	Forces et limitations des travaux de la thèse.....	137
5.2.1.1	Forces des travaux de la thèse	137
5.2.1.2	Limites des travaux de la thèse	137
5.2.2	Perspectives du travail	138
5.2.2.1	Prédiction de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante	138
5.2.2.2	Adaptation de la surveillance	139
5.2.2.3	Stratégie intégrative d'évaluation du pronostic	139
5.2.2.4	Stratégie de recherche clinique	140
5.2.2.5	Travaux en cours	141
REFERENCES DE LA THESE		

TABLE DES MATIERES SIMPLIFIEE

1	INTRODUCTION	15
1.1	Cancer du colon épidémiologie et principales caractéristiques	15
1.1.1	Epidémiologie.....	15
1.1.2	Histologie et classification.....	15
1.2	Cancer du colon localisé, traitement	17
1.2.1	Stades I et II	17
1.2.2	Stades III	18
1.2.3	Délai d'introduction du traitement adjuvant.....	21
1.2.4	Durée du traitement adjuvant	21
1.3	Facteurs pronostiques des cancers coliques localisés	22
1.3.1	Facteurs anatomopathologiques	22
1.3.2	Facteurs immunologiques.....	23
1.3.3	Facteurs moléculaires	24
1.4	Signatures moléculaires, scores pronostiques et nomogrammes	26
1.4.1	Signatures moléculaires	26
1.4.2	Scores pronostiques et nomogrammes	27
1.5	Les recommandations pour le rapport transparent d'un modèle de prédiction multivarié pour l'estimation du pronostic ou du diagnostic (<i>TRIPOD statements</i>).....	28
2	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	30
3	MATERIEL ET METHODOLOGIE	31
3.1	Données disponibles pour l'étude des facteurs pronostiques dans le cancer du colon adjuvant.....	31
3.1.1	Etude MOSAIC	31
3.1.2	Etude PETACC-8.....	32
3.2	Méthodologie de l'analyse d'un facteur pronostique	34
3.2.1	Choix et définition des événements d'intérêt	35
3.2.2	Relation entre variable continue et critère de jugement	37
3.2.3	Catégorisation d'une variable quantitative et choix d'un seuil	39
3.2.4	Analyses de survie	40
3.2.5	Bonnes pratiques pour la création d'un score pronostic et d'un nomogramme	43
3.2.6	Outils pronostiques	50
3.3	Valeur prédictive	58
4	RESULTATS.....	60
4.1	Bilan de la littérature concernant les facteurs pronostiques dans le cancer du colon localisé de stade III	60
4.2	Développement d'un facteur pronostique : exemple de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)	71
4.2.1	Remise en question de la valeur seuil de l'ACE.....	71
4.2.2	Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade II	75
4.2.3	Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade III.....	93
4.3	Du facteur pronostique au score pronostique intégratif.....	113
5	DISCUSSION	131
5.1	Discussion des travaux de la thèse.....	131
5.1.1	Bilan des travaux de la thèse.....	131

5.1.2	ACE dans les cancers du colon de stade II.....	132
5.1.3	ACE dans les cancers du colon de stade III.....	134
5.1.4	Score pronostique	135
5.2	Forces, limitations et perspectives.....	137
5.2.1	Forces et limitations des travaux de la thèse.....	137
5.2.2	Perspectives du travail	138

REFERENCES DE LA THESE

1 INTRODUCTION

1.1 Cancer du colon épidémiologie et principales caractéristiques

1.1.1 Epidémiologie

Le cancer du colon est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes et le second chez les femmes avec 44 872 nouveaux cas en France en 2017 dont 24 035 chez les hommes et 20 837 chez les femmes (1).

Le nombre de décès en France en 2017 était de 17 684 (9 294 chez les hommes, 8 390 chez les femmes). En comparaison, le cancer du poumon était le plus grand pourvoyeur de décès avec 49 109 en 2017.

Le cancer colique est diagnostiqué à un stade localisé dans 75% des cas. Dans 40 à 60% des cas, les patients développent des métastases, principalement hépatiques. Le cancer du colon est alors considéré comme incurable. En revanche, lorsqu'il est diagnostiqué à un stade localisé, il est curable dans 70% des cas lorsqu'il existe une atteinte des ganglions (stade III) et dans 85 à 95% des cas en absence d'envahissement ganglionnaire (stades I et II).

1.1.2 Histologie et classification

Sur le plan histologique, la très grande majorité des cas (90%) est représentée par les adénocarcinomes lieberkühniens, développés au sein des glandes de Lieberkühn. Ces glandes participent à l'absorption et à la digestion des aliments. Il s'agit de cellules positives pour la cytokératine (CK) 20, négatives pour la CK7, et positives pour le facteur de transcription CDX2. Les tumeurs microsatellites instables (MSI) ont tendance à être le plus souvent CK20 négatives (2).

Sur le plan moléculaire il est recommandé de rechercher des mutations de la voie des MAP kinases : *KRAS* et *NRAS* conférant une résistance aux anti EGFR, et *BRAF* pour son aspect pronostique et l'inclusion dans des essais thérapeutiques étudiant des thérapies anti BRAF. De même le statut microsatellitaire est recherché sur les tumeurs du colon. La présence d'une instabilité microsatellitaire est une voie d'oncogène bien connue dans les cancers du colon. Elle est le reflet d'une mauvaise réparation de l'ADN par les cellules tumorales.

Outre la confirmation du diagnostic et du type histologique, l'examen anatomopathologique permet la stadification du cancer colique. En effet, en suivant les critères de l'AJCC-UICC (8^e édition, 2017) les tumeurs sont classées en fonction de :

1. La profondeur de l'envahissement tumoral pariétal (stade T)
2. La présence et le nombre de ganglions envahis, le cas échéant (stade N)
3. La présence de métastases locorégionales détectées sur la pièce opératoire (carcinose péritonéale) ou à distance (stade M).

La classification TNM est résumée dans le tableau ci-dessous.

Critère	Description
T	T1 Tumeur envahissant la sous muqueuse
	T2 Tumeur envahissant la musculuse
	T3 Tumeur envahissant la sous séreuse
	T4 Tumeur pénétrant le péritoine viscéral et/ou envahissant au moins une structure/organe de voisinage
N	N0 Pas d'envahissement ganglionnaire
	1 à 3 ganglions régionaux envahis <ul style="list-style-type: none"> - N1a : métastase dans 1 ganglion N1 - N1b : métastases dans 2 à 3 ganglions - N1c : dépôts tumoraux satellites dans le sous séreuse ou dans le tissu péri colique
	Au moins 4 ganglions envahis <ul style="list-style-type: none"> N2 - N2a : 4 à 6 métastases ganglionnaires - N2b : plus de 7 métastases ganglionnaire
M	M0 Pas de métastase à distance
	M1 Présences de métastases à distance

Tableau : classification TNM des cancers coliques selon l'AJCC UICC 2017 (8^e édition).

1.2 Cancer du colon localisé, traitement

1.2.1 Stades I et II

Les cancers du colon de stade I sont définis par la présence d'une tumeur envahissant la musculature dans le pire des cas, sans atteinte ganglionnaire (pT1-2N0M0). La survie globale à 5 ans étant de 90% environ, il n'est pas recommandé de réaliser un traitement adjuvant après la chirurgie de la tumeur primitive (3,4).

Les cancers du colon de stade II sont définis par la présence d'une tumeur envahissant les organes de voisinage au pire, toujours en absence d'envahissement ganglionnaire (pT3-4N0M0) (5). La population des patients atteints d'un cancer du colon de stade 2 est très hétérogène. En effet, selon que la tumeur est classée pT3 ou pT4 la survie peut varier de 58,4% à 87,5% à 5 ans (5). Les données concernant le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade II restent débattues. Ces données proviennent principalement des études QUASAR, NSABP C01 et C02, et de la méta-analyse IMPACT-B2 (6,7).

Dans cette dernière, la chimiothérapie adjuvante n'apportait pas de bénéfice dans les cancers du colon de stade II. En effet, le bénéfice absolu en terme de survie globale à 5 ans et de survie sans événement à 5 ans était respectivement de 2% et de 3% (7). La même amplitude bénéfique en terme de taux de rechute était rapportée dans l'étude QUASAR (6). De plus, les études NSABP C01 et C02 apportent des données contradictoires concernant la chimiothérapie adjuvante : l'étude NSABP C01 n'a pas montré de bénéfice à la chimiothérapie adjuvante par rapport à la chirurgie seule, tandis que l'étude NSABP C02 a montré un bénéfice de l'administration péri opératoire intra-portale de chimiothérapie comparée à la chirurgie seule (bénéfice absolu de 12% en faveur du groupe chimiothérapie).

Récemment, la mise à jour à 10 ans de l'étude MOSAIC (8,9), comparant le LV5FU2 (5-fluorouracile + leucovorine) au FOLFOX (LV5FU2 + oxaliplatine) ne montrait pas de bénéfice à la bithérapie même dans le sous groupe de pronostic défavorable des patients ayant une tumeur pT4, une perforation digestive et/ou moins de 10 ganglions analysés.

En résumé, toutes ces analyses de sous-groupes issues d'études de phase III, montrent un bénéfice très modeste de la chimiothérapie adjuvante dans les cancers du colon de stade II, avec un gain en survie de 2 à 5%. Ces données tendent à proposer un traitement adjuvant uniquement chez les patients ayant une tumeur microsatellites stables

(MSS) avec des facteurs de mauvais pronostic (tumeur pT4, perforation ou occlusion tumorale, moins de 12 ganglions analysés, présence d'embolies vasculaires/lymphatiques/péri nerveux, tumeur indifférenciée) (3,4). Dans ce cas, un traitement par LV5FU2 seul semble raisonnable. Cette proposition de traitement est un consensus d'experts.

1.2.2 Stades III

Le cancer du colon de stade III est défini par la présence d'une atteinte ganglionnaire régionale, sans atteinte métastatique. Il peut être dichotomisé en stade III à « bas risque » de récurrence (pT3N1) ou à « haut risque » de récurrence (pT4 et/ou N2). La chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidine est recommandée chez tous les patients atteints de cancer du colon de stade III. En effet, elle réduit le risque de décès de 10-15% pour une monothérapie par LV5FU2, et de 20-22% pour une bithérapie (FOLFOX) (3,4).

Le bénéfice du 5-fluorouracile (5FU) est connu depuis les années 1990. Différents types d'administration du 5FU ont montré des résultats similaires comparés à la chirurgie seule avec un bénéfice en survie de 12 à 16% (6–8,10). Le régime LV5FU2 a été préféré au FUFOL pour des raisons de tolérance (11,12). La capécitabine, pro-drogue orale du 5FU, a montré sa non infériorité par rapport au 5FU dans cette indication (13,14).

L'adjonction de l'oxaliplatine à une monothérapie par 5FU a été étudiée ensuite. Les 2 études principales (MOSAIC et NSABP C07) ont montré des résultats similaires avec un bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine en terme de survie globale de 8,1% dans l'étude MOSAIC, et en survie sans maladie de 6,6% à 3 ans dans l'étude NSABP C07 (9,15). De façon similaire la bithérapie capécitabine+oxaliplatine semble supérieure à la monothérapie dans cette indication (16,17). La bithérapie fluoropyrimidine+oxaliplatine est donc devenue le standard dans le traitement adjuvant des cancers coliques de stade III (4).

Les essais d'amélioration des traitements adjuvants du cancer du colon de stade III ont tous échoués :

- L'irinotecan a été testé dans 3 essais qui étaient négatifs (18–20).
- Le bevacizumab retardait la survenue des rechutes dans l'étude NSABP C08 et il existait une tendance à un effet délétère dans l'étude française AVANT (21–23).

- Le cetuximab n'a pas montré d'efficacité dans les deux études internationales menées : PETACC-8 et NO147 (24,25).

Globalement, 100% des patients atteints d'un cancer du colon de stade III sont traités par chimiothérapie adjuvante avec un risque de séquelles neurologiques au long cours alors que seulement 20% bénéficient de ce traitement. Il est donc nécessaire de mieux évaluer le pronostic de ces patients pour éventuellement éviter une durée de traitement trop importante voire un traitement adjuvant inutile à certains d'entre eux.

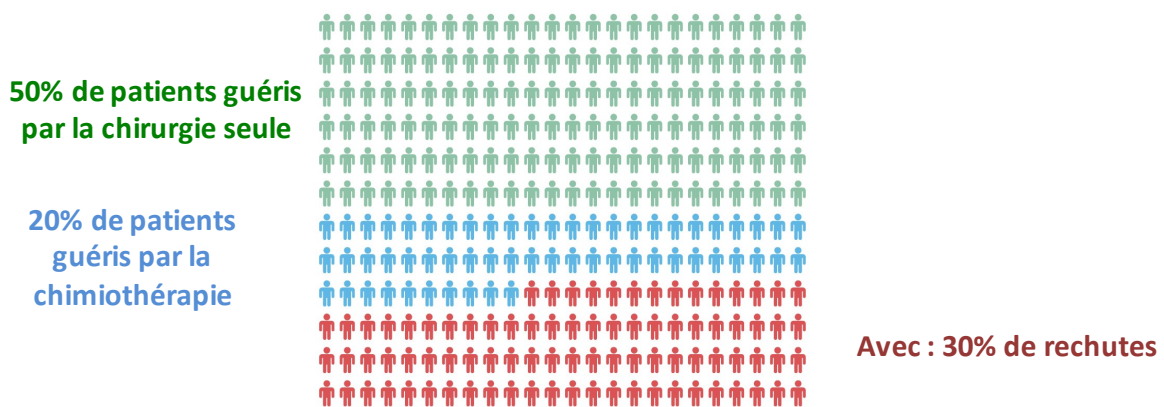


Figure : illustration du taux de rechute et du bénéfice du traitement adjuvant dans les cancers du colon de stade III.

Les principaux essais thérapeutiques dans le cancer du colon adjuvant sont résumés dans le tableau ci-après.

Etude	Année de publication	Phase	Stade	Bras contrôle	Bras expérimental (exp)	Survie sans maladie contrôle/exp	Survie globale contrôle/exp
IMPACT B2	Lancet Lond Engl 1995	Meta-analyse	II	Pas de chimio (n=507)	Chimiothérapie adjuvante (n=1016)	/	A 5 ans : 80%/82% (HR: 0.86, 90% CI: 0.68-1.07, p=0.057)
NSABP C01 résultats à 10 ans	Wolmark J Natl Cancer Inst 1988 Smith et al J Natl Cancer Inst 2004	III	Duke B C	Pas de traitement (n=394)	Chimiothérapie adjuvante (5-FU/semustine/vincristine (n=379); ou BCG adjuvant (n=393))	7% de différence en terme de SSM à 5 ans SSM à 10 ans: MOF vs chirurgie HR:0.88 (0.72 to 1.07) p=0.19	SG à 10 ans:HR 0.89 (0.72 to 1.09) p=0.24
NSABP C02	Wolmark J Clin Oncol 1990	III	Duke A b C	Chirurgie seule (n=581)	Chimiothérapie intraportale péri opératoire 5FU (n=577)	A 5 ans: 60%/69% p=0.02	A 5 ans: 70%/78% p=0.07
NSABP C03	Wolmark J Clin Oncol 1993		II and III	MOF (n=542)	5FU/LV (n=539)	A 5 ans: 54%/66% p=0.0004	A 5 ans: 66%/76% p=0.003
QUASAR	QUASAR collaborative group Lancet 2007		I-III	Chirurgie seule (n=1617)	Chimiothérapie (n=1622)	RR pour la rechute 0.78 (95% CI 0.67-0.91; p=0.001	RR (chimio vs chir) 0.82 (95% CI 0.70-0.95; p=0.008
MOSAIC	André et al J Clin Oncol 2015	III	II and III	LV5FU2 (1123)	FOLFOX4 (n=1123)	A 10 ans 61.7%/67.5% HR 0.82 (0.71-0.95) p=0.007	A 10 ans 67.1%/71.7% HR 0.85 (0.73-0.99); p=0.043
NSABP C07	Kuebler J Clin Oncol 2007/Yothers J Clin Oncol 2011	III	II and III	5FU/LV (n=1245)	5FU/LV-oxali (n=1247)	A 5 ans: 64.2%/69.4% FLOX vs FULV: HR 0.82 (0.72-0.93) p=0.02	A 5 ans: 78.8%/81.8%
XELOXA/Schmoll/NO16968	Schmoll J Clin Oncol 2015	III	III	FU/FA, (n=942)	CAPOX, (n 944)	A 7 ans : 56%/63% HR (exp vs contrôle) 0.80; IC 95%, 0.69-0.93; p=0.004	A 7ans : 67%/73% HR (exp vs contrôle), 0.83; IC95%, 0.70-0.99; p=0.04
NSABP C08	Allegra J Clin Oncol 2011	III	II and III	FOLFOX6 (n=1356)	FOLFOX6+bevacizumab (n=1354)	A 3 ans : 75.5%/77.4% HR (exp vs contrôle), 0.89; IC95%, 0.76 to 1.04; p=0.15	/
AVANT	De Gramont Lancet Oncol 2012	III	III	FOLFOX (n=955)	FOLFOX or CAPOX + bevacizumab (n=1912)	HR bevacizumab-FOLFOX4 versus FOLFOX4: 1.17 (IC95%I 0.98-1.39; p=0.07), et pour bevacizumab-XELOX versus FOLFOX4 1.07 (0.90-1.28; p=0.44).	HR bevacizumab-FOLFOX4 versus FOLFOX4 1.27 (1.03-1.57; p=0.02), et pour bevacizumab-XELOX versus FOLFOX4 1.15 (0.93-1.42; p=0.21).
PETACC-8	Taieb Lancet Oncol 2014	III	III	FOLFOX (n=1279)	FOLFOX cetuximab (n=1280)	Population RAS sauvage: A 3 ans 78%/75.1% HR (exp vs contrôle) 1.05 (CI95% 0.85-1.29)	A 3 ans 91.2%/89.7% HR (exp vs contrôle) 0.98 (0.67-1.44)
NCCTG NO147	Alberts JAMA 2012	III	III	FOLFOX6 (n=1337)	FOLFOX6 cetuximab (n=1349)	Population KRAS sauvage: A 3 ans 74.6%/71.5% HR (exp vs contrôle), 1.21 (CI95% 0.98-1.49); p=0.08	A 3 ans 87.3%/85.6% HR (exp vs contrôle) 1.25 (0.92-1.68) p=0.15
PETACC-3	Van Cutsem J Clin Oncol 2009	III	III	LV5FU2 (1149)	FOLFIRI (n=1149)	A 5 ans: 54.3%/56.7% p=0.106	A 5 ans: 71.3%/73.6% p=0.094

Tableau : principales études adjuvantes dans le cancer du colon localisé

Abréviations : DFS: disease-free survival, OS: overall survival; Exp: bras expérimental; HR: hazard ratio, RR: risque relatif; Traitements: MOF: semustine + vincristine + 5 fluorouracile 5FU/LV or LV5FU2 or FU/FA: 5 fluorouracile + leucovorine, FOLFOX: LV5FU2 + oxaliplatine, CAPOX: capécitabine + oxaliplatine, FOLFIRI: LV5FU2 + irinotecan

1.2.3 Délai d'introduction du traitement adjuvant

Le délai entre la chirurgie et le début du traitement adjuvant est relativement bien codifié. En effet une méta-analyse de 14 essais a montré qu'un délai dépassant les 8 semaines augmentait le risque relatif de décès (26). Cependant certaines études de cohortes montrent que le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante peut s'étendre jusqu'à 6 mois après la chirurgie (27–29). En particulier, l'étude de Gao et al portant sur plus de 10 000 patients retrouvait un bénéfice de l'introduction d'une chimiothérapie adjuvante jusqu'à 21 semaines après la chirurgie (27).

1.2.4 Durée du traitement adjuvant

Afin de réduire la neuro-toxicité séquellaire de l'oxaliplatine, plusieurs études ont tenté de diminuer la durée de la chimiothérapie adjuvante d'abord de 12 mois à 9 mois, puis de 9 mois à 6 mois (11,30–33). La dernière en date est l'essai international IDEA, dont l'objectif était de montrer la non-infériorité d'un traitement de 3 mois par rapport à un traitement de 6 mois (34–39). Plus de 12 000 patients ont été randomisés dans cet essai. Si la non-infériorité n'a pu être démontrée, les résultats des analyses en sous-groupes (portant chacune sur plus de 3000 patients) ont permis d'établir des recommandations pour la durée de traitement ainsi que les molécules utilisées dans les cancers coliques de stade III :

- Chez les patients à bas risque de rechute : capécitabine+oxaliplatine pendant 3 mois.
- Chez les patients à haut risque de rechute : FOLFOX pendant 6 mois.

La diminution de la durée de chimiothérapie était associée à une réduction significative des effets secondaires et des coûts (36–39).

3 yr DFS rate (%) and HR by regimen and risk group		Regimen								
		CAPOX			FOLFOX			CAPOX/FOLFOX combined		
		3 yr DFS, % (95% CI)		HR (95% CI)	3 yr DFS, % (95% CI)		HR (95% CI)	3 yr DFS, % (95% CI)		HR (95% CI)
		3 m	6 m		3 m	6 m		3 m	6 m	
Risk group	Low-risk (T1-3 N1) ~60%	85.0 (83.1-86.9)	83.1 (81.1-85.2)	0.85 (0.71-1.01)	81.9 (80.2-83.6)	83.5 (81.9-85.1)	1.10 (0.96-1.26)	83.1 (81.8-84.4)	83.3 (82.1-84.6)	1.01 (0.90-1.12)
	High-risk (T4 or N2) ~40%	64.1 (61.3-67.1)	64.0 (61.2-67.0)	1.02 (0.89-1.17)	61.5 (58.9-64.1)	64.7 (62.2-67.3)	1.20 (1.07-1.35)	62.7 (60.8-64.4)	64.4 (62.6-66.4)	1.12 (1.03-1.23)
	Risk groups combined	75.9 (74.2-77.6)	74.8 (73.1-76.6)	0.95 (0.85-1.06)	73.6 (72.2-75.1)	76.0 (74.6-77.5)	1.16 (1.06-1.26)	P-value interaction test: Regimen: 0.0061 Risk group: 0.11		

Non-inferior

Not proven

Inferior

Tableau : résumé des taux de survie sans maladie (DFS) à 3 ans selon les groupes de traitement et de risque de rechute dans l'étude IDEA, d'après Grothey et al, *New England Journal of Medicine* 2018.

1.3 Facteurs pronostiques des cancers coliques localisés

Une des possibilités pour améliorer la prise en charge adjuvante des cancers du colon localisés est l'amélioration de la compréhension du pronostic des patients. Ceci passe par la compréhension anatomopathologique du développement tumoral et de la réponse immunitaire, mais aussi par l'analyse en biologie moléculaire des tumeurs.

1.3.1 Facteurs anatomopathologiques

L'analyse anatomopathologique permet de faire le diagnostic de cancer, mais aussi d'en apprécier l'agressivité et donc d'estimer son pronostic. Le stade TNM déjà mentionné ci-dessus est en soi un élément pronostic majeur des cancers du colon. A ces facteurs s'ajoutent certains paramètres témoignant de l'envahissement tumoral important.

Le potentiel micro métastatique des tumeurs peut être reflété par les embolies vasculaires et lymphatiques. Ces derniers ont été montrés comme aussi importants que le stade TNM dans certaines études (40). A ces embolies peuvent s'ajouter les engainements péri-nerveux qui confèrent au patient un mauvais pronostic en terme de survies globale et sans maladie (41). Certaines études suggèrent que ces deux facteurs sont synergiques (41). Même s'ils sont débattus, ces facteurs restent décisifs dans la prise de décision pour l'indication d'un traitement adjuvant dans les cancers coliques de stade II.

L'envahissement ganglionnaire étant un facteur pronostique à part entière, certains auteurs se sont penchés sur l'intérêt d'un ratio entre le nombre de ganglions envahis et le nombre de ganglions étudiés : le « *lymph node ratio* », LNR. Plusieurs études ont montré qu'un LNR élevé conférait un moins bon pronostic en terme de survie (42–44).

1.3.2 Facteurs immunologiques

La meilleure compréhension de l'immunologie et l'avènement de l'immunothérapie ont abouti à l'étude des facteurs immunologiques influençant le pronostic des patients atteints de cancer du colon. Les premières études de 2005 ont montré qu'une infiltration lymphocytaire CD8 et CD4 intra tumorale était associée avec une meilleure survie et à une probabilité moindre d'envahissement ganglionnaire et de récurrence métastatique (45).

De ces travaux a découlé la création de l'Immunoscore®, basé sur l'évaluation de l'infiltration de différentes populations lymphocytaires au sein de la tumeur et sur le front d'invasion tumorale (46,47). Cet Immunoscore® a été montré comme robuste et reproductible. Il a notamment été validé sur des populations de patients atteints de cancer du colon de stades II et III (48). Cependant, la validation de ce score n'a pas inclus des facteurs pronostiques forts tels que l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), les statuts *BRAF* et *RAS*. De plus, la discrimination de l'Immunoscore® n'était pas parfaite avec un C-index à 0,58.

L'importance de l'infiltration lymphocytaire a aussi été montrée par Emile et al (49,50). Dans cette étude, l'infiltration lymphocytaire dans la tumeur était associée à un meilleur pronostic en terme de survie sans maladie.

Bien que prometteurs, ces outils immunologiques ne sont pas encore utilisés en pratique courante, et leur impact sur la décision thérapeutique n'est pas encore connu.

1.3.3 Facteurs moléculaires

A l'origine de la carcinogénèse, 3 mécanismes distincts ont été décrits : i) anomalies du système *mismatch repair* (MMR), ii) méthylation des ilots CpG et iii) instabilité chromosomique.

Le statut microsatellitaire instable (dMMR ou MSI), reflet de l'inefficacité du système MMR, est présent dans environ 15% des cancers du colon. Sa prévalence est plus faible chez les patients ayant un cancer du colon de stade IV (5% versus 20% chez les stades I-II, et 12% chez les stades III) (51). Dans un tiers des cas, le statut MSI est d'origine héréditaire (Syndrome de Lynch). Chez les patients dont le statut MSI est sporadique, il est souvent associé à une méthylation des ilots CpG ou à une mutation *BRAF* (dans environ 50% des cas). Dans le cancer du colon de stade II, le statut MSI est de très bon pronostic. Il n'est pas recommandé de faire de la chimiothérapie adjuvante à un patient ayant une tumeur MSI, peu importe la présence de facteurs de mauvais pronostic (52–54). Pour les cancers coliques de stade III, l'association du statut MMR avec la survie est moins claire. En effet, certaines études semblent montrer un meilleur pronostic pour les patients MSI en terme de survie globale et sans maladie, alors que d'autres non (55–57). Il faut souligner que ces études portent sur un sous groupe relativement peu nombreux de patients. La dernière, et plus importante analyse (4674 patients) ne montrait pas de différence de pronostic entre les patients ayant un cancer du colon stade III MSI et MSS (75% vs 74% de taux de survie sans maladie à 3 ans) (58). Le recoupement de certaines caractéristiques moléculaires (MMR, *BRAF*, méthylation CpG) peut être à l'origine de ces résultats contradictoires.

La méthylation des ilots CpG ou *CpG island methylator phenotype* (CIMP) est le mécanisme de carcinogénèse décrit le plus récemment. Il est observé dans environ 18% des cancers colorectaux. Il est dû à la méthylation des ilots CpG dans les promoteurs de certains gènes impliqués dans l'oncogénèse, d'où le possible recoupement avec les statuts MMR, *BRAF*, et *RAS*. L'analyse de plusieurs études a permis de montrer que les tumeurs CIMP+ ont une moins bonne survie globale et un taux de rechute plus important que les tumeurs CIMP- (59–62).

Parmi les facteurs moléculaires impactant le pronostic des patients atteints de cancers du colon localisé, les anomalies de la voie des MAP kinases (*BRAF* et *KRAS/NRAS*) sont relativement fréquentes. En effet, on compte environ 9% à 12% de tumeurs mutées

BRAF, dont 80% arborant la mutation V600E (63). Les données concernant la valeur pronostique des mutations *BRAF* sont robustes car elles proviennent d'analyses post-hoc d'essais prospectifs. La grande majorité des études montrent une association défavorable entre la présence d'une mutation *BRAF* et le pronostic des patients (64–68). La dernière étude à montrer la valeur pronostique défavorable de telles mutations précisait que la mutation *BRAF* constituait un facteur de mauvais pronostic uniquement chez les patients MSS (67,68). L'autre anomalie de la voie des MAP kinases fréquemment retrouvée sont les mutations *KRAS* qui sont présentes chez 15% à 37% des cancers du colon localisé (69–71). La plupart des études s'accordent sur le pronostic péjoratif conféré par la présence d'une mutation *KRAS* (66,67,72,73) et ce, quelle que soit la localisation de la mutation sur le gène (73–75). Si l'impact pronostic de ces mutations semble clair, la stratégie thérapeutique n'est pas modifiée pour les patients non mutés *KRAS* suite aux résultats négatifs des essais testant les anti EGFR en adjuvant.

Les anomalies moléculaires citées ci-dessus peuvent s'intégrer de façon plus large dans des classifications moléculaires (76,77). La classification la plus connue a été publiée par Guinney et al. A partir d'échantillons provenant de cancers du colon de stades I à IV (dont environ 41% de stades III), les auteurs ont défini quatre sous groupes (*consensus molecular subtypes*, CMS), chacun avec des spécificités génétiques. Par exemple, le sous groupe CMS1 était associé aux mutations *BRAF*, et à un moins bon pronostic à la rechute.

Sous-type	CMS1 (MSI/immun)	CMS2 (Canonical)	CMS3 (Métabolique)	CMS4 (Mésenchymateux)
%	14%	37%	13%	23%
Caractéristiques cliniques	Femme Colon droit Peu différencié	Colon gauche		Stade plus avancé (III ou IV)
Mutations associées	MSI, CIMP+, hypermutation, Mutations <i>BRAF</i> Infiltration et activation immunitaire	SCNA élevé Activation de WNT et MYC	MSI ou MSS, CIMP - , SCNA faible Mutations <i>KRAS</i> Dérégulation métabolique	SCNA élevé Infiltration stromale Activation TGFb Angiogénèse Amplifications HER2
Devenir	Survie faible après rechute	Meilleure survie après rechute		Mauvaises SG et SSR
SG à 5 ans (IC95)	74% (69-79)	77% (74-80)	75% (70-80)	62% (58-66)
SSR à 5 ans (IC95)	75% (70-80)	73% (70-77)	73% (68-80)	60% (55-65)
Survie médiane après rechute	9 mois	35 mois	20 mois	24 mois

CIMP : CpG island methylation phenotype, SCNA : somatic copy number alteration. SG : survie globale, SSR : survie sans rechute.

Tableau : classification CMS des cancers du colon et leurs caractéristiques moléculaires, d'après Guinney et al, *Nature Med.*

1.4 Signatures moléculaires, scores pronostiques et nomogrammes

1.4.1 Signatures moléculaires

Afin de pouvoir estimer de façon plus précise le pronostic des patients atteints de cancer du colon, des signatures moléculaires ont été développées. Les signatures les plus largement analysées sont Oncotype Dx Colon®, Coloprint®, Veridex® and GeneFxColon® (78–81). La plupart des études de validation de ces signatures moléculaires ont été faites sur des populations hétérogènes de patients atteints de cancers coliques de stades II et III (Tableau ci-après).

Les informations apportées par ces signatures moléculaires sont intéressantes, mais ne sont pas utilisées en pratique courante du fait de leur faible pouvoir discriminatoire. En effet, si on prend l'exemple d'Oncotype Dx Colon® dans les cancers du colon de stade III, le taux de rechutes à 5 ans chez les patients ayant un risque bas, intermédiaire et élevé selon la signature était de 21%, 29% et 38% respectivement (78). Ces signatures n'apportent que peu d'informations sur le bénéfice attendu de la chimiothérapie adjuvante.

Signature	Stade	N	Critère de jugement	Résultats pour les stades III	Type d'étude	Référence
Oncotype Dx colon cancer®	II-III traités	892	Taux de rechute à 5 ans	Faible : 21% (95CI, 16-26), Intermédiaire : 29% (95CI, 24-34), Elevé: 38% (95CI, 30-46)	Essai clinique (NSABP-C-07)	Yothers et al, J Clin Oncol 2013
Oncotype Dx colon cancer®	II-III traités	688	SG et SSR à 3 ans	-	Essai clinique (PETACC-3)	Di Narzo et al, J Nat Cancer Inst 2014
Coloprint®	I-II-III traités ou non	206	SSR à 5 ans	Faible: 78.2% (95CI, 49.9-90.7) Elevé: 47.2% (95CI, 25.8-68.6)	Cohorte prospective	Salazar et al, J Clin Oncol 2013
Veridex®	II	688	SG, SSR, et SAR à 3 ans	-	Essai clinique (PETACC-3)	Di Narzo et al, J Nat Cancer Inst 2014

SG ; survie globale, SSR : survie sans rechute, SAR : survie après rechute

Tableau : comparaison des différentes signatures moléculaires existantes dans le cancer du colon localisé.

1.4.2 Scores pronostiques et nomogrammes

Contrairement aux signatures moléculaires qui sélectionnent et agrègent des profils transcriptomiques semblables en terme de pronostic (sans connaître *a priori* la valeur pronostique de chaque gène), certaines équipes ont essayé de préciser le pronostic des patients atteints de cancer du colon localisé à partir des données cliniques, anatomopathologiques et biologiques connues comme ayant une valeur pronostique.

Trois scores de ce type ont été développés (82–84), chacun avec un jeu de variables différent. Les variables incluses dans ces scores sont montrées dans le Tableau ci-après. Chaque score tente de prédire au mieux la survie globale et la survie sans maladie ou sans rechute selon les scores. Il faut remarquer que leur efficacité n'est pas optimale avec des c-index variant de 0,65 pour le score développé par Renfro et al, sur la base de données ACCENT à 0,68 pour le score du Memorial Sloane Kettering Cancer Center. Par ailleurs, les avancées en biologie moléculaire et en immunologie rendent caducs ces scores qui ne les intègrent pas. De ce fait ils ne sont pas utilisés en pratique courante.

	Score MSKCC Weiser et al, J Clin Oncol 2011		Score ACCENT Renfro et al, J Natls Cancer Inst 2014	Numeracy Gill et al, J Clin Oncol 2004
Stade	II et III		III	II et III
Variables incluses dans le score	For SG:	For SSM:	Age (SG uniquement)	Age (SG uniquement)
	Age Sexe pT, pN Nombre de ganglions positifs et négatifs Grade	Age Sexe Localisation tumorale ACE pT Grade, Emboles lymphatiques et vasculaires, Emboles périnerveux Nombre de ganglions positifs et négatifs Chimiothérapie adjuvante	Sexe Race (SG uniquement) Indice de masse corporelle Performance status pT, <i>Node ratio</i> Grade Localisation tumorale Chimiothérapie adjuvante	pT, pN Grade
Critères de jugement	SG et SSM à 5 ans		SG et SSR à 3 et 5 ans	SG et SSM à 5 ans
Performance du score	SG c-index : 0.68		SG c-index : 0.66 SSR c-index : 0.65	SSM c-index : 0.66

SG : survie globale, SSM : survie sans maladie, SSR : survie sans récurrence, c-index : indice de concordance, ACE : antigène carcinoembryonnaire

Tableau : comparaison des différents score pronostiques existants dans le cancer du colon localisé.

1.5 Les recommandations pour le rapport transparent d'un modèle de prédiction multivarié pour l'estimation du pronostic ou du diagnostic (*TRIPOD statements*)

A l'instar des CONSORT statements pour le rapport des essais thérapeutiques, des recommandations ont été publiées en 2015 (85). Leur objectif est de standardiser la recherche statistique et l'estimation du pronostic dans la recherche médicale.

Vingt deux points sont donc à respecter dans la présentation des données disponibles, la description des méthodes utilisées, et des résultats. Ce sont ces recommandations que nous avons suivies pour l'écriture des articles de ce travail de thèse. Si les *TRIPODS statements* conseillent sur la présentation des résultats, ils ne fournissent pas les outils méthodologiques à mettre en œuvre pour chacune de leurs étapes.

Diagnosis or prognosis				
Section/topic	Item	Development or validation?	Checklist item	Page
Title and abstract				
Title	1	D;V	Identify the study as developing and/or validating a multivariable prediction model, the target population, and the outcome to be predicted.	
Abstract	2	D;V	Provide a summary of objectives, study design, setting, participants, sample size, predictors, outcome, statistical analysis, results, and conclusions.	
Introduction				
Background and objectives	3a	D;V	Explain the medical context (including whether diagnostic or prognostic) and rationale for developing or validating the multivariable prediction model, including references to existing models.	
	3b	D;V	Specify the objectives, including whether the study describes the development or validation of the model, or both.	
Methods				
Source of data	4a	D;V	Describe the study design or source of data (e.g., randomised trial, cohort, or registry data), separately for the development and validation data sets, if applicable.	
Participants	4b	D;V	Specify the key study dates, including start of accrual; end of accrual; and, if applicable, end of follow-up.	
	5a	D;V	Specify key elements of the study setting (e.g., primary care, secondary care, general population) including number and location of centres.	
	5b	D;V	Describe eligibility criteria for participants.	
Outcome	5c	D;V	Give details of treatments received, if relevant.	
	6a	D;V	Clearly define the outcome that is predicted by the prediction model, including how and when assessed.	
Predictors	6b	D;V	Report any actions to blind assessment of the outcome to be predicted.	
	7a	D;V	Clearly define all predictors used in developing the multivariable prediction model, including how and when they were measured.	
Sample size	7b	D;V	Report any actions to blind assessment of predictors for the outcome and other predictors.	
	8	D;V	Explain how the study size was arrived at.	
Missing data	9	D;V	Describe how missing data were handled (e.g., complete-case analysis, single imputation, multiple imputation) with details of any imputation method.	
	10a	D	Describe how predictors were handled in the analyses.	
Statistical analysis methods	10b	D	Specify type of model, all model-building procedures (including any predictor selection), and method for internal validation.	
	10c	V	For validation, describe how the predictions were calculated.	
	10d	D;V	Specify all measures used to assess model performance and, if relevant, to compare multiple models.	
Risk groups	10e	V	Describe any model updating (e.g., recalibration) arising from the validation, if done.	
	11	D;V	Provide details on how risk groups were created, if done.	
Development vs validation	12	V	For validation, identify any differences from the development data in setting, eligibility criteria, outcome, and predictors.	
Results				
Participants	13a	D;V	Describe the flow of participants through the study, including the number of participants with and without the outcome and, if applicable, a summary of the follow-up time. A diagram may be helpful.	
	13b	D;V	Describe the characteristics of the participants (basic demographics, clinical features, available predictors), including the number of participants with missing data for predictors and outcome.	
	13c	V	For validation, show a comparison with the development data of the distribution of important variables (demographics, predictors, and outcome).	
Model development	14a	D	Specify the number of participants and outcome events in each analysis.	
	14b	D	If done, report the unadjusted association between each candidate predictor and outcome.	
Model specification	15a	D	Present the full prediction model to allow predictions for individuals (i.e., all regression coefficients, and model intercept or baseline survival at a given time point).	
	15b	D	Explain how to use the prediction model.	
Model performance	16	D;V	Report performance measures (with CIs) for the prediction model.	
Model updating	17	V	If done, report the results from any model updating (i.e., model specification, model performance).	
Discussion				
Limitations	18	D;V	Discuss any limitations of the study (such as nonrepresentative sample, few events per predictor, missing data).	
Interpretation	19a	V	For validation, discuss the results with reference to performance in the development data, and any other validation data.	
	19b	D;V	Give an overall interpretation of the results, considering objectives, limitations, results from similar studies, and other relevant evidence.	
Implications	20	D;V	Discuss the potential clinical use of the model and implications for future research	
Other information				
Supplementary information	21	D;V	Provide information about the availability of supplementary resources, such as study protocol, Web calculator, and data sets.	
Funding	22	D;V	Give the source of funding and the role of the funders for the present study.	
<p>^aItems relevant only to the development of a prediction model are denoted by <i>D</i>, items relating solely to a validation of a prediction model are denoted by <i>V</i>, and items relating to both are denoted <i>D;V</i>. We recommend using the TRIPOD Checklist in conjunction with the TRIPOD explanation and elaboration document.</p>				

Tableau : TRIPOD statements selon Moons et al.

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les patients atteints de cancer du colon localisé ont des pronostics très hétérogènes, et cela au sein d'un même stade TNM. Peu d'outils performants sont disponibles pour évaluer le pronostic de ces patients. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de donner une meilleure caractérisation de leur pronostic.

Pour se faire ce travail s'est décomposé en 4 étapes :

1. Synthèse des facteurs pronostiques dans le cancer du colon localisé
2. Identifier et s'appropriier une méthodologie statistique optimale pour l'étude de certains paramètres possiblement en lien avec le pronostic.
3. Etudier finement la relation entre le facteur d'intérêt et les critères de jugement, sous une forme continue ou après avoir défini un seuil optimal pour étudier cette variable sous une forme catégorielle
4. Création d'outils pronostiques intégratifs : nomogramme et score pronostique.

Par ailleurs, les facteurs étudiés et les outils pronostiques construits ont été analysés afin de déterminer leur valeur prédictive, ayant ainsi comme objectif d'aider le clinicien à adapter le traitement adjuvant des patients atteints d'un cancer du colon localisé.

3 MATERIEL ET METHODOLOGIE

3.1 Données disponibles pour l'étude des facteurs pronostiques dans le cancer du colon adjuvant.

Ce travail de thèse est basé sur l'analyse *a posteriori* des données de deux études prospectives de phase III randomisées internationales : MOSAIC et PETACC-8 (8,9,25).

3.1.1 Etude MOSAIC

L'étude MOSAIC a été publiée initialement en 2004 dans le *New England Journal of Medicine* puis en 2015 dans le *Journal of Clinical Oncology* pour la mise à jour des données à 10 ans. L'objectif de cette étude était d'évaluer le bénéfice de l'adjonction l'oxaliplatine à une chimiothérapie par LV5FU2 chez les patients atteints de cancer du colon de stades II et III. Au total, 2 246 patients ont été inclus, 1123 dans chaque groupe de traitement. Il y avait 899 (37%) patients avec une tumeur classée stade II et 1347 avec une tumeur classée stade III (63%).

Cette étude a montré une supériorité du FOLFOX par rapport au LV5FU2 seul dans la population totale (HR : 0,851 ; 95%IC : 0,728-0,995 ; p=0.043 en faveur de l'ajout de l'oxaliplatine) avec une survie globale à 10 ans de 71.7% versus 67.1% dans les bras FOLFOX et LV5FU2, respectivement. En analysant les résultats par sous groupes, l'ajout de l'oxaliplatine ne semblait bénéfique que chez les patients de stade III.

Les données disponibles dans l'étude MOSAIC sont montrées dans le tableau ci-après.

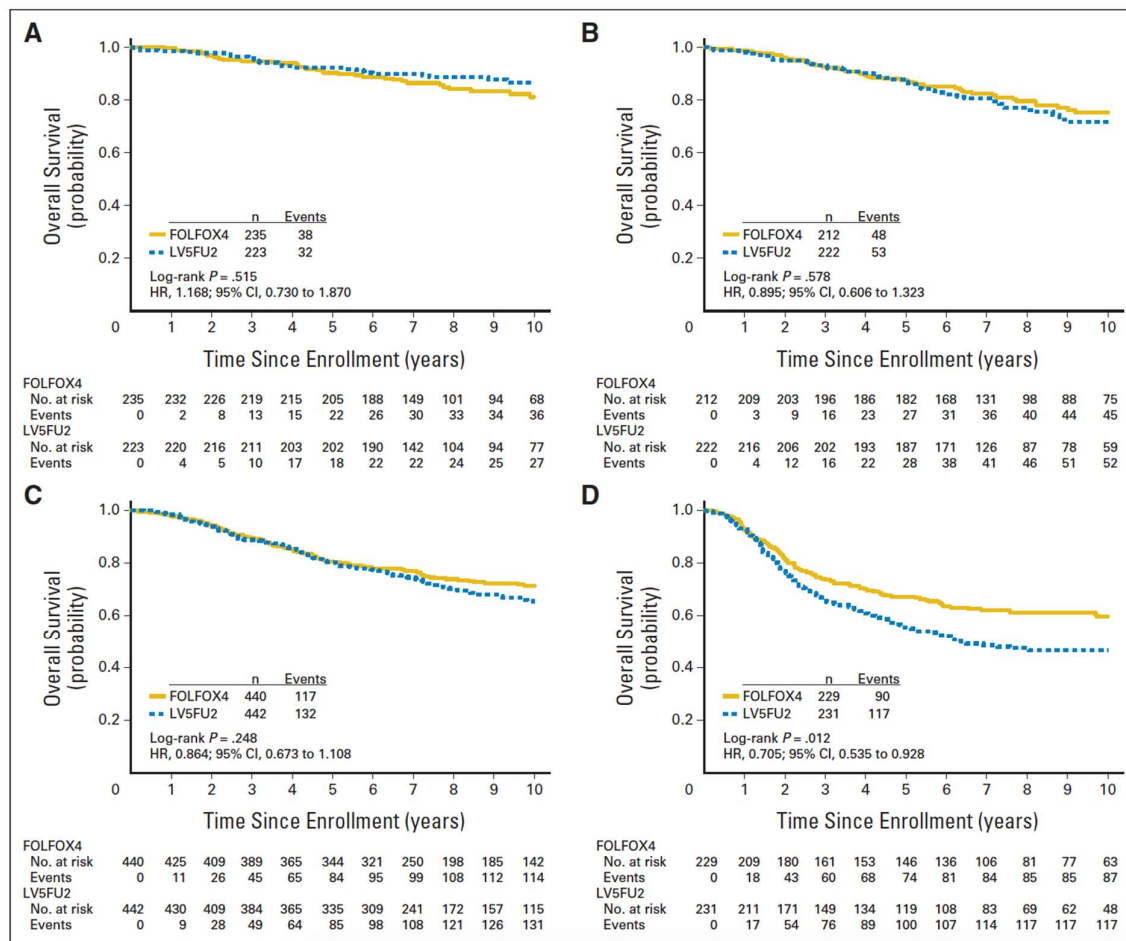


Figure : courbes de Kaplan Meier pour la survie globale de l'étude MOSAIC (mise à jour à 10 ans), d'après André et al, *J Clin Oncol* 2015. A : population globale, B : stades II, C : stades III N1, D : stades III N2.

3.1.2 Etude PETACC-8

L'étude PETACC-8 a été publiée en 2014 dans le *Lancet Oncology*. Son objectif était d'évaluer l'intérêt d'une thérapie ciblée anti-EGFR, le cetuximab, en adjuvant chez des patients atteints de cancer du colon de stade III. Au total, 2559 patients ont été inclus dont 1280 dans le bras FOLFOX-cetuximab et 1279 dans le bras FOLFOX seul. En cours d'étude un amendement a été fait pour l'analyse systématique du statut moléculaire *KRAS*: la population *KRAS* sauvage était de 1602 patients (791 dans le bras expérimental, et 811 dans le bras standard).

L'adjonction du cetuximab à une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade III n'a pas apporté de bénéfice en terme de

survie, et ce, indépendamment du statut moléculaire *KRAS* (HR : 1,09 ; 95%IC : 0,81-1,47 ; p=0,56 pour la population globale de l'étude).

Les données disponibles dans l'étude PETACC-8 sont montrées dans le tableau ci-après.

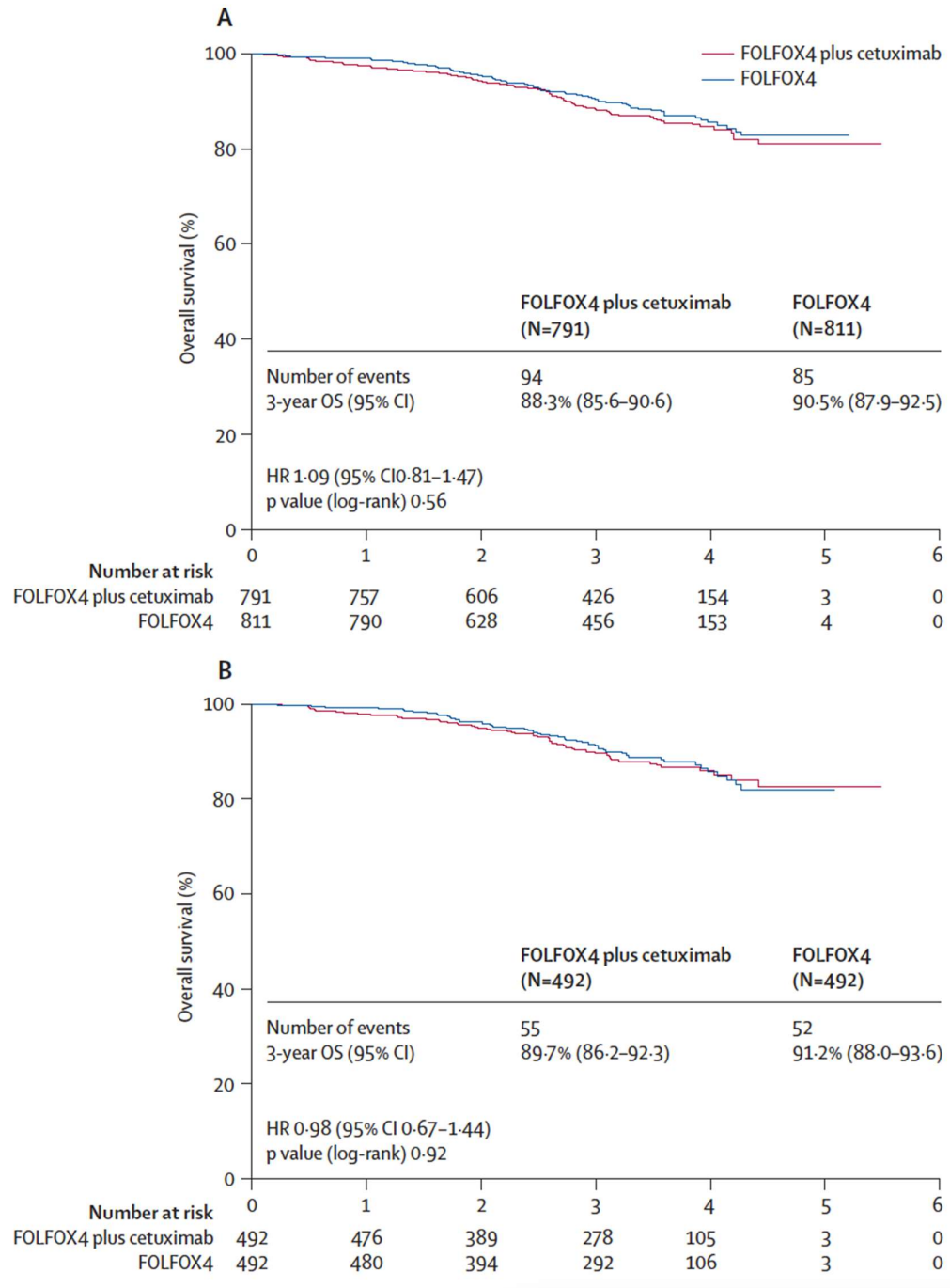


Figure : courbes de Kaplan Meier pour la survie globale dans l'étude PETACC-8, d'après Taieb et al, *Lancet Oncol* 2014. A : population globale de l'étude, B : population *KRAS* sauvage.

	MOSAIC	PETACC-8
Données cliniques	Sexe Age Performance status Taille, poids, IMC Localisation tumorale Occlusion et perforation intestinale	Sexe Age Performance status Taille, poids, IMC Type de chirurgie Complications post opératoires Localisation tumorale Occlusion et perforation intestinale
Données biologiques	Tests hépatiques Numération formule sanguine Plaquettes ACE post opératoire	Tests hépatiques Numération formule sanguine Plaquettes Calcium, potassium, magnésium ACE post opératoire
Données anatomopathologiques	Grade histopronostic Stade pTNM Nombre de ganglions étudiés/envahis	Grade histopronostic Stade pTNM Invasion vasculaire Invasion lymphatique
Données moléculaires	Mutation <i>BRAF</i> Statut MMR	Mutations <i>KRAS</i> et <i>NRAS</i> Mutation <i>BRAF</i> Statut MMR

Tableau : données disponibles dans les études MOSAIC et PETACC-8.

3.2 Méthodologie de l'analyse d'un facteur pronostique

La méthodologie optimale de recherche d'un facteur pronostique a déjà été décrite par Vernerey et al. Plusieurs étapes sont nécessaires à l'établissement d'un outil pronostique. Tout d'abord il faut valider le lien entre une variable et les critères de jugements d'intérêt. Ensuite l'intégration dans un outil pronostique plus large à visée individuelle ou populationnelle peut être envisagée. Dans ce travail de thèse nous allons suivre cette démarche statistique rigoureuse.

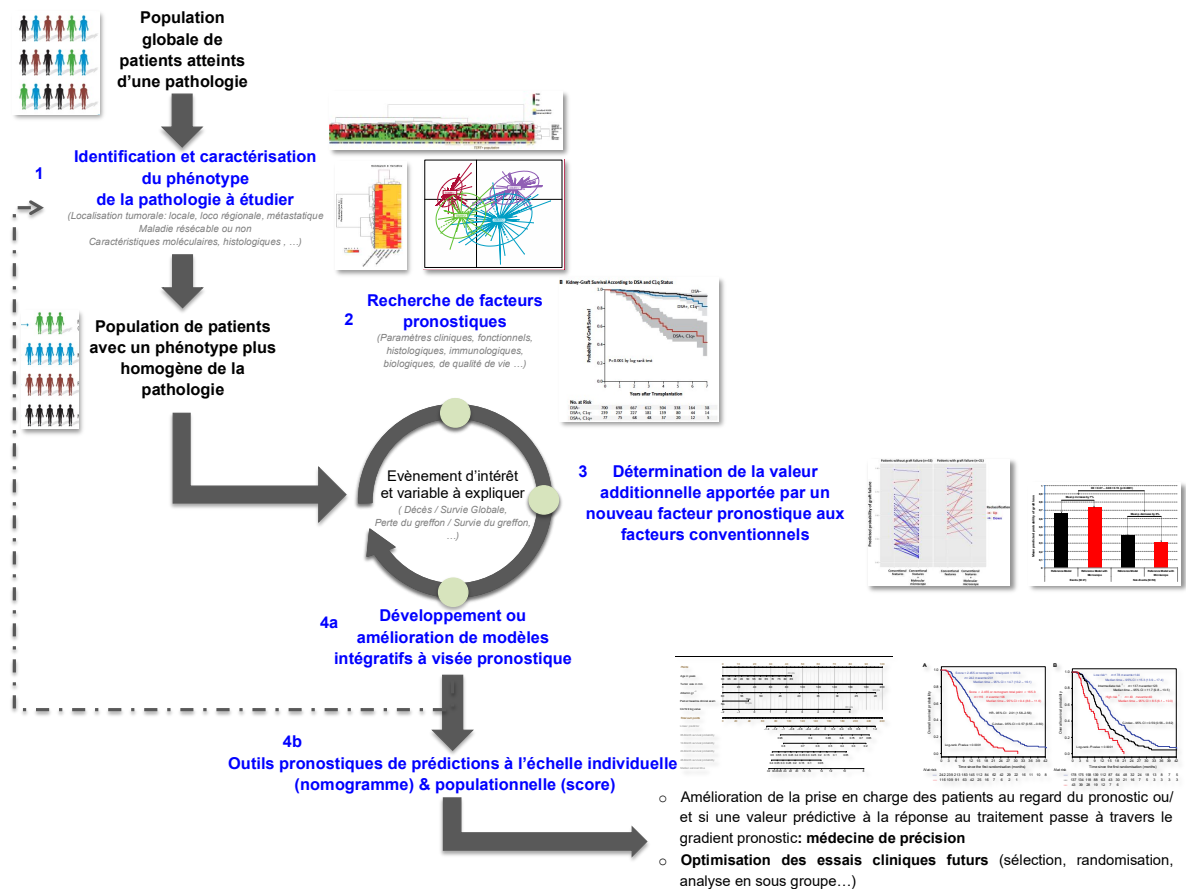


Figure : description de la recherche à visée pronostique, d'après Vernerey D.

3.2.1 Choix et définition des événements d'intérêt

L'élément indispensable de la recherche pronostique est le choix de l'événement d'intérêt. En recherche pronostique on parle de l'événement à prédire ou de la variable à expliquer. En effet, il ne peut exister de pronostic si on ne définit pas à quoi il réfère.

En oncologie, les principaux critères de jugement utilisés dans les études cliniques sont des variables de survie ou critère de jugement censuré à droite. Dans cette situation, tous les événements peuvent être considérés à un temps donné. La « durée de survie » désigne le temps jusqu'à la survenue de l'événement, que ce soit le décès du patient ou la survenue d'une progression tumorale ou d'une dégradation de l'état général. Les patients n'ayant pas fait l'événement au moment de l'analyse ou ceux qui sont perdus de vue seront considérés comme « censurés » à la date de dernières nouvelles disponibles (c'est à dire considérés comme n'ayant pas fait l'événement à la date de dernières nouvelles). Malheureusement, les patients perdus de vue constituent une perte d'information

importante dans les études, et leur nombre doit être limité afin de pouvoir interpréter au mieux les résultats et éviter un biais d'attrition. Pour chaque patient, on aura donc :

1. Un statut en rapport avec l'événement (par exemple : vivant/décédé si on s'intéresse au décès)
2. Une durée de survenue de l'événement.

Les deux principales durées de survie utilisées en oncologie sont la survie globale (SG) ou *overall survival* (OS) et la survie sans maladie (SSM) ou *disease free survival* (DFS).

La SG est un critère de jugement centré sur le patient. Elle est définie comme la durée entre la date d'inclusion du patient et son décès peu importe la cause du décès. Dans certains cas, on peut s'intéresser à la survie globale spécifique du cancer, et l'événement d'intérêt devient alors le décès par cancer.

La SSM est un critère de jugement centré sur la maladie. Elle est définie comme la durée entre la date d'inclusion du patient et la progression/rechute tumorale ou le décès du patient ou la survenue d'un 2^e cancer primitif (du même type que la tumeur initiale ou non). La définition de cette durée de survie peut varier en fonction des études, et il faut donc être vigilant lors de sa description. Par exemple dans l'étude MOSAIC, la SSM était définie comme la durée entre l'inclusion du patient dans l'essai et sa rechute tumorale ou son décès ou la survenue d'un 2^e cancer du colon, alors que dans l'étude PETACC-3 (20) les auteurs considéraient la survenue d'un 2^e cancer quelle qu'en soit l'origine comme événement.

En oncologie digestive, et particulièrement dans le cancer colo-rectal, la SSM peut se substituer à la SG. On parle alors de critère de jugement de substitution ou *surrogate endpoint*. L'intérêt de ce critère de jugement est qu'il est obtenu plus rapidement que la survie globale car il est composite (décès + rechute), ce qui permet d'avoir une analyse fiable des données de survie plus rapidement. Une des dernières études sur le sujet a été publiée par de Gramont et al dans le *J Clin Oncol* en 2010 (86). Cette publication portait sur plus de 20 000 patients traités en situation adjuvante pour un cancer colorectal (base ACCENT). Dans cette étude d'ampleur, la survie sans maladie à 3 ans était fortement corrélée à la survie globale à 5, 6 et 7 ans. Il est donc usuel de définir la SSM comme critère de jugement principal dans les études adjuvantes pour le cancer du colon.

3.2.2 Relation entre variable continue et critère de jugement

L'analyse des variables continues ou quantitatives peut se faire de plusieurs façons. Comme l'a décrit D Vernerey (87), les variables quantitatives peuvent être étudiées en tant que variable continue avec ou sans transformation préalable, ou alors en tant que variable catégorielle, auquel cas il faudra veiller au choix optimal d'une valeur seuil pour chaque classe.

Si on s'intéresse à la relation entre une variable quantitative et un critère de jugement dans sa forme continue, nous avons deux solutions :

1. Approche non paramétrique : méthode des splines cubiques restreints ou *restricted cubic splines*.
2. Approche paramétrique : méthode des polynômes fractionnaires multiples.

3.2.2.1 *Méthode des splines cubiques restreints*

L'approche par les *restricted cubic splines* consiste à découper la courbe modélisant la relation entre la variable continue et le critère de jugement en plusieurs intervalles afin de modéliser la relation entre la variable et le risque de faire l'événement séparément dans chaque intervalle. Le principe général des fonctions splines est résumé par les points suivants :

1. L'ensemble des valeurs de la variable quantitative est découpé en $(k+1)$ intervalles. On choisit pour cela k valeurs numériques (appelées nœuds) qui définissent les bornes des intervalles
2. Au sein de chaque intervalle, la relation entre la variable quantitative et le risque de faire l'événement est modélisé par un polynôme de degré d .
3. Les coefficients des polynômes sont choisis de sorte que la courbe totale soit la plus régulière possible

Les fonctions splines ont une bonne capacité d'adaptation aux données observées, même s'il n'existe pas de consensus pour faire le choix du nombre et de la limite des intervalles ainsi que pour la forme de la modélisation au sein de chaque intervalle. En pratique, la valeur de d est le plus souvent fixée à 3 (on parle alors de splines cubiques). De plus les fonctions splines cubiques ont tendance à être affectées par les valeurs excentriques pouvant être observées dans les premier et dernier intervalles avec des intervalles de

confiance larges dans ces 2 situations. Afin de s'affranchir de cet effet, les fonctions splines sont restreintes, c'est-à-dire qu'on les contraint à être linéaires dans intervalles extrêmes. Graphiquement on peut représenter la relation entre la variable continue et le critère de jugement, comme illustré ci-dessous. On obtient une courbe montrant l'évolution du hazard ratio du modèle de Cox en fonction de la valeur de la variable d'intérêt.

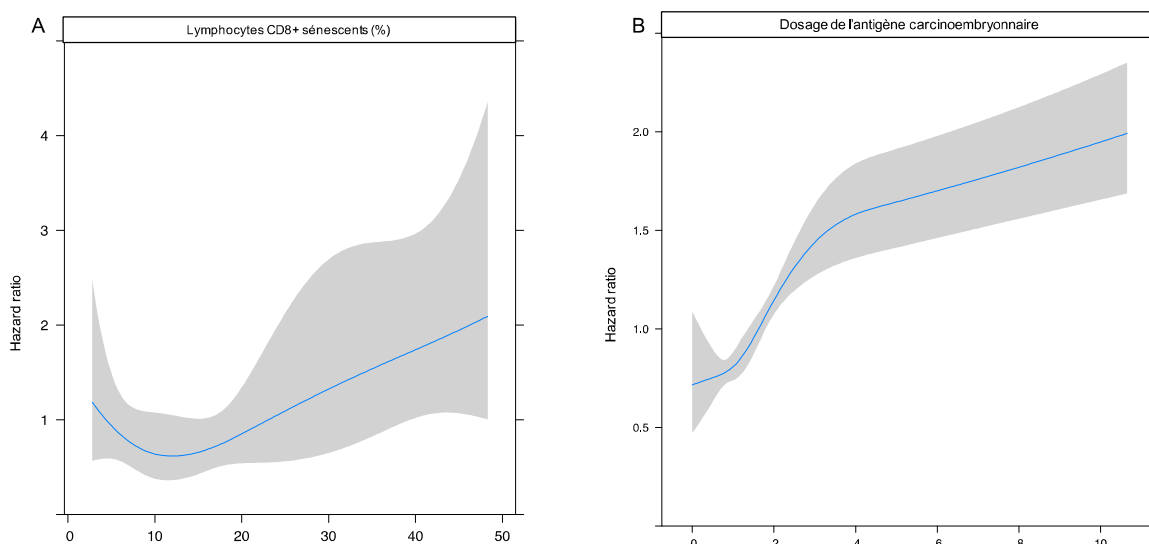


Figure : exemples de représentation graphique de l'analyse par *restricted cubic splines* d'une variable continue. **A** : représentation de la relation entre l'infiltration tumorale par des lymphocytes sénescents et la survie sans progression chez des patients atteints d'un cancer du poumon métastatique. On remarque que le risque de faire l'événement augmente nettement à partir de 20% d'infiltration. **B** : représentation de la relation entre le dosage de l'ACE et la survie globale chez des patients atteints d'un cancer du colon de stade III issus de l'étude PETACC-8. On remarque que la relation entre l'ACE et la survie globale peut être modélisée par une fonction « racine carrée ».

3.2.2.2 Polynômes fractionnaires

La seconde approche d'étude d'une variable quantitative sous sa forme continue, est la méthode des polynômes fractionnaires. Il s'agit d'une approche paramétrique dont l'idée est de modéliser la relation entre la variable d'intérêt et le risque de faire l'événement par une seule fonction. Cette méthode décrite par Royston et Altman (88) permet d'expliquer la relation variable continue/événement à l'aide de polynômes dont les exposants peuvent être négatifs et/ou non entiers.

Dans cette thèse, toutes les variables quantitatives considérées dans les modèles multivariés ont fait l'objet d'une étude par les méthodes des splines cubiques restreints et des polynômes fractionnaires afin de valider la transformation utilisée et évaluer avec précision la relation entre ces variables et l'événement étudié.

3.2.3 Catégorisation d'une variable quantitative et choix d'un seuil

3.2.3.1 *Catégorisation avantages et inconvénients*

Comme décrit précédemment, une variable quantitative peut être étudiée de façon continue afin d'avoir une estimation précise de sa relation avec les événements d'intérêt. Cependant, dans un souci de simplification et d'une meilleure compréhension/interprétation pour le clinicien, une catégorisation est souvent nécessaire pour l'étude de telles variables. C'est-à-dire que la variable continue va être découpée en différents intervalles au sein desquels le pronostic est comparable. De plus, le fait de définir un seuil pour faire plusieurs classes au sein d'une variable continue permet une comparaison entre les différentes publications. Si on se place du point de vue du méthodologiste, cette approche est simple à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas d'hypothèses et de vérifications préalables.

Cependant, cette approche peut rencontrer plusieurs écueils, et plusieurs auteurs ont souligné les inconvénients de la transformation d'une variable continue en catégories (89,90). Le premier inconvénient de l'approche catégorielle est le risque de mauvaise définition des valeurs seuils de chaque classe. En effet, elles peuvent ne pas représenter de façon optimale la relation entre la variable et l'événement. Dans ce cas, si la variable intervient comme variable d'ajustement dans un modèle, cela peut mener à une mauvaise prise en compte des facteurs de confusion. Le résultat de la catégorisation est l'attribution d'une seule valeur à plusieurs valeurs d'une même variable continue (91). La catégorisation peut donc mener à une estimation moins fine de l'association variable/événement, et être assimilée à un biais de mesure. On estime que la perte d'information devient négligeable à partir de 5 classes (92), mais cela représente beaucoup de classes au regard du nombre de sujets modeste de certaines études.

3.2.3.2 Choix du seuil, méthode de maximisation du log-rank

Dans le but d'utiliser la valeur seuil la plus pertinente pour les variables continues, et notamment pour l'étude de la relation de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) avec la SG et la SSM, nous avons utilisé une méthode de maximisation du test du log-rank décrite par Hothorn et Lausen (93). Cette méthode donne la p valeur du test du log-rank pour chaque valeur seuil possible de la variable continue. La valeur seuil optimale est celle donnant le meilleur résultat en terme de significativité statistique. Cette méthode a été validée pour les échantillons de petite taille ainsi que pour les données censurées, ces deux cas étant très fréquents en recherche biomédicale.

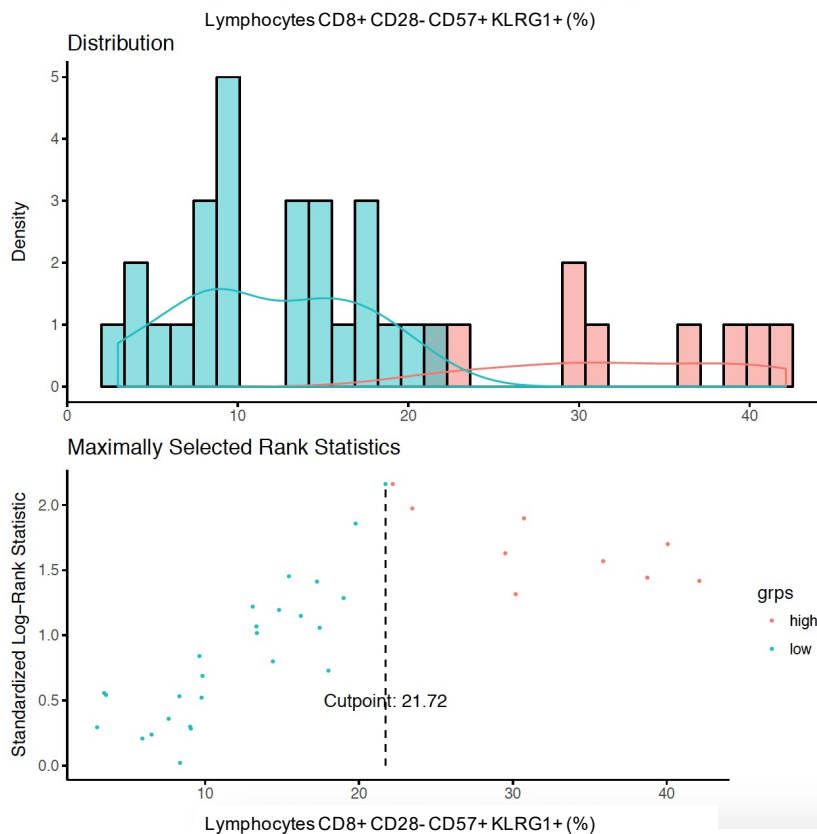


Figure : exemple d'utilisation de la méthode de Hothorn et Lausen. Ici une valeur seuil a été trouvée pour l'infiltration tumorale par des lymphocytes sénescents.

3.2.4 Analyses de survie

En Oncologie un des grands objectifs de la recherche est d'expliquer la survie des patients en fonction de diverses variables. Pour cela les analyses de survie sont un point

majeur de l'analyse statistique. Il peut s'agir d'une analyse paramétrique, semi-paramétrique ou non paramétrique. « Paramétrique » désigne un test dont l'application s'appuie sur l'hypothèse que les valeurs de la variable d'intérêt suivent une distribution prédéfinie. Les tests paramétriques sont globalement robustes, même en cas de faible écart aux conditions d'application. Les deux principales méthodes utilisées sont celles de Kaplan-Meier et les modèles de Cox.

3.2.4.1 Méthode de Kaplan Meier et test du log-rank

La méthode non paramétrique de Kaplan Meier se base sur les durées de survie de chaque patient et leur statut vivant/décédé à chaque instant t (94,95). Les patients sont classés par ordre croissant de survie et les probabilités de survie sont calculées à chaque instant où un événement se produit. Pour cela, il faut connaître le nombre de sujets ayant fait l'événement à l'instant t , le nombre de sujets encore à risque de faire l'événement. La représentation graphique de la méthode de Kaplan Meier est sous la forme d'une courbe en marche d'escalier. Chaque marche correspond à un événement. Comme il s'agit d'une estimation, il est important d'avoir accès au nombre de patients à risque de faire l'événement car la fiabilité de cette estimation diminue avec le nombre de patients à risque. Le faible nombre de patients suivis pendant une longue période peut se traduire par un plateau en fin de courbe. La différence entre les distributions de survie de plusieurs groupes de patients estimées par la méthode de Kaplan Meier peut être comparée visuellement mais aussi objectivée par des tests statistiques. Le test le plus utilisé est celui du log-rank (96).

3.2.4.2 Modèle de Cox

3.2.4.2.1 Description du modèle de Cox

Le modèle de Cox est le modèle d'estimation de la survie le plus fréquemment utilisé en recherche biomédicale car il permet de prendre en compte l'effet de plusieurs variables explicatives de la survenue d'un événement sans faire d'hypothèse sur les distributions de survie et la fonction de risque instantané de base. Ce modèle est semi paramétrique. Le modèle de Cox peut être utilisé pour étudier la relation entre une seule variable et l'événement à expliquer, on parle alors de modèle univarié. Il permet aussi la considération

de plusieurs variables pour expliquer la survie, prenant ainsi en compte les facteurs de confusion. Il s'agit de la pierre angulaire de la recherche pronostique.

Les modèles de régression s'écrivent sous la forme d'une relation entre le risque instantané de faire l'événement et les variables explicatives considérées. Le modèle s'écrit de la façon suivante :

$$\lambda(t|Z_1, \dots, Z_p) = \lambda_0(t) e^{\beta_1 Z_1 + \dots + \beta_p Z_p}$$

$\lambda_0(t)$ correspond à la fonction de risque de base (ne dépendant que du temps)

$e^{\beta_1 Z_1 + \dots + \beta_p Z_p}$ correspond à l'effet des variables p explicatives (aucune dépendance du temps)

β_i sont les paramètres à estimer

Dans le modèle de Cox on suppose que l'effet de chaque variable sur l'événement est constant au cours du temps, de même que le rapport des risques instantanés de deux individus i et j . Le rapport des risques instantanés d'événement représente le risque relatif à l'instant t des sujets ayant les caractéristiques Z_i par rapport à ceux ayant les caractéristiques Z_j . Ce rapport de risque est plus connu sous le nom de *Hazard ratio* (HR). Il est important de comprendre que le HR s'interprète systématiquement par rapport à une catégorie de référence. Si on prend l'exemple de la variable sexe : un HR = 1,33 pour les hommes s'interprétera comme une « augmentation de 33% du risque de faire l'événement » par rapport aux femmes. Le HR est toujours accompagné de deux paramètres :

1. L'intervalle de confiance à 95% (IC95%) marqueur de la précision de la mesure
2. La p-value testant l'association des covariables avec la distribution de survie. En général il s'agit du test de Wald.

3.2.4.2.2 Conditions d'application du modèle de Cox

Comme précisé précédemment, dans le modèle de Cox on considère que le rapport des risques instantanés correspondants à deux populations de caractéristiques différentes ne dépend pas du temps, autrement dit le risque de faire l'événement conféré par une variable est constant au cours du temps. Il s'agit de l'hypothèse des risques proportionnels.

Pour vérifier cette hypothèse, deux méthodes sont à disposition : l'une graphique et l'autre analytique.

La méthode graphique est un moyen simple d'évaluer la proportionnalité des risques (97). Le principe est d'estimer le logarithme de la fonction de risque cumulé pour chaque niveau de la stratification de chaque variable. On trace alors le graphique des estimations de $\ln[H(t)]$ en fonction du temps (t). Si les risques sont proportionnels, les courbes doivent avoir un écart constant au cours du temps. Cette méthode est simple, mais reste subjective et ne permet d'estimer qu'une variable à la fois.

La méthode analytique consiste en l'analyse des résidus de Schoenfeld. Cette analyse permet d'estimer la proportionnalité des risques de plusieurs variables simultanément.

3.2.5 Bonnes pratiques pour la création d'un score pronostic et d'un nomogramme

Iasonos et al ont décrit récemment les étapes clés de la construction d'un nomogramme (98). Ces étapes visent à la construction d'un modèle multivarié de Cox le plus précis possible afin d'expliquer l'événement choisi, ainsi que de valider la qualité de ce modèle. Ces étapes sont indispensables pour pouvoir interpréter de façon satisfaisante les résultats du modèle final et du nomogramme. Elles sont résumées dans le tableau suivant.

Etapes initiales de la construction d'un nomogramme
1. Définir la population et la source des données
2. Définir l'événement à prédire
3. Identifier les covariables explicatives
4. Sélection du modèle Sélection des covariables du modèle multivarié Evaluer les interactions et facteurs de confusion Transformation des variables quantitatives
5. Validation Interne ou externe

Tableau : étapes de la construction d'un nomogramme, d'après Iasonos et al, *J Clin Oncol* 2008.

3.2.5.1 Construction du modèle multivarié

Après avoir défini la population et l'événement d'intérêt à prédire, l'étape cruciale est la construction du modèle multivarié permettant d'expliquer le plus précisément le risque de faire l'événement. Pour cela nous avons utilisé les modèles de Cox dont le principe est expliqué ci-dessus. Une première recherche des liens entre les variables et l'événement d'intérêt va être faite en les testant une à une (univarié). Pour chaque variable nous allons donc disposer d'un HR, 95%IC, et p-value.

Une fois cette première étape faite, il va falloir sélectionner les variables explicatives pour les inclure dans un modèle multivarié. La sélection s'effectue selon deux critères :

1. La significativité statistique de l'association entre les variables et l'événement en univarié. Dans ce cas, la valeur de p considérée comme significative est généralement augmentée à 0,10 (et non 0,05) afin de ne pas manquer une association potentiellement masquée par des phénomènes de confusion.
2. La littérature scientifique. En effet, il est recommandé d'inclure une variable connue comme fortement pronostique de l'événement d'intérêt même si elle n'atteint pas la significativité statistique en univarié. Cette approche permet d'éviter les fluctuations d'échantillonnage en lien avec la population de développement du modèle, et permet la comparaison aux autres études déjà publiées (généralisation du modèle).

Le nombre de variables à inclure dans le modèle dépend principalement de la taille de l'échantillon et donc du nombre d'événements observés. D'après les recommandations de Harrell sur la construction de modèles multivariés, il faut inclure au maximum 1 variable pour 10 événements (99). Par exemple, si on cherche à expliquer la survenue d'une rechute tumorale pour une population de 200 patients et que 80 rechutes sont survenues, on pourra inclure dans le modèle multivarié 8 variables au maximum.

3.2.5.2 Colinéarité et facteurs de confusion

Certaines variables peuvent être liées les unes aux autres par des liens plus ou moins évidents. Dans ce cas, deux variables peuvent être statistiquement liées à l'événement en analyse univariée et être incluses dans le modèle multivarié alors que l'information qu'elles apportent est redondante. Par exemple, il est possible que le stade TNM et le statut pT de la

tumeur soient associés à l'événement chacun séparément. Or, ces variables véhiculent en partie la même information puisque le stade TNM est basé sur le statut pT de la tumeur. En cas de colinéarité, les betas du modèle de Cox multivarié peuvent être affectés, résultant en des associations fausses et des résultats incertains.

Le moyen le plus fréquent pour démasquer la colinéarité de certaines variables d'un modèle est l'analyse de leur corrélation (100). En cas de colinéarité, il faut choisir la plus pertinente à garder dans le modèle. Cependant, ce choix peut engendrer une perte d'information.

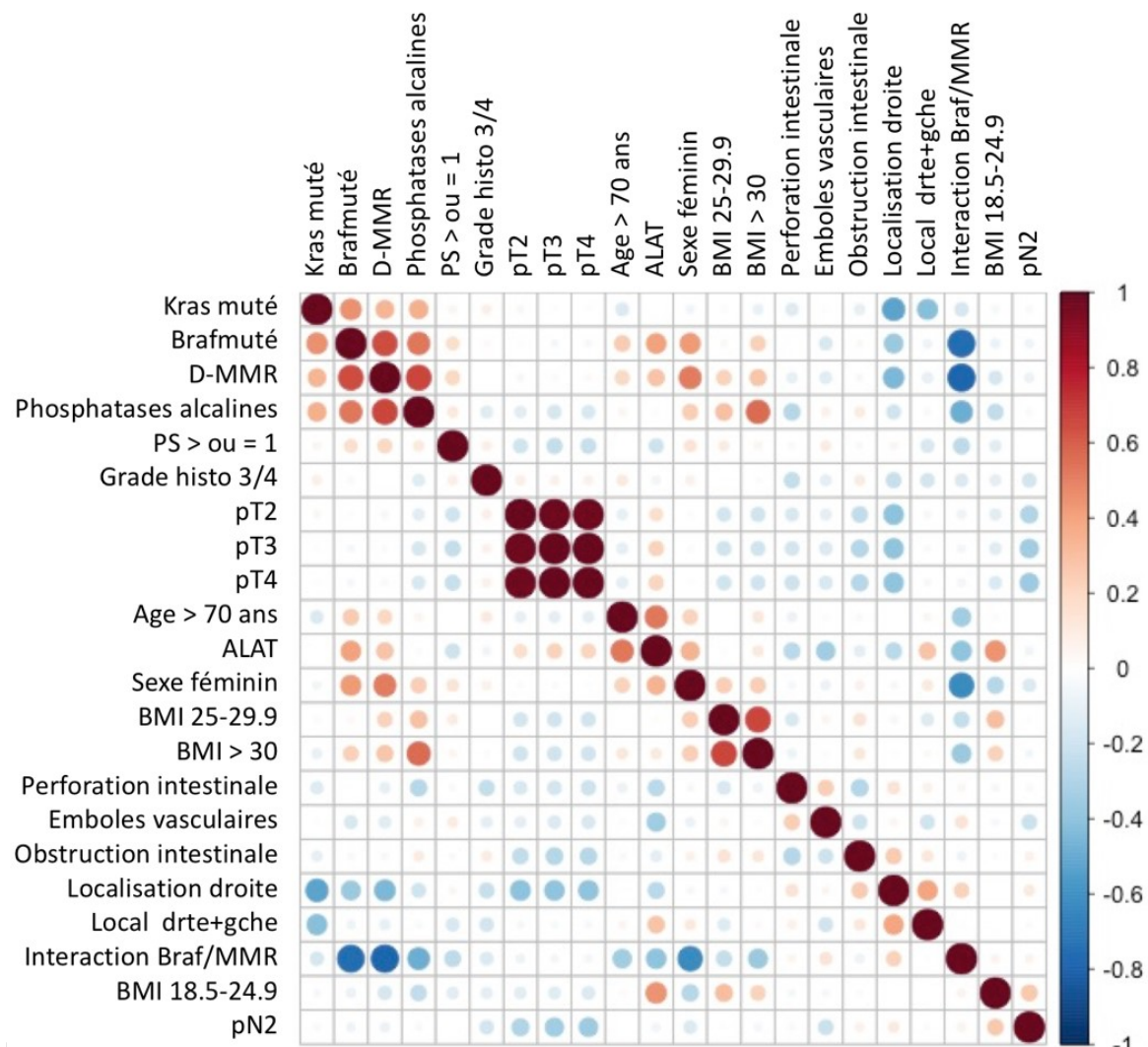


Figure : exemple de matrice de corrélation pour un modèle multivarié. L'intensité des couleurs représente l'importance des corrélations entre les variables (positives en rouge, négatives en bleu).

3.2.5.3 Transformation des variables quantitatives

Comme décrit plus amplement dans la partie précédente, nous pouvons être amenés à transformer des variables continues afin de coller au mieux à la distribution du risque de faire l'événement. Cette étape est importante pour la précision du modèle.

3.2.5.4 Validation du modèle

La validation du modèle correspond aux étapes permettant de vérifier sa cohérence et sa capacité de prédiction de l'événement. La « distance » entre les prédictions et les événements observés s'appelle la calibration. La capacité d'un modèle à séparer les patients ayant des devenirs différents (en rapport avec l'événement étudié) s'appelle la discrimination.

3.2.5.4.1 Calibration

La calibration d'un modèle s'étudie sous forme d'un graphique. Celui ci représente les probabilités de faire l'événement prédite par le modèle par rapport aux événements observés. Un modèle totalement calibré doit donner un graphique linéaire suivant la ligne de 45°. Ci-dessous sont montrés les graphiques de calibration du modèle construit plus loin dans cette thèse.

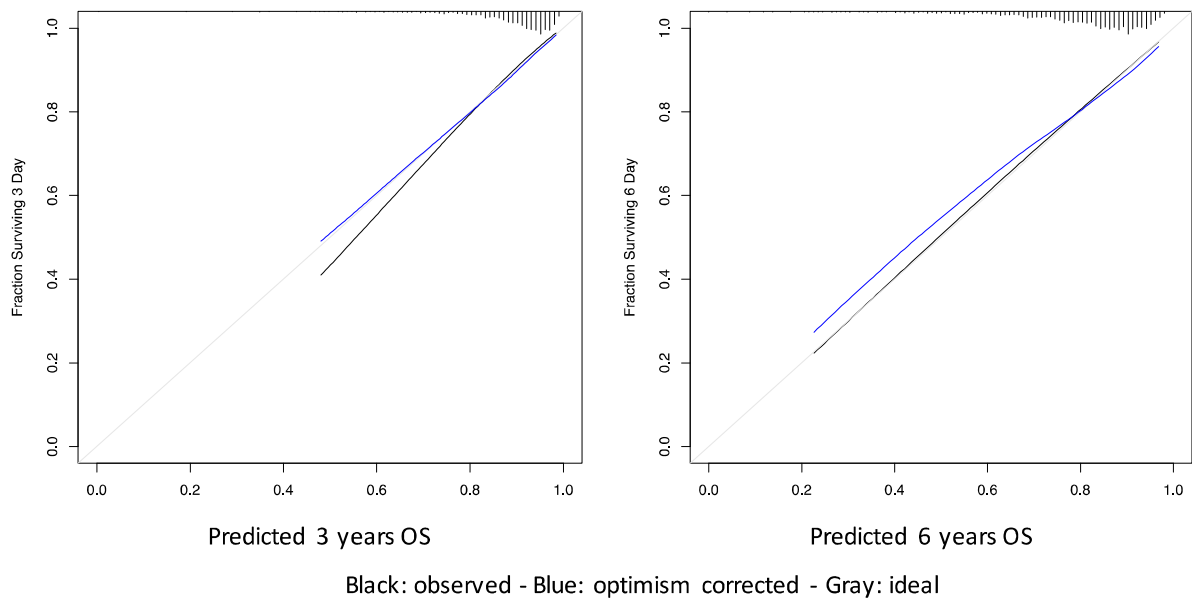


Figure : graphique de calibration d'un modèle prédisant la survie globale dans le cancer du colon de stade III à 3 et 6 ans. On remarque que la courbe noire (événements observés) est quasiment superposée à la courbe bleue (événements prédits par le modèle), reflétant une bonne calibration.

3.2.5.4.2 Discrimination

La discrimination du modèle est mesurée grâce au concordance-index ou c-index. Il est adapté de l'aire sous la courbe (courbes ROC) pour les données de survie censurées (101,102). Cet outil de mesure permet de quantifier le niveau de concordance entre les probabilités prédites par le modèle et la chance observée de faire l'événement étudié. Autrement dit, il s'agit de la proportion de paires de sujets concordantes pour la survenue de l'événement et le temps d'occurrence de l'événement. Cependant le c-index ne prend pas en compte les patients ayant des données censurées. L'indice de Harrell s'interprète de la même façon que l'aire sous la courbe ROC : il est compris entre 0 et 1. Un c-index égal à 0,5 ne confère aucune capacité discriminante au modèle alors qu'un c-index de 1 discrimine parfaitement le risque de faire l'événement. Il est recommandé d'accompagner le c-index d'un intervalle de confiance afin d'apprécier au mieux la précision de l'indice. Cet intervalle de confiance peut être obtenu par re-échantillonnage ou *bootstrap* dont nous verrons le principe après.

Pour évaluer la valeur additionnelle de blocs de variables dans la discrimination du modèle, le c-index a été calculé à chaque fois en rajoutant bloc de variables par bloc de variables dans le modèle. Il est important que chacun des modèles soient étudiés sur la même population. En effet, le modèle de Cox ne prenant pas en compte les données manquantes, il est possible que l'ajout de variables dans le modèle diminue le nombre de patients sur lequel il s'applique. On ne pourra donc pas savoir si le c-index est modifié par la perte d'informations ou l'ajout des variables.

3.2.5.4.3 Validation interne et *bootstrap*

Afin d'évaluer la précision de notre modèle, il est nécessaire de réaliser une validation interne. Le but est de vérifier que les résultats ne sont pas liés à une fluctuation d'échantillonnage. Le principe du re-échantillonnage ou *bootstrap* est le suivant : au sein du jeu de données disponible, un nombre défini d'échantillons vont être tirés au sort en remplaçant à chaque fois les données (donc un patient peut être tiré au sort pour plusieurs échantillons). Les 1000 échantillons ont la taille de la cohorte initiale. Par exemple le patient A peut apparaître 10 fois dans un des échantillons alors que le patient B peut ne pas apparaître dans ce même échantillon. Approximativement chaque échantillon du *bootstrap* contient les deux tiers des observations originales (103). Un nombre d'échantillons supérieur à 200 permet d'estimer de façon fiable la stabilité du modèle. Dans ce travail nous avons utilisé 1000 itérations à chaque fois.

Le modèle final sera appliqué sur chaque échantillons et donc des HR, 95%IC et c-index seront donnés pour chaque échantillon. A partir de ceux-ci nous pouvons extraire un intervalle de confiance à 95% pour chaque variable du modèle ainsi que pour le c-index. Nous pourrions vérifier que le HR obtenu dans notre cohorte initiale est bien contenu dans le 95%IC du *bootstrap*.

3.2.5.4.4 Validation externe

La validation externe consiste en l'application du modèle ou du nomogramme obtenu dans une population à une autre cohorte complètement distincte. Il s'agit de la meilleure façon de valider des résultats. Elle permet d'estimer si les résultats initiaux sont généralisables à la population entière. Généralement, le c-index du modèle est moins élevé dans la population de validation externe que dans la cohorte initiale.

Une cohorte de validation externe peut cependant être difficile à obtenir car les études ne disposent pas toutes des mêmes données. C'est le cas pour certaines parties de ce travail.

3.2.5.5 Valeurs manquantes (*imputation multiple*)

Comme expliqué ci-dessus, le modèle de Cox ne considère que les sujets dont les données sont disponibles pour toutes les variables incluses dans le modèle, ce qui signifie que si un seul renseignement manque, le sujet sera exclu de l'analyse. Un certain nombre de patients sera donc perdu. Cela induit un risque de biais si les données manquantes ne sont pas liées au hasard. Par exemple, si un facteur n'est pas disponible chez un certain nombre de patients qui sont tous morts, alors il ne sera pas rentré comme facteur de confusion dans le modèle et les résultats de l'estimation du pronostic des patients risquent d'être faussés. La validité d'un modèle de Cox repose donc directement sur le nombre de données manquantes.

Lorsque les données ne sont pas récupérables, comme cela peut être le cas dans le cadre de recueil de données rétrospectives, il est nécessaire d'effectuer des analyses de sensibilité des résultats avec des techniques d'imputations multiples. Le but est de vérifier que les résultats avec et sans imputation sont convergents. La validité du modèle sera ainsi montrée.

Pour faire office d'exemple, voici le tableau de l'analyse de sensibilité avec imputation multiple pour un modèle cherchant à montrer le caractère pronostique de l'ACE sur la survie globale chez des patients atteints d'un cancer du colon de stade III inclus dans l'étude MOSAIC. Les coefficients beta du modèle initial (n=531 patients) ne divergent pas de celui du modèle avec imputation (n=1347 patients avec 250 imputations) en dehors du statut moléculaire MMR/*BRAF*. On peut donc considérer les résultats du modèle fiables sauf pour le statut moléculaire.

		Modèle multivarié dans la cohort initiale (n patients=531)			Modèle multivarié après imputation multiple (n=250 imputations n patients= 1347)		
		Beta	SE	P	Beta	SE	p
Age	Sup 70	0.4811	0.1810	0.008	0.3245	0.1246	0.009
Grade histologique	Grade 3 or 4	0.6471	0.2154	0.003	0.2704	0.1367	0.05
Dosage de l'ACE	1.30 to 5	0.5456	0.1564	<0.0001	0.3671	0.1004	<0.0001
	> 5	0.8567	0.3175		0.9038	0.2243	
BRAF/MMR	BRAF ^{mut} /pMMR	1.9831	0.7640	0.03	0.5368	0.4481	NS
	R						
	BRAF ^{WT} /dMMR	1.1049	0.8124		0.1917	0.4943	
	R						
	BRAF ^{WT} /pMMR	1.6687	0.7281		0.3892	0.4108	
	R						
Stade T	T3	0.7790	0.4208	0.005	0.6041	0.2325	<0.0001
	T4	1.1926	0.4358		1.0458	0.2451	
Stade N	N2	0.6783	0.1506	<0.0001	0.6462	0.0970	<0.0001

NS: non-significatif (p>0.05), SE: standard error

Abbreviations: stades T et N: stades de la tumeur ou des ganglions selon la classification TNM, dMMR: deficient mismatch repair, pMMR: proficient mismatch repair, WT: sauvage, mut: muté.

Tableau : exemple de modèle avec imputation multiple. Ici, il s'agit d'un modèle de Cox multivarié expliquant la survie globale chez des patients atteints de cancer du colon de stade III traités au sein de l'essai MOSAIC.

3.2.6 Outils pronostiques

Nous avons sélectionné les variables explicatives de l'événement et construit le modèle de Cox multivarié selon les étapes décrites précédemment. Nous avons vérifié sa discrimination et sa calibration, et nous avons réalisé une validation interne. L'étape suivante de la recherche pronostique est d'utiliser les informations données par ce modèle afin que les cliniciens puissent s'en servir en pratique courante.

Deux approches sont alors possibles pour exploiter au mieux les données du modèle :

1. Une approche individuelle sous forme d'un nomogramme
2. Une approche populationnelle sous forme d'un score pronostique

3.2.6.1 Approche individuelle : nomogramme

Le principe du nomogramme est de prendre en compte la valeur relative de chacune des variables du modèle de Cox afin de prédire l'événement. Le nomogramme permet de donner une probabilité de faire l'événement à un temps choisi. Une pondération basée sur

les paramètres betas du modèle est appliquée. Cette approche est intéressante mais n'est pas très visuelle, et moins précise car les betas peuvent être arrondis et l'estimation du pronostic peut en être moins bonne.

Comme montré dans l'introduction, plusieurs nomogrammes existent dans le cancer du colon localisé. La figure suivante montre pour exemple le nomogramme développé par Renfro et al à partir de la base de données ACCENT, et publié dans le *Journal of National Cancer Institute* en 2014. Un nombre de points est assigné pour chaque facteur de risque en traçant une ligne verticale vers la ligne correspondant aux points. Le total de points pour tous les facteurs de risque est tracé sur la ligne correspondant à la somme totale des points. Une ligne verticale vers le bas est ensuite tracée pour déduire les prédictions correspondantes aux temps d'intérêt. Le nomogramme est issu d'un calcul complexe et peut être implémenté en ligne afin d'être accessible au plus grand nombre.

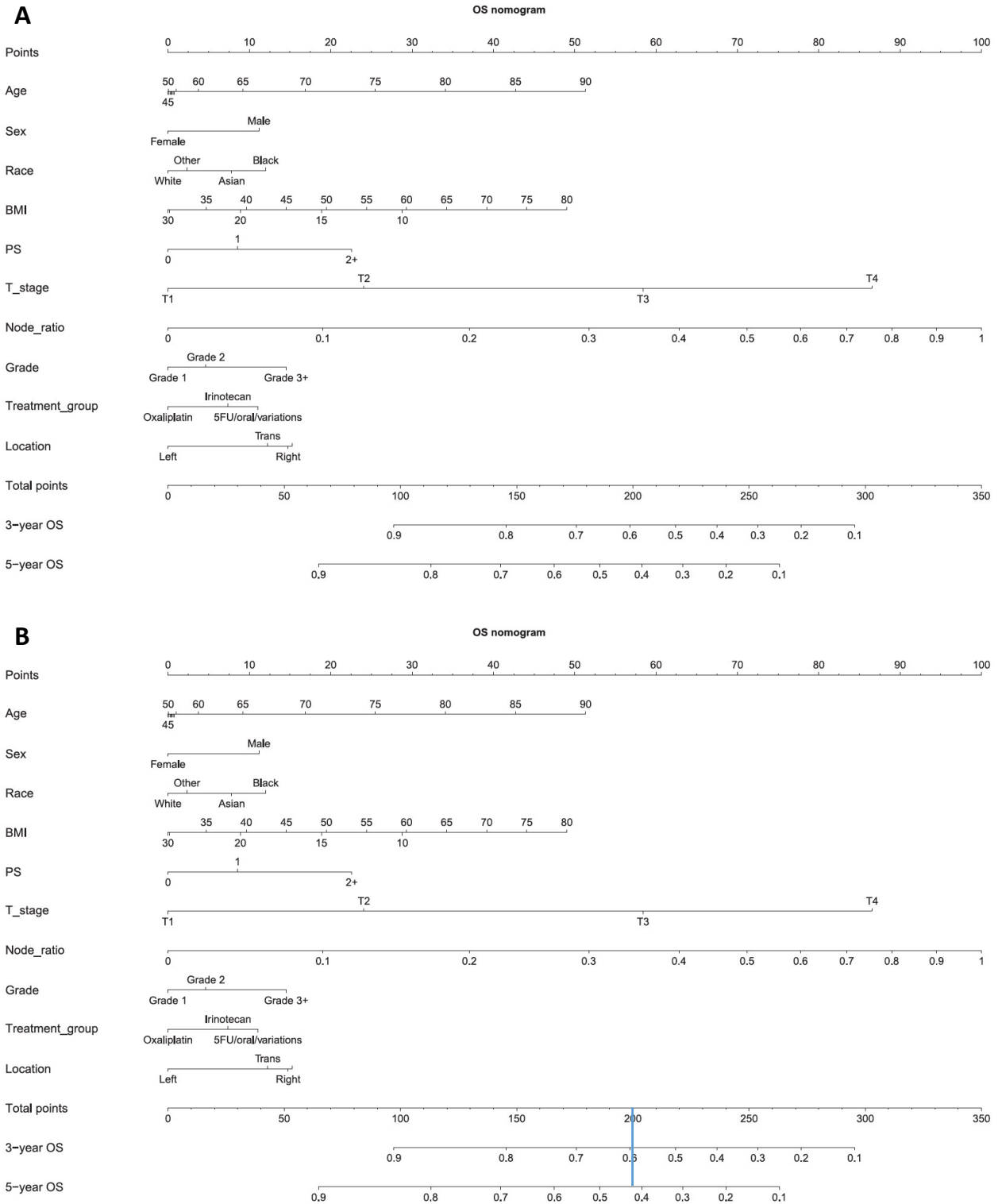


Figure : exemple de nomogramme pour prédire la survie globale à 3 et 5 ans chez les patients traités pour un cancer du colon de stade III (d'après Renfro et al, *J Natl Cancer Inst* 2014). **A**, nomogramme vierge. **B**, nomogramme montrant la façon de regarder les prédictions de survie : pour un total de 200 points, la survie à 3 ans est estimée à 60%, et à 5 ans à 42%.

3.2.6.2 *Approche populationnelle : calcul du score pronostique*

L'autre approche pour l'expression des résultats du modèle multivarié est l'intégration des variables dans un score pronostique permettant de déterminer dans quelle population à risque de faire l'événement se situe le patient. Le but d'une telle approche est de pouvoir stratifier les essais randomisés en fonction des groupes de risque définis, et d'éventuellement identifier des populations bénéficiant ou non de certains traitements.

Comme le nomogramme le calcul des points du score pronostique est basé sur les coefficients betas du modèle de Cox. Dans un premier temps il faut identifier la variable ayant le plus grand impact pronostique sur l'événement d'intérêt. Pour cela, un graphique représentant la part de la variance de chaque variable au sein du modèle est généré.

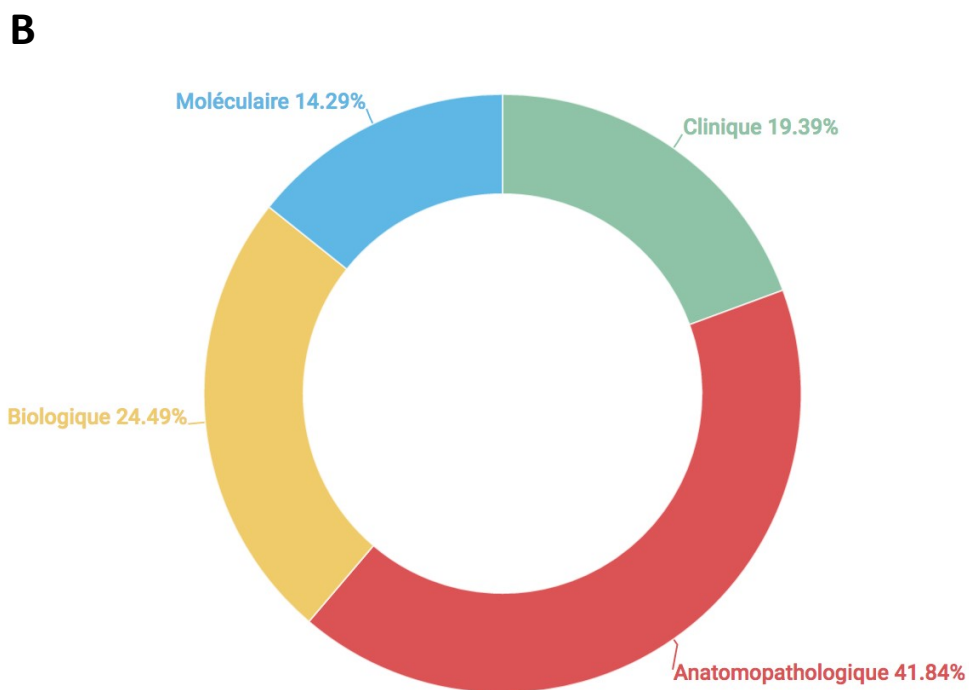
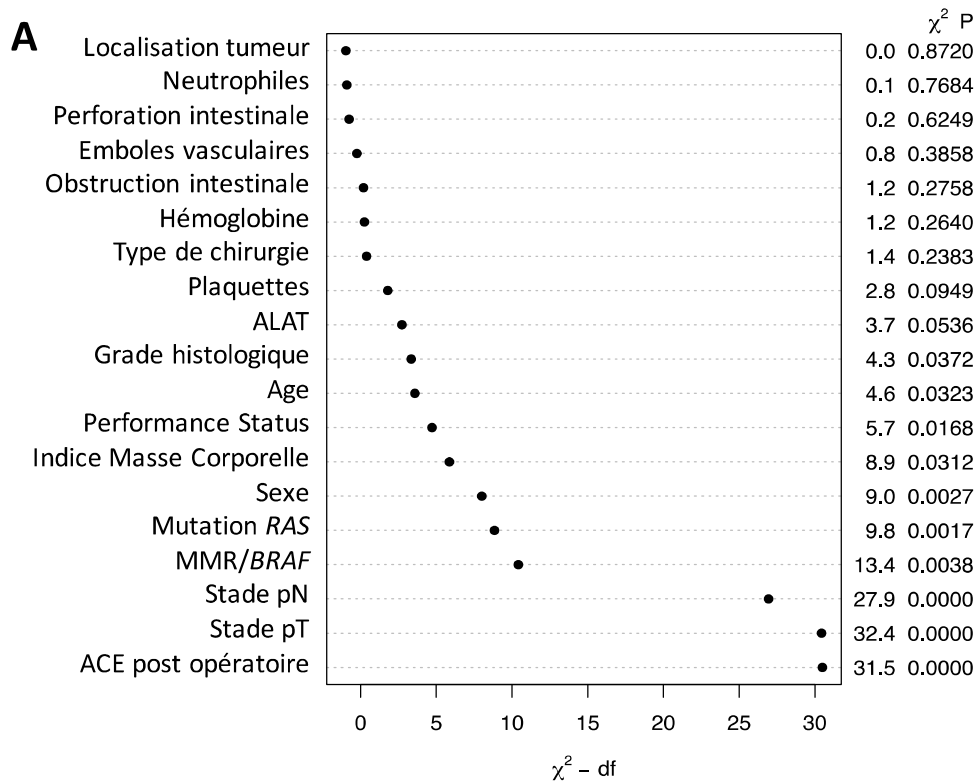


Figure : **A**, représentation graphique de la part de la variance dédiée à chaque variable au sein du modèle multivarié explicatif de la survie globale dans l'étude PETACC-8. **B**, cette représentation peut se faire de façon plus visuelle sous forme d'histogramme regroupant les différents groupes de variables d'intérêt.

Dans l'exemple ci-dessus, nous avons expliqué la survie globale des patients ayant un cancer du colon de stade III traités par chimiothérapie adjuvante au sein de l'étude PETACC-8. Le graphique montre que la variable la plus importante dans l'explication du pronostic des patients en terme d'OS est l'ACE suivi de très près par le statut pT de la tumeur. C'est donc à partir de la variable ACE que nous allons développer notre score pronostique.

Le nombre maximum de point est arbitrairement fixé à 100. Il est attribué à la valeur maximale de l'ACE. Ainsi pour chaque variable, le nombre maximal de points attribuable à un patient (*i*) selon les caractéristiques présentées peut être obtenu comme suit :

1. Pour une variable catégorielle :

Le calcul du nombre point est assez simple car les variables sont codées de façon à ce que le nombre de point maximal par variable soit le nombre de point effectif pour chaque patient présentant cette caractéristique.

$$Points \max(i) = 100 \times \frac{\beta_i}{\beta_{\max}}$$

β_i correspond au coefficient beta du modèle de Cox pour la caractéristique
 β_{\max} correspond au coefficient beta maximal du modèle de Cox (dans l'exemple il s'agira du coefficient de l'ACE).

2. Pour une variable continue :

Une première transformation est d'abord nécessaire pour calculer le coefficient du nombre de point maximal attribuable (le coefficient beta correspond à la variation d'une unité de la variable continue) :

$$coef \beta \text{ global} = \beta_i \times (\max i - \min i)$$

β_i correspond au coefficient beta du modèle de Cox pour la caractéristique
 $\max i$ et $\min i$ correspondent respectivement aux valeurs maximale et minimale de la variable continue dans notre échantillon.

La deuxième étape consiste à calculer le plus grand nombre de points attribuables à la variable en question :

$$Points \max(i) = 100 \times \frac{\beta_{global}}{\beta_{max}}$$

β_{global} correspond au coefficient beta global de la variable continue
 β_{max} correspond au coefficient beta maximal du modèle de Cox (dans l'exemple il s'agira du coefficient de l'ACE).

Enfin pour chaque patient on pourra calculer le nombre de points du score en fonction des caractéristiques du patient :

$$Total \ points = \sum Points \ variables \ score$$

3.2.6.3 Choix du nombre de groupes

Le score pronostique ainsi calculé est une variable continue dont la catégorisation va permettre de définir des groupes de risque différents pour l'événement d'intérêt. Le nombre du groupe à choisir va dépendre de l'hétérogénéité du risque des patients au sein de la population globale. En effet, si la population est très hétérogène il y aura besoin d'un nombre important de groupes pronostiques alors que si elle est homogène en terme de risque de faire l'événement, un nombre limité de groupes sera représentatif (2 voire 3 groupes). La plupart du temps, le but est d'identifier des patients aux risques extrêmes, c'est à dire de très mauvais ou de très bon pronostic. Le problème posé par cette approche est l'isolement de populations de risque intermédiaire. Ils posent des questionnements en terme de prise en charge clinique. Le choix du nombre de groupes pronostiques est plus simple quand l'objectif est une catégorisation binaire des patients : le nombre de groupes est alors de deux. Si l'objectif est de définir des populations de risque différent afin de stratifier un essai clinique, alors le nombre de groupes pronostiques ne peut pas être trop important car il risque de compliquer considérablement une randomisation.

Le choix des seuils pour la catégorisation de la variable continue « score pronostique » peut s'effectuer comme décrit précédemment par la méthode de

maximisation du log-rank. Cette méthode permet de catégoriser de façon binaire la variable. Cependant, on peut décider de définir plus que deux groupes pronostiques. Dans ce cas, nous avons souvent tendance à vouloir définir 3 ou plus de groupes de tailles comparables en se basant sur les percentiles de distribution de la variable. Or, il n’y a aucune raison pour que les patients de pronostics extrêmes (bon ou mauvais) soient équivalents en nombre aux autres. C’est cette idée qui sous-tend l’approche que nous avons choisie pour définir plus que deux groupes pronostiques. Elle a été décrite par Cox (104). Elle permet de définir des groupes pronostiques grâce à des seuils préétablis à l’avance qui dépendent d’une constante (α), de la moyenne (m) et de l’écart-type (ET) de la variable continue à catégoriser. Les groupes de pronostics extrêmes seront de plus petite taille, ce qui permet d’accentuer leur force pronostique puisque les patients ayant vraiment le pire ou le meilleur pronostic seront identifiés par cette méthode. Les valeurs de α sont montrées ci-dessous.

OPTIMAL m SIZES AND PROBABILITY OF PURCHASE, STANDARD NORMAL DISTRIBUTION

i	m									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.697	0.046	-0.321	-0.575	-0.767	-0.920	-1.048	-1.156	-1.251	-1.334
2		1.161	0.498	0.117	-0.149	-0.351	-0.513	-0.649	-0.764	-0.865
3			1.440	0.780	0.397	0.128	-0.078	-0.245	-0.384	-0.503
4				1.638	0.985	0.604	0.334	0.127	-0.041	-0.183
5					1.792	1.146	0.767	0.499	0.291	0.122
6						1.916	1.277	0.902	0.635	0.428
7							2.020	1.388	1.016	0.751
8								2.110	1.484	1.116
9									2.189	1.569
10										2.258
F^*/c	0.313	0.471	0.568	0.635	0.683	0.720	0.749	0.772	0.792	0.808

Figure : tableau issu de la méthode de Cox pour définir les seuils d’une variable continue. En fonction du nombre de groupes choisis, la table propose une valeur de α permettant de calculer le seuil.

Par exemple, si on prend une variable continue que nous voulons transformer en 3 catégories (donc 2 valeurs seuils nécessaires). Considérons que cette variable a pour moyenne m et pour écart-type ET . Nous allons nous référer au tableau pour trouver les 2 valeurs de α nécessaires pour le calcul.

OPTIMAL m SIZES AND PROBABILITY OF PURCHASE, STANDARD NORMAL DISTRIBUTION

i	m									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.697	0.046	-0.321	-0.575	-0.767	-0.920	-1.048	-1.156	-1.251	-1.334
2		1.161	0.498	0.117	-0.149	-0.351	-0.513	-0.649	-0.764	-0.865
3			1.440	0.780	0.397	0.128	-0.078	-0.245	-0.384	-0.503
4				1.638	0.985	0.604	0.334	0.127	-0.041	-0.183
5					1.792	1.146	0.767	0.499	0.291	0.122
6						1.916	1.277	0.902	0.635	0.428
7							2.020	1.388	1.016	0.751
8								2.110	1.484	1.116
9									2.189	1.569
10										2.258
F^*/c	0.313	0.471	0.568	0.635	0.683	0.720	0.749	0.772	0.792	0.808

Pour le premier seuil nous aurons donc le calcul suivant :

$$m + 0,046 \times ET$$

Pour le deuxième seuil nous aurons :

$$m + 1,161 \times ET$$

Notons que cette méthode prend pour hypothèse que la variable continue suit une loi normale. Pour la suite de ce travail nous définirons 3 groupes pronostiques.

3.3 Valeur prédictive

Dans les parties ci-dessus nous avons développé la méthodologie pour l'étude d'un facteur pronostique et la construction d'un score visant à expliquer la probabilité qu'un patient de faire un événement donné. Ces scores sont souvent développés à partir de cohortes de patients pris en charge de façon spécifique. Ces outils sont alors valables dans les situations pour lesquelles ils ont été créés. En Oncologie, les patients sont souvent issus d'essais randomisés visant à comparer l'efficacité de deux traitements. Cette situation permet alors d'évaluer le caractère prédictif de la réponse à un des traitements selon les groupes pronostiques identifiés par le score.

Dans ce travail, nous avons deux cohortes (MOSAIC et PETACC-8) évaluant toutes les deux l'ajout d'une molécule de chimiothérapie (oxaliplatine pour l'étude MOSAIC) ou d'une

thérapie ciblée (cetuximab pour l'étude PETACC-8) à une base de chimiothérapie reconnue comme étant le standard de traitement à l'époque de chaque étude. Nous avons donc pu regarder le caractère prédictif de « l'intensification » thérapeutique de nos outils pronostiques au sein de chaque cohorte :

- Effet prédictif de l'élévation de l'ACE pour le bénéfice de l'adjonction d'oxaliplatine au LV5FU2 chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade II et III inclus dans l'étude MOSAIC.
- Effet prédictif de l'appartenance à un groupe pronostique défini par notre score intégratif pour le bénéfice de l'adjonction du cetuximab au FOLFOX chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade III inclus dans l'étude PETACC-8.

Le caractère prédictif des éléments cités ci-dessus sur le bénéfice de l'intensification thérapeutique en adjuvant a été testé à l'aide d'un terme d'interaction dans le modèle de Cox. Ce terme d'interaction permet de mesurer l'association de chaque modalité d'une variable 1 en fonction de chaque modalité d'une variable 2. On peut ainsi voir si la probabilité de faire l'événement d'intérêt varie en fonction des variables 1 et 2 conjointes. L'analyse par le modèle de Cox donnera une p valeur globale de l'interaction. Usuellement, on utilise un seuil de significativité plus élevé pour l'interaction avec une valeur de p de 0,10. Une interaction significative permet d'interpréter l'association entre les variables 1 et 2 (différentes possibilités selon les modalités de chaque variable) et l'événement d'intérêt.

Une fois l'interaction mise en évidence, nous avons analysé les données de survie à travers une nouvelle variable 3 (résultante des variables 1 et 2).

4 RESULTATS

4.1 Bilan de la littérature concernant les facteurs pronostiques dans le cancer du colon localisé de stade III

Dans l'introduction de cette thèse, nous avons détaillé les principaux facteurs pronostiques des cancers du colon de stade III. Ce travail de synthèse de la littérature a été publié afin de poser les bases de ce travail de thèse.

Le manuscrit scientifique est montré ci-après.

REVIEW

Subgroups and prognostication in stage III colon cancer: future perspectives for adjuvant therapy

E. Auclin^{1,2}, A. Zaanan^{1,3}, D. Vernerey², R. Douard⁴, C. Gallois¹, P. Laurent-Puig^{3,5}, F. Bonnetain² & J. Taieb^{1,3*}

¹Department of Digestive Oncology, European Georges Pompidou Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris; ²Methodological and Quality of Life in Oncology Unit, Besançon; ³Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris; ⁴Department of Digestive Surgery, European Georges Pompidou Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris; ⁵Department of Biology, European Georges Pompidou Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, INSERM-UMR-S1147, Paris, France

*Correspondence to: Prof. Julien Taieb, Service d'Oncologie Digestive, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France. Tel: +33-1-56093551; Fax: +33-1-56093441; E-mail: julien.taieb@aphp.fr, jtaieb75@gmail.com

Since the MOSAIC study, oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy has been the standard treatment of stage III colon cancer. Combination therapy with fluoropyrimidines and oxaliplatin has improved overall survival (OS) and reduced the risk of recurrence in patients with resected stage III colon cancer. However, only 20% of patients really benefit from adjuvant chemotherapy, exposing 80% of patients to unnecessary toxicity. Recent analyses of large multicenter adjuvant studies have focused on the prognostication of OS and disease-free survival in stage III colon cancer in order to reduce over-treatment and to find more accurate prognostic tools than those used for adjuvant treatment decision-making in stage II disease. Indeed, clinical and pathological prognostic factors, although important, are not sufficient to decide which stage III patients will benefit from adjuvant therapy, and biomarkers will help select patient that need adjuvant treatment. Molecular markers such as microsatellite status and *BRAF* and *KRAS* mutations have recently been explored, and molecular signatures have been identified as promising prognostic factor for OS. Furthermore, recent studies have highlighted the prognostic value of immune infiltration. This review focuses on pathologic, immunologic and molecular prognostic markers for stage III colon cancer that could help clinicians tailor adjuvant treatment in a comprehensive transversal approach.

Key words: stage III, colon cancer, prognosis, molecular classification, biomarkers

Introduction

With 1 360 802 new cases worldwide in 2012, colon cancer is the third most frequent cancer in males and the second in females [1]. Fluorouracil-based chemotherapy is the standard adjuvant treatment of localized disease. In stage III patients, the risk of death decreases by 10%–15% when fluorouracil monotherapy follows surgical resection, and by 20% when fluoropyrimidine and oxaliplatin combination therapy is used [2–4]. In summary, 50% of the stage III patients are cured by surgery alone, 20% with addition of adjuvant chemotherapy, and 30% experience recurrence, which is generally fatal within 2–3 years [5].

Attempts to improve adjuvant treatment of stage III disease by adding targeted agents, such as cetuximab and bevacizumab, have been unsuccessful [6–11].

Current European and US guidelines recommend fluoropyrimidine–oxaliplatin combination therapy for 6 months after surgery for stage III colon cancer patients who are able to receive it. A better understanding of tumour biology and prognostic factors is needed to refine stage III disease classification and to tailor adjuvant treatment, thereby avoiding unnecessary toxicity in some patients.

This review summarizes current knowledge of prognostic factors in stage III colon cancer and discusses perspectives for refining the use of adjuvant treatment.

Table 1. Comparison of the existing prognostic scores

Stage	MSKCC score		ACCENT score	Numeracy
	Weiser et al., <i>J Clin Oncol</i> (2011)		Renfro et al., <i>J Natl Cancer Inst</i> (2014)	Gill et al., <i>J Clin Oncol</i> (2004)
	II and III		III	II and III
Variables included in the score	For OS: Age Sex pT, pN Number of positive and negative lymph nodes Grade	For DFS: Age Sex Tumour location CEA level pT Grade, lymphovascular invasion, perineural invasion Number of positive and negative lymph nodes Adjuvant chemotherapy	Age (only for OS) Sex Race (only for OS) Body mass index Performance status pT, Node ratio Grade Tumour location Adjuvant treatment	Age (only for OS) pT, pN Grade
End points	5 years OS and DFS		3 years and 5 years OS and TTR	5 years OS and DFS
Performance of the score	c-index: 0.68 for OS		c-index: 0.66 for OS; c-index: 0.65 for TTR	c-index: 0.66 for DFS

OS, overall survival; DFS, disease-free survival; TTR, time to recurrence; c-index, concordance index; CEA, carcino-embryonic antigen.

Pathological features and prognostic scores

Pathological staging remains the key to post-surgical prognostication. The most important factors in stage III disease are pT and pN status [12]. The 5-year cancer-specific survival rates for patients with pT4, pT3 and pT1–T2 tumors are ~30%, 63% and 88%, respectively [13], and 65% (95% CI 57%–72%) for pN1 tumours and 37% (95% CI 26%–48%) for pN2 tumours [13].

Beyond pT and pN staging, other pathological features are known to influence stage III colon cancer outcomes. Micrometastatic potential, evaluated in terms of vascular, lymphatic and perineural invasion, has been found to be even more important than pTNM status in some studies [14], but this is controversial. Perineural invasion has been correlated with worse disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), specifically in stage III patients [15, 16]. Perineural and lymphovascular invasion seemed to be synergistic in some studies [16], but not in others [13]. Although these prognostic factors are widely used for adjuvant treatment decision-making in stage II disease, their individual roles in stage III disease need to be clarified.

The lymph node ratio (LNR), defined as the number of positive nodes divided by the total number of nodes removed, seems to have strong prognostic value. In a retrospective study, 24 477 patients were divided into 4 groups of LNR: LNR1 (<1/14), LNR2 (between 1/14 and 0.25), LNR3 (0.25–0.50) and LNR4 (0.50–1.0), with 5-year survival rates of, respectively, 64.8%, 56.2%, 45.1% and 29.6% ($P < 0.0001$) [17]. Other studies have confirmed these results [18, 19]. However, Berger et al. found that the LNR in N2 patients was only prognostic for cancer-specific survival and not OS [20]. This discrepancy may be explained by the use of different LNR cut-offs.

Three prognostic scores for OS and DFS have been created on the basis of clinical and pathological features [21–23]. The required information variously includes age, sex, pT and pN status, pre-operative carcinoembryonic antigen (CEA), histopathological grade, vascular invasion or lymphatic infiltration, total lymph node number, lymph node involvement, N+/N ratio, the use of adjuvant treatment and the adjuvant regimen (Table 1).

The MSKCC score predicts OS and DFS at 5 years for all stages of colon cancer, while the Numeracy score focuses on stage II and III disease. The ACCENT online tool is the only one dedicated to stage III colon cancer. It predicts 3- and 5-year OS with a concordance-index (c-index) of 0.66, which is suboptimal. For example, the TNM classification alone achieves a c-index of 0.60, and this rises to 0.68 after adding age, sex, grade and the numbers of total and positive lymph nodes [24]. No prognostic score is currently used in daily practice.

In the last decade, molecular assessment of colon cancer has become more routine, notably including mismatch repair (MMR) status, and *BRAF* and *KRAS* mutations. We and others have found that these molecular markers have prognostic value for DFS and OS.

Mismatch repair

At the origins of carcinogenesis there are pathways responsible for three different tumour phenotypes: one associated with chromosomal instability, one with CpG methylator phenotype, and one with deficient DNA mismatch repair system [25–27].

DNA mismatch repair (MMR) deficiency is found in ~15% of colorectal cancers and induces the microsatellite instability (MSI)

phenotype, leading to accumulation of mutations in tumour DNA. Its prevalence decreases with tumour stage (I–II 20%, III 12%, IV 5%). About two-thirds of dMMR tumours are sporadic [28], while one-third are familial, being linked to the Lynch syndrome. Sporadic dMMR inactivation occurs in a context of a CpG island methylator phenotype [29]. Approximately half of sporadic dMMR cases are associated with *BRAF* mutations [28]. Sporadic dMMR colon cancer shares clinicopathological features with inherited dMMR colon cancer, but patients with sporadic dMMR are older at diagnosis than Lynch syndrome patients [28, 30].

Patients with stage II colon cancer and the dMMR phenotype have better clinical outcomes and lower recurrence rates without adjuvant treatment than patients with proficient MMR (pMMR or MSS) tumours [31–33]. However, the MMR phenotype appears to have less prognostic value in stage III colon cancer. A multicentre retrospective trial showed that DFS seems better in the case of dMMR tumours: the 3-year DFS rate was ~27% higher compared with pMMR tumours [34]. Post hoc analysis of large prospective trials showed that patients with stage III dMMR tumours do not have better OS than those with stage III pMMR tumours [34–36]. In those trials MMR status was determined prospectively. However in the analysis of N0147 trial by Sinicrope et al., there seemed to be a benefit in term of DFS only in patients with right-sided dMMR colon tumours [36]. The prognostic value of dMMR status was not confirmed in a recent pooled analysis of data from the PETACC-8 and N0147 trials [37]. In the pooled cohort of 4674 patients, the 3-year DFS was 75% for dMMR patients and 74% for pMMR patients (HR 0.87, 95% CI 0.71–1.07, $P=0.196$).

A retrospective pooled analysis of several studies suggests that the dMMR phenotype is associated with resistance to adjuvant 5FU chemotherapy [38, 39]. In another retrospective pooled analysis of adjuvant trials, within the dMMR subset, patients with sporadic dMMR did not benefit from 5FU-based adjuvant treatments, contrary to patients with the Lynch syndrome [31]. However, in stage III colon cancer, the post hoc analysis of the NSABP C-07 and MOSAIC trials showed that patients treated with a standard fluoropyrimidine plus oxaliplatin combination, dMMR patients seemed to derive the same benefit as pMMR patients from 5FU plus oxaliplatin chemotherapy [40, 41].

Close overlap between MMR status and other characteristics such as tumour immune infiltration, CIMP phenotype and *BRAF* mutations may be responsible for the conflicting data reported over the past decade [42]. Finally, recent clinical trials have shown some efficacy of immune checkpoint blockers in patients with dMMR metastatic colorectal cancer [43], and these drugs will soon be evaluated in adjuvant trials for patients with dMMR stage III colon cancer (NCT02912559).

CpG island methylator phenotype

CpG islands are genomic regions containing a large number of cytosine and guanine nucleotides, located in 5' regulatory regions (promoter regions) [44–49].

The CpG island methylator phenotype (CIMP) is the most recently identified mechanism of colon cancer carcinogenesis. It is observed in ~18% of colorectal cancers and is due to CpG island methylation in the promoter region of certain genes involved in

malignant transformation. The CIMP phenotype is defined by hypermethylation of at least three out of the five pre-defined markers involved in carcinogenesis. The most common molecular abnormalities associated with CIMP tumours are *BRAF*, *KRAS* and *TP53* mutations and the dMMR phenotype, although there is an imperfect overlap between CIMP and dMMR [27].

The prognostic value of CIMP in stage III colorectal cancer has been evaluated in only three studies: 2 retrospective monocentric studies and 1 post hoc analysis of the CALGB 89803 prospective trial [50–52]. The retrospective study of Van Rijnsoever et al. found that patients with CIMP-positive tumours had worse survival after surgery alone than patients with CIMP-negative tumours. Among patients treated with chemotherapy, there was no difference in survival between the CIMP-positive and -negative subgroups [51]. A second retrospective study defined two CIMP statuses, correlated with *BRAF* (CIMP1) and *KRAS* (CIMP2) mutations [50]. Patients with CIMP1 tumours had worse DFS (HR 3.9, 95% CI 1.08–14.35, $P=.015$) and higher recurrence rates (53% for CIMP1, 18% for CIMP2 and 26% for CIMP-negative tumours) [50]. The post hoc analysis of tumoural samples collected prospectively during the CALGB 89803 trial, that compared fluorouracile with fluorouracile + irinotecan (IFL regimen), confirmed these data, showing that patients with CIMP+ tumours had worse OS than those with CIMP-negative tumours (HR 1.36, 95% CI 1.01–1.84) [52]. This last work highlighted an interaction between CIMP and MMR status: CIMP+/dMMR patients had better OS than CIMP+/pMMR patients (HR 0.42, 95% CI 0.23–0.77, $P=0.004$), while MMR status had no impact in the CIMP-negative population. This study also suggested that CIMP+ patients arised benefit in OS from irinotecan-based chemotherapy compared with fluorouracile alone [52]. This difference was not found with other chemotherapy regimens. However, these findings were not confirmed in any other cohort.

More data are needed on stage III colon cancer and CIMP. Indeed, there are no data from prospective trials with homogeneous population. Even if CIMP seems to confer a worse prognosis, its overlap with *BRAF* mutations and MMR status makes it difficult to determine the independent prognostic value of CIMP positivity.

BRAF mutation

BRAF is one of the three functional human RAF proteins [53, 54]. This kinase is involved in cell proliferation, differentiation and death. *BRAF* V600E represents ~80% of *BRAF* mutations. It is present in ~9%–12% of patients with early-stage disease and in 5%–10% of patients with metastases [55]. *BRAF* mutations are associated with more right-sided primary tumours and with an increased risk of peritoneal and distant lymph node metastasis [55]. Recent guidelines recommend specific and aggressive management of *BRAF* V600E disease, including triplet chemotherapy with anti-VEGF targeted therapy [56]. However, the prognostic value of *BRAF* mutation needs to be defined in early-stage colon cancer. Data concerning the role of *BRAF* mutation in stage III colon cancer are pretty consistent as they are from post hoc analysis of large prospective adjuvant trials or prospective cohorts.

Table 2. Studies evaluating *BRAF* and *KRAS* mutations as prognostic factors for stage III colon cancer

Marker	Treatment	N	End points	HR for event occurrence	95% CI	Dataset	Reference	
<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i> mut and pMMR	FOLFOX +/- cetux	2559	OS	1.84	1.01–3.36	PETACC-8	Taieb et al. [58]
				DFS	1.74	1.14–2.69		
	<i>BRAF</i> mut and pMMR	FOLFOX +/- cetux	2720	DFS	1.43	1.11–1.85	NCCTG N0147	Sinicrope et al. [59]
				<i>BRAF</i> mut	5FU or FOLFIRI	506		
	<i>BRAF</i> mut and pMMR	–	1253	OS	1.36	1.0–1.84	Epidemiological cohort	Lochhead et al. [57]
					CSM	1.60		
	<i>BRAF</i> mut and dMMR	–	1253	CSM	0.48	0.27–0.87	Epidemiological cohort	André et al. [41]
				<i>BRAF</i> mut	5FU or FOLFOX	902		
<i>BRAF</i> mut	5FU or FOLFIRI	1404	OS	1.56	1.02–2.39	PETACC-3	Roth et al. [35]	
			stage II–III					
<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i> mut	FOLFOX +/- cetux	2559	OS	1.56	1.12–2.15	PETACC-8	Taieb et al. [58]
				DFS	1.55	1.23–1.95		
	<i>KRAS</i> mut	FOLFOX +/- cetux	2720	DFS	1.48	1.27–1.74	NCCTG N0147	Sinicrope et al. [59]
				<i>KRAS</i> mut	–	378		

CSM, cancer-specific mortality; DFS, disease-free survival; OS, overall survival.

In a recent post hoc analysis of the MOSAIC study, OS and recurrence-free survival (RFS) were assessed according to *BRAF* mutations, which were found in 94 (10.4%) of 902 stage II/III colon cancer patients. *BRAF* mutation did not confer a worse prognosis (HR 0.99, 95% CI 0.67–1.47, $P=0.966$) [41].

In contrast, two studies suggest that *BRAF* is a prognostic factor in mixed stage II and III colon cancer [7, 57] and three studies have linked *BRAF* mutation to poor prognosis in stage III colon cancer (Table 2) [58–60]: *BRAF*-mutated patients had shorter times to relapse, survival after relapse and OS than *BRAF* non-mutated patients. In a post hoc analysis of the PETACC-8 study, evaluating the prognostic value of *BRAF* and *KRAS* mutations, *BRAF* was prognostic only when combined with pMMR status (90% of the patients): *BRAF* mutated/pMMR tumours had worse outcomes than *BRAF* wild-type/pMMR tumours (HR for OS 1.84, 95% CI 1.01–3.36, $P=0.046$). The prognostic value of *BRAF* mutation was not found in the dMMR population [58]. In the other two studies, the prognostic value of *BRAF* mutation was not analysed with regard to MMR status [59, 60]. Finally, the interaction between *BRAF* mutation and MMR status was confirmed in a pooled analysis of two large adjuvant trials with more than 4000 patients (PETACC8 and N0147), in which *BRAF* mutation again seemed linked to a worse prognosis only in pMMR patients, being associated with time to recurrence, survival after relapse and OS [61].

Although trials in the metastatic setting are currently testing the efficacy of triple anti-MEK, anti-BRAF and anti-EGFR therapy, BRAF inhibition is not commonly used for *BRAF*-mutated colon cancer, owing to the modest efficacy of anti-BRAF therapies when given alone [62–64]. The efficacy of these combinations on metastatic disease will certainly lead to clinical trials dedicated to *BRAF*-mutated non-metastatic colon cancer.

KRAS mutation

KRAS is an intracellular effector located downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR). *KRAS* mutations represent 45% of metastatic colorectal tumours [65] and ~15%–37% of early-stage tumours [61, 66, 67]. *KRAS* mutation is more frequent in pMMR than in dMMR colorectal cancer [61]. In the metastatic setting, *KRAS* mutation confers resistance to anti-EGFR treatments [68, 69]. However, targeting the EGFR pathway with adjuvant treatment failed to improve DFS and OS in stage III colon cancer [10, 59].

Recently, in patients with *BRAF* wild-type tumours, the impact *KRAS* mutation on prognosis was suspected through epidemiological cohorts studies [70]. This detrimental role of *KRAS* mutation on stage III colon cancer outcome was confirmed by post hoc analysis of prospectively collected data from adjuvant studies such as PETACC-8 and N0147 (Table 2) [58, 59, 70, 71]. Though it has been suggested that codon 12 and 13 did not bear the same prognostic value [72] more recent data in larger cohorts with better clinical follow-up, showed that both exon 2 mutations are poor prognostic markers [71, 73, 74]. Contradictory results were obtained in a post hoc analysis of the PETACC-3 trial in 894 patients with stage III colon cancer, where *KRAS* mutations were associated with neither relapse nor survival [7]. Finally, a pooled analysis of the PETACC-8 and N0147 trials confirmed a 1.5 higher risk of relapse and death in *KRAS* mutant, than in the *KRAS* wild-type population, for TTR, DFS and OS [61]. In this cohort of 4411 stage III colon cancer patients, as with *BRAF*, this prognostic value was only found in pMMR patients [61].

Screening for *KRAS* and *NRAS* mutations (by expanded *RAS* analysis) is now mandatory in metastatic colon cancer before targeting the EGFR pathway [56]. Unfortunately, expanded *RAS* analysis was not used in the majority of the studies described

above. It could provide complementary information needed to understand the lack of efficacy of anti-EGFR therapies in early-stage colon cancer.

HER2 and other molecular factors

HER2 (*ErbB2*) is a transmembrane receptor of the EGFR family [75]. Its activation plays a role in cell proliferation and differentiation, and in apoptosis inhibition [75]. The reported prevalence of HER2 overexpression/amplification in colon cancer varies widely, from ~3%–47% in the different cohorts, but it is generally below 10% [76–78].

The prognostic value of HER2 overexpression in this setting is controversial [77, 79–81]. Most studies have shown that HER2 expression is not associated with outcome but rather with the presence of metastases [79–81]. However, Park et al. found that tumours with HER2 overexpression had a higher recurrence rate and were associated with poorer 3- and 5-year survival rates [77]. These results were confirmed by a retrospective analysis of stage III colon cancer samples from 2559 patients included in PETACC-8 randomized trial [78]. In this cohort, HER2 mutation was observed in 3.8% of cases and was associated with higher rate of recurrence (HR 1.55 [95% CI 1.02–2.36], $P=0.04$) and shorter OS (HR 1.57 [95% CI 0.99–2.5], $P=0.05$) in multivariate analysis [78]. Differences between studies could be explained by the different techniques used to assess HER2 expression. The PETACC8 study used the next-generation sequencing colon-lung cancer panel V2 (for mutations in exons 19–21, and for amplification) plus immunohistochemistry [78]. The results of the phase II trial of trastuzumab plus lapatinib in HER2-amplified metastatic colon cancer are encouraging for this kind of dual blockade in early-stage colon cancer [82]. However, the only evidence of HER-2 blockade efficacy we have in oncology concern breast cancer and, recently, gastric cancer [83–85]. In colon cancer, we will have to wait for further phase III studies results assessing the dual blockade of the HER-2 pathway by both trastuzumab and lapatinib to confirm HER-2 as a valuable target for metastatic and non-metastatic colon cancer.

Other molecular features have been described as prognostic factors. Caudal-type homeobox transcription factor 2 (*CDX2*) is an important regulator of intestinal development and is involved in colon oncogenesis [86, 87]. Colon cancers without *CDX2* overexpression are often associated with aggressive features such as advanced stage, poor differentiation, vascular invasion, *BRAF* mutation, and the CpG island methylator phenotype [88–91]. Recently, Dalerba et al. showed that a lack of *CDX2* expression was associated with worse outcome in stage II and III colon cancer (HR for disease recurrence 3.44, 95% CI 1.60–7.38, $P=0.002$). In stage III colon cancer, both *CDX2* positive and negative tumours benefit from adjuvant treatment [92, 93]. Moreover, though very promising these findings on *CDX2* prognostic and predictive value have now to be confirmed in external series based on patients enrolled in clinical trials in order to increase the quality of clinical data and the robustness of this marker before becoming a new daily practice usable tool.

Somatic mutations of *PIK3CA* are present in 10%–20% of colorectal cancer, basically confined to exon 9 and exon 20. Mutations of *PIK3CA* seem to predict the lack of response for

anti-EGFR therapy, especially mutations in exon 20, for patients with *RAS* wild-type tumours [94, 95]. In addition, there is moderate evidence of the predictive value of *PIK3CA* mutations for adjuvant aspirin, coming from two epidemiological cohorts from the US [96]. Ongoing randomized controlled trials will allow to definitively answer this question in the forthcoming years.

Preliminary data indicate ctDNA can be detected in a high proportion of patients with advanced CRC, suggesting promise as a prognostic and predictive test that should have broad community acceptance. Preliminary results showed that ctDNA is detectable at diagnosis in the majority of patients with non-metastatic CRC. In this 68 patients population ctDNA, based on 15 frequent mutations, was detected in 41 (60%) of patients before surgical removal of the primary. With a 15-month follow-up all 5 patients that recurred had positive ctDNA at diagnosis, whereas CEA was elevated in only 1 of these cases. [97]. The presence of ctDNA after surgery seems thus a major prognostic biomarker with an HR of 18 (95% CI: 7.9–40) for the risk of recurrence [98]. The potential for ctDNA as a prognostic or predictive marker for patients with early stage cancer, should be further explored.

Molecular classification

Improvements in DNA sequencing techniques have allowed researchers to explore more than one mutation at a time, providing insights into colon cancer biology. The Cancer Genome Atlas Network analysed 224 colorectal tumours by whole-exome sequencing and integrative analysis of genomic data [99]. This work showed that there are two types of colorectal cancer: hypermutated and non-hypermuted tumours. Similarly, Guinney et al. defined four consensus molecular subtypes (CMS) of colon cancer, based on transcriptomics, using surgical samples of all stages (I–IV; 41% stage III) [100]. Each CMS has genetic specificities (Table 3). CMS4 tumours were associated with worse OS and relapse-free survival after adjustment for clinicopathological features, dMMR status, and *BRAF* and *KRAS* mutations: the 5-year OS rates were 62% in the CMS4 group and 74%, 77% and 75% in the CMS1, 2 and 3 groups, respectively. Patients with CMS1 tumours had worse survival after relapse, with a median of 9 months, versus 35 months for CMS2 tumours, 20 months for CMS3 tumours and 24 months for CMS4 tumours (Table 3). Song et al. retrospectively analysed the NSABP-C07 data and found that only patients with stage III CMS2 tumours seemed to benefit from fluorouracile + oxaliplatin adjuvant chemotherapy as compared with fluorouracile alone [101]. However, this was not found in the validation cohort of this study and it needs to be confirmed in external series [101].

The differences in the prognosis of CMS groups confirm that the molecular mechanisms of each subtype are clinically relevant. It is conceivable that activation of genes involved in the metastatic process confers a worse prognosis.

This classification could help to select patients for adjuvant treatment by providing prognostic and predictive information, and could also help to tailor individual treatment. Yet, the only data available on the predictive value of the CMS signature on the benefit of adjuvant chemotherapy come from a retrospective study with chemotherapeutic regimens that are not standards anymore. The assessment of the predictive value of CMS has now

Table 3. CMS subgroups and their associated molecular characteristics, according to Guinney et al. [106]

Subtype %	CMS1 (MSI/immune) 14%	CMS2 (canonical) 37%	CMS3 (metabolic) 13%	CMS4 (mesenchymal) 23%
Clinical features	Female Right sided lesions Higher histopathological grade	Left sided		More advanced stage (III or IV)
Associated mutations	dMMR, CIMP high, hypermutation BRAF mutations Immune infiltration and activation	SCNA high WNT and MYC activation	Mixed MMR status, CIMP low, SCNA low KRAS mutations Metabolic deregulation	SCNA high Stromal infiltration TGFb activation Angiogenesis HER2 high level amplification
Outcomes	Worse survival after relapse	Superior survival after relapse		Worse relapse free and overall survival
5-year overall survival rate (95% CI)	74% (69–79)	77% (74–80)	75% (70–80)	62% (58–66)
5-year relapse-free survival rate (95% CI)	75% (70–80)	73% (70–77)	73% (68–80)	60% (55–65)
Median survival after relapse	9 months	35 months	20 months	24 months

CIMP, CpG island methylation phenotype; SCNA, somatic copy number alteration.

Table 4. Comparison of the existing molecular signatures for treatment decision in localized colon cancer

Signature	Disease setting	N	End point	Results for stage III	Dataset	Reference
Oncotype Dx colon cancer®	II–III treated	892	5-year recurrence rate	Recurrence rate: Low: 21% (95 CI 16–26), Intermediate: 29% (95 CI 24–34), High: 38% (95 CI 30–46)	Clinical trial (NSABP-C-07)	Yothers et al. [105]
Oncotype Dx colon cancer®	II–III treated	688	3-year RFS and OS	–	Clinical trial (PETACC-3)	Di Narzo et al, [108]
ColoPrint®	I–II–III treated and untreated	206	5-year RFS	5-year RFS: Low: 78.2% (95% CI 49.9–90.7) High: 47.2% (95% CI 25.8–68.6)	Prospective cohort	Salazar et al., <i>J Clin Oncol</i> (2013)
Veridex®	II	688	3-year RFS, SAR and OS	–	Clinical trial (PETACC-3)	Di Narzo et al, [108]

to be assessed on patients treated with a fluoropyrimidine- and oxaliplatin-based adjuvant regimen. Moreover, the feasibility of CMS in daily practice, even for prognostication, is currently difficult due to technical and cost constraints, but may be interesting to categorize patients as a stratification parameter in future adjuvant clinical trials.

Recently, interesting results have been reported on the epithelial to mesenchymal transition. Activation of genes involved in this transition seems to undermine the benefit of adjuvant chemotherapy and could also predict the efficacy of some targeted therapies [102–104].

Molecular signatures

Supervised prognostic genomic signatures have been developed to summarize the prognostic information provided by molecular factors. The main genomic signatures have been widely analyzed in both retrospective and prospective studies, including Oncotype Dx Colon Cancer®, ColoPrint®, Veridex® and GeneFx Colon® [105–107]. Most validation studies focused on stage II disease, but several included stage III disease, especially using the Oncotype Dx Colon Cancer® signature [105]. These genomic signatures can classify the risk of recurrence as low or high (Table 4).

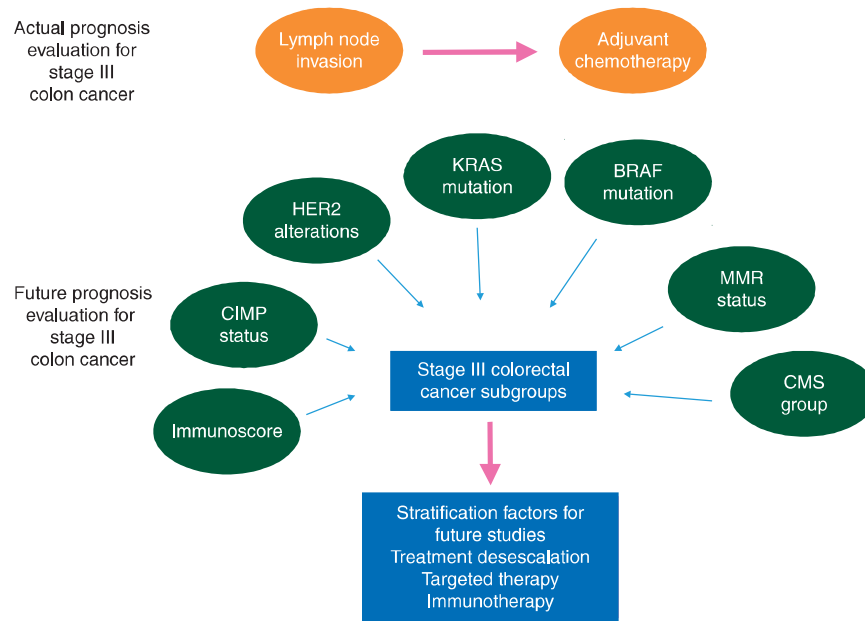


Figure 1. Past and current prognostic factors for stage III colon cancer.

In theory, the information provided by these signatures is very important. However, the accuracy of these scores is controversial, especially in stage III disease. Indeed, these signatures divide patients into three groups, but the benefit of adjuvant treatment of the large intermediate-risk group is unclear. Moreover, prediction of recurrence is not very good for stage III disease. For example, Oncotype Dx Colon Cancer[®] predicts 5-year recurrence rates for low, intermediate and high-risk stage IIIA/B colon cancer of, respectively, 21% (95% CI 16%–26%), 29% (95% CI 24%–34%), and 38% (95% CI 30%–46%) [105].

In the prospective validation of Oncotype Dx Colon Cancer[®], only high- and intermediate-risk patients seemed to benefit from the adjunction of oxaliplatin to 5FU [105], but there were few events in the different groups and these results thus need to be confirmed.

None of the current signatures has been evaluated in a real-life setting. This would need testing to be randomized after removal of the primary tumour, in order to determine the influence on treatment decisions and patients' outcome.

Recent prognostic signatures based on apoptotic genes have been tested in stage III colon cancer [109]. The APOPTO-CELL-PC3 is the more accurate of them, and divides the patients into three groups depending on their apoptosis competency and their Procaspase-3 level of expression. With this signature, high risk patients had increased risk of relapse (HR 3.90, 95% CI 1.59–9.37, $P=0.008$) and death (HR 9.40, 95% CI 2.06–41.98, $P=0.002$). Despite the fact that those signatures have been validated externally, they cannot be used in daily practise because of the too small number of patients included in the studies.

Immunologic features

In 1986, lymphocyte infiltration (LI) of rectal carcinoma was linked to a better prognosis [110]. More than 300 publications on

colorectal carcinoma treated with various therapies have confirmed this seminal publication [111–113]. In 2005, Pagès et al. showed that abundant CD3+CD8+ and CD3+CD4+T lymphocyte infiltration was associated with better survival. In addition, a high density of T cells was associated with less nodal invasion and metastatic recurrence [14]. A prognostic LI immunoscore has been developed [113, 114], based on numbers of lymphocyte populations (CD3/CD45RO, CD3/CD8 or CD8/CD45RO) in the tumour core and invasive margins. This score identifies three groups of clinical outcome. It was very recently shown to be reproducible and robust in a large multicentre assessment conducted in 17 countries and involving more than 3800 samples, including a subset of stage III disease [115].

Another immunoscore is based on automated LI evaluation (linear quantification of lymphoid infiltration, LQLI). This method divides tumours into 3 patterns of CD3+ lymphocyte distribution between the tumour front of invasion, the tumour core, and surrounding tissues. Low-level LI (LQLI pattern 3) was associated with worse DFS in this study [HR 6.02, (95% CI 2.74–13.18), $P<0.001$ in multivariate analysis] [116]. This score has been recently validated prospectively, using a predefined statistical hypothesis, in a large phase III trial population of stage III patients who received FOLFOX-based adjuvant treatment [117].

Though some of these immunoscores are now considered as robust and reproducible and others have been validated with predefined statistical hypotheses, none of them are currently usable in daily practice. To do so, we are still waiting for a score that is validated with multivariate analyses integrating all potentially confounding clinical and molecular prognostic factors such as a dMMR phenotype, *BRAF* and *RAS* mutational status, in prospectively randomized patients from clinical trials, using predefined statistical hypotheses and in an integrated approach to therapeutic decision-making.

In future, such scores will be implemented in clinical decision-making for post-surgical treatment of stage III colon cancer, both to refine prognostication and to predict the efficacy of immunotherapies.

Conclusion

Although the treatment of stage III colon cancer has barely changed since 2004, our knowledge of prognostic factors and carcinogenesis has advanced considerably in the last decade (Figure 1). However, the prediction of adjuvant chemotherapy and targeted therapies benefit in molecular subclasses are mainly based on in vitro and retrospective datasets, and need to be confirmed prospectively to allow personalized treatment in the future.

Alongside long-standing clinical and histological factors, new immunological and molecular factors are assisting with prognostication. For example, MMR, *BRAF*, *KRAS* and *HER2* alterations, and immune infiltration, should probably be taken into account in the near future.

Existing scores only use one set of prognostic tools: molecular, clinical or immunological. Now, large-scale analyses of pooled data from recent clinical trials will help to integrate these factors in a global approach needed to extend advances made in the metastatic setting to patients with localized disease.

Acknowledgement

We want to thank the French association of gastro-enterologists oncologists (AGEO) for supporting English language correction.

Funding

None declared.

Disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Stewart BW, Wild CP, World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2014.
- Twelves C, Wong A, Nowacki MP et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352(26): 2696–2704.
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23): 2343–2351.
- Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011; 29(28): 3768–3774.
- Lecomte T, André T, Panis Y et al. Cancer du Colon. *Thésaurus Natl Cancérologie Dig* 2016. <http://www.tncc.org> (6 February 2017, date last accessed).
- Ychou M, Raoul J-L, Douillard J-Y et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol* 2009; 20(4): 674–680.
- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M 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(3): 466–474.
- Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol* 2013; 31(3): 359–364.
- de Gramont A, Van Cutsem E, Scholl H-J et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(12): 1225–1233.
- Taieb J, Tabernero J, Mini E et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(8): 862–873.
- Alberts SR, Sargent DJ, Nair S et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 2012; 307(13): 1383–1393.
- Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol* 2010; 28(2): 264–271.
- Snaebjornsson P, Coupe VMH, Jonasson L et al. pT4 stage II and III colon cancers carry the worst prognosis in a nationwide survival analysis. Shepherd's local peritoneal involvement revisited. *Int J Cancer* 2014; 135(2): 467–478.
- Pagès F, Berger A, Camus M et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(25): 2654–2666.
- Liebig C, Ayala G, Wilks J et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5131–5137.
- Huh JW, Lee JH, Kim HR, Kim YJ. Prognostic significance of lymphovascular or perineural invasion in patients with locally advanced colorectal cancer. *Am J Surg* 2013; 206(5): 758–763.
- Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN. Lymph node ratio: role in the staging of node-positive colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(6): 1600–1608.
- Zare Mirzaei A, Abdorrazaghi F, Lotfi M et al. Prognostic value of lymph node ratio in comparison to lymph node metastases in stage III colon cancer. *Iran J Pathol* 2015; 10(2): 127–135.
- Sabbagh C, Mauvais F, Cosse C et al. A lymph node ratio of 10% is predictive of survival in stage III colon cancer: a French regional study. *Int Surg* 2014; 99(4): 344–353.
- Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T et al. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8706–8712.
- Renfro LA, Grothey A, Xue Y et al. ACCENT-based web calculators to predict recurrence and overall survival in stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; doi:10.1093/jnci/dju333.
- Colorectal Cancer Nomograms. <https://www.mskcc.org/nomograms/colorectal> (2 February 2017, date last accessed).
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22(10): 1797–1806.
- Weiser MR, Gönen M, Chou JF et al. Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J Clin Oncol* 2011; 29(36): 4796–4802.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712): 643–649.
- Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2059–2072.
- Gallois C, Laurent-Puig P, Taieb J. Methylator phenotype in colorectal cancer: a prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 99: 74–80.
- Kawakami H, Zaanen A, Sinicrope FA. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2015; 6(6): 676–684.

29. Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(12): 6870–6875.
30. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F et al. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001; 121(6): 1300–1309.
31. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN 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(11): 863–875.
32. Sargent DJ, Shi Q, Yothers G 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: 5(Suppl): abstr 3507.
33. Hutchins G, Southward K, Handley K 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(10): 1261–1270.
34. Zaanan A, Fléjou J-F, Emile J-F et al. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(23): 7470–7478.
35. Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(21): 1635–1646.
36. Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC 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(29): 3664–3672.
37. Zaanan A, Shi Q, Taieb J et al. Analysis of DNA mismatch repair (MMR) and clinical outcome in stage III colon cancers from patients (pts) treated with adjuvant FOLFOX +/- cetuximab in the PETACC8 and NCCTG N0147 adjuvant trials. *J Clin Oncol* 2015; (Suppl): abstr 3506.
38. 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.
39. Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in colon cancer with microsatellite instability: a large multicenter AGEO study. *J Natl Cancer Inst* 2016; doi:10.1093/jnci/djv438.
40. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D 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(23): 6531–6541.
41. André T, de Gramont A, Vernerey 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.
42. Ogino S, Nosho K, Irahara N et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20): 6412–6420.
43. 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.
44. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(12): 988–993.
45. Kondo Y, Issa J-PJ. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 29–39.
46. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 2005; 14(Spec No. 1): R65–R76.
47. Rashid A, Issa JPI. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* 2004; 127(5): 1578–1588.
48. Wong JLL, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 2007; 56(1): 140–148.
49. Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK. DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol* 2007; 20(7): 711–721.
50. Ahn JB, Chung WB, Maeda O et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer* 2011; 117(9): 1847–1854.
51. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D et al. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(8): 2898–2903.
52. Shiovitz S, Bertagnolli MM, Renfro LA et al. CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan-based therapy for stage III colon cancer. *Gastroenterology* 2014; 147(3): 637–645.
53. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116(6): 855–867.
54. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892): 949–954.
55. Tran B, Kopetz S, Tie J et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117(20): 4623–4632.
56. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(8): 1386–1422.
57. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(15): 1151–1156.
58. Taieb J, Zaanan A, Le Malicot K 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; 1–11.
59. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2015; 148(1): 88–99.
60. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA 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(3): 890–900.
61. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q et al. Prognostic value of BRAF and KRAS mutations in MSI and MSS stage III colon cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2016; 109(5). doi: 10.1093/jnci/djw272.
62. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2015; 21(6): 1313–1320.
63. Hong DS, Morris VK, El Osta B et al. Phase IB study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with BRAFV600E mutation. *Cancer Discov* 2016; 6(12): 1352–1365.
64. Kopetz S, Desai J, Chan E et al. Phase II Pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(34): 4032–4038.
65. Modest DP, Ricard I, Heinemann V et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants - pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol ESMO* 2016; doi:10.1093/annonc/mdw261.
66. Mireia GR, Gallach S, Jantus-Lewintre E et al. Molecular subtyping of colon cancer (CC) based on mutational status of RAS, BRAF, and DNA mismatch repair (MMR) proteins. Prognostic value. *J Clin Oncol* 2016; (Suppl): abstr e15094.
67. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res* 2014; 74(12): 3238–3247.
68. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007; 67(6): 2643–2648.
69. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66(8): 3992–3995.
70. Eklöf V, Wikberg ML, Edin S et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013; 108(10): 2153–2163.

71. Blons H, Emile JF, Le Malicot K et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol* 2014; 25(12): 2378–2385.
72. Imamura Y, Morikawa T, Liao X et al. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2012; 18(17): 4753–4763.
73. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D et al. Kirsten RAS mutations in patients with colorectal cancer: the “RASCAL II” study. *Br J Cancer* 2001; 85(5): 692–696.
74. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res* 2014; 20(11): 3033–3043.
75. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2): 127–137.
76. Sclafani F, Roy A, Cunningham D et al. HER2 in high-risk rectal cancer patients treated in EXPERT-C, a randomized phase II trial of neoadjuvant capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) and chemoradiotherapy (CRT) with or without cetuximab. *Ann Oncol* 2013; 24(12): 3123–3128.
77. Park DI, Kang MS, Oh SJ et al. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22(5): 491–497.
78. Laurent-Puig P, Balogoun R, Cayre A et al. ERBB2 alterations a new prognostic biomarker in stage III colon cancer from a FOLFOX based adjuvant trial (PETACC8). *Ann Oncol* 2016; 27(suppl 6): 4590.
79. Ochs A-M, Wong L, Kakani V et al. Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4(4): 262–267.
80. Li Q, Wang D, Li J, Chen P. Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas. *BMC Cancer* 2011; 11: 277.
81. Baiocchi G, Lopes A, Coudry RA et al. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(9): 1059–1068.
82. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(6): 738–746.
83. Slamon D, Eiermann W, Robert N et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 365(14): 1273–1283.
84. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1124–1130.
85. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2010; 376(9742): 687–697.
86. Beck F, Stringer EJ. The role of Cdx genes in the gut and in axial development. *Biochem Soc Trans* 2010; 38(2): 353–357.
87. Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE et al. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997; 386(6620): 84–87.
88. Hinoi T, Tani M, Lucas PC et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001; 159(6): 2239–2248.
89. Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, Terracciano LM. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol* 2008; 21(11): 1403–1412.
90. Baba Y, Noshio K, Shima K et al. Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(14): 4665–4673.
91. Bae JM, Lee TH, Cho N-Y et al. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2015; 21(5): 1457–1467.
92. Dalerba P, Sahoo D, Paik S et al. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2016; 374(3): 211–222.
93. Lee KS, Kwak Y, Nam KH et al. c-MYC copy-number gain is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015; 10(10): e0139727.
94. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009; 20(1): 84–90.
95. De Roock W, Claes B, Bernasconi D 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(8): 753–762.
96. Liao X, Lochhead P, Nishihara R et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012; 367(17): 1596–1606.
97. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. The potential of circulating tumor DNA (ctDNA) to reshape the design of clinical trials testing adjuvant therapy in patients with early stage cancers. *J Clin Oncol* 2016; (Suppl): abstr 3511.
98. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; 8(346): 346ra92.
99. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330–337.
100. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21(11): 1350–1356.
101. Song N, Pogue-Geile KL, Gavin PG et al. Clinical outcome from oxaliplatin treatment in stage II/III colon cancer according to intrinsic subtypes: secondary analysis of NSABP C-07/NRG oncology randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2016; doi:10.1001/jamaoncol.2016.2314.
102. Roepman P, Schlicker A, Taberero J et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *JAMA Oncol* 2014; 134(3): 552–562.
103. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *JAMA Oncol* 2013; 19(5): 619–625.
104. Schlicker A, Beran G, Chresta CM et al. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics* 2012; 5: 66.
105. Yothers G, O’Connell MJ, Lee M et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol* 2013; 31(36): 4512–4519.
106. Jiung Y, Casey G, Lavery IC et al. Development of a clinically feasible molecular assay to predict recurrence of stage II colon cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 346–354.
107. Salazar R, Roepman P, Capella G et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(1): 17–24.
108. Di Narzo AF, Tejpar S, Rossi S et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *J Natl Cancer Inst* 2014; doi:10.1093/jnci/dju247.
109. Salvucci M, Würstle ML, Morgan C et al. A stepwise integrated approach to personalized risk predictions in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016; doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1084.
110. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986; 39(6): 585–589.
111. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1(8545): 1303–1306.
112. Laghi L, Bianchi P, Miranda E et al. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol* 2009; 10(9): 877–884.

4.2 Développement d'un facteur pronostique : exemple de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)

4.2.1 Remise en question de la valeur seuil de l'ACE

4.2.1.1 *Référence bibliographique*

Low-level postoperative carcinoembryonic antigen improves survival outcomes stratification in patients with stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments.

Auclin E, André T, Taieb J, Benetkiewicz M, de Gramont A, Vernerey D. **Eur J Cancer.** 2018 Jul;97:55-56. doi:10.1016/j.ejca.2018.03.032. Epub 2018 May 3. PubMed PMID: 29731226.

4.2.1.2 *Rationnel*

Le point de départ du questionnement concernant la méthodologie pour l'évaluation d'un facteur pronostique est la publication par Margalit et al d'un article remettant en question le seuil usuellement accepté de 5 ng/mL pour la positivité du dosage de l'ACE. Dans cet article, les auteurs ont montré sur une base américaine de plus de quarante mille patients atteints d'un cancer du colon de stade I et II (non traités par chimiothérapie) que la valeur seuil de 2,35 ng/mL était plus pertinente pour la prédiction de la survie globale. En effet, la survie globale à 3 ans était de 79,7% contre 64,5% chez les patients ayant respectivement un dosage de l'ACE pré-opératoire inférieur ou supérieur à 2,35 ng/mL.

Ces résultats ont été montrés sur une cohorte de très grand effectif et ont été ajustés sur divers paramètres pronostiques. Ils sont donc robustes. Cependant on peut déplorer quelques limites à ce travail :

1. Le critère de jugement utilisé était la survie globale, nous ne disposons pas de la survie sans maladie.
2. Le temps de suivi était en médiane de 31,7 mois, ce qui est juste pour l'étude de cancers du colon localisés.
3. Les taux de survie à 3 ans paraissent faibles pour des cancers du colon de stades I et II (le taux de survie à 5 ans publié par l'Institut National du Cancer Américain est plutôt aux alentours de 91%).
4. Le dosage de l'ACE en post opératoire est plus pertinent qu'en pré-opératoire, comme réalisé dans cette étude.

Nous avons alors exploré ce seuil sur la population atteinte d'un cancer du colon de stade II incluse dans l'étude MOSAIC. Bien que cette population ait été traitée par une chimiothérapie adjuvante, nous avons validé les résultats de Margalit et al. En effet, les taux de survie globale à 3 ans étaient respectivement de 95% et 90% selon que l'ACE était inférieur ou supérieur à 2,35 ng/mL. Les taux de survie sans maladie à 3 ans étaient eux de 88% et 78% (chez les patients ayant l'ACE inférieur et supérieur à 2,35 ng/mL, respectivement).

La nécessité d'une considération plus fine du facteur pronostique qu'est l'ACE est partie de cette publication, dont le manuscrit est disponible ci-après. Par ailleurs, dans les modèles pronostiques construits par D. Vernerey lors de sa pratique au sein de l'Unité de Méthodologie et Qualité de Vie en Cancérologie l'ACE était toujours associé de façon importante au pronostic des patients.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejccancer.com

Letter to the Editor

Low-level postoperative carcinoembryonic antigen improves survival outcomes stratification in patients with stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments

E. Auclin ^{a,b,c,*}, T. André ^d, J. Taieb ^a, M. Benetkiewicz ^e, A. de Gramont ^f,
D. Vernerey ^{b,c,e,**}

^a Sorbonne Paris-Cité, Paris Descartes University, Hepatogastroenterology and Gastrointestinal Oncology Department, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

^b Methodology and Quality of Life Unit in Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France

^c Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

^d Sorbonne University and Medical Oncology Department, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

^e Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR), France

^f Department of Oncology, Hôpital Franco-Britannique, Levallois-Perret, France

Received 24 March 2018; accepted 30 March 2018

Available online ■ ■ ■

Dear Editor,

We read the article authored by Margalit *et al.* [1] and published recently in your journal with great interest.

The authors have analysed 45,449 patients with stage I or II colon cancer from the United States National Cancer Database who did not receive adjuvant chemotherapy and showed that preoperative carcinoembryonic

antigen (CEA) level was a highly independent prognostic factor for overall survival (OS) with a hazard ratio (HR) of 1.12 (95% confidence interval [CI]: 1.10–1.14, $p < 0.01$) for each 10 ng/mL CEA increase in the adjusted analysis. Interestingly, this study has challenged the standard cut-off value for CEA (considered as 5 ng/mL). Indeed, they showed that the optimal cut-off to predict accurately the 3-year OS status is 2.35 ng/mL with 3-year OS rates estimated to 79.7% and 64.5% in patients with preoperative CEA levels < 2.35 or > 2.35 , respectively. Given the considerable size of the cohort studied and the adjustments performed, these results should be considered as very robust and of interest. However, we would like to highlight that the disease-free survival (DFS) end-point is not available and that the median follow-up equal to 31.7 months may be too short to evaluate survival end-points in localised stage I and II colon cancer. Moreover, the 3-year OS rates displayed in their article (79.7% and 64.5%

DOI of original article: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.112>.

* Corresponding author: Department of Gastrointestinal oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

** Corresponding author: Methodological and Quality of Life in Oncology Unit, Besançon University Hospital, 3 Boulevard Alexandre Fleming, 25030 Besançon, France.

E-mail addresses: ed.auclin@gmail.com (E. Auclin), dvernerey@chu-besancon.fr (D. Vernerey).

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.03.032>

0959-8049/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Auclin E, et al., Low-level postoperative carcinoembryonic antigen improves survival outcomes stratification in patients with stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments, European Journal of Cancer (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.03.032>

in the CEA levels <2.35 and >2.35 groups, respectively) are low for stage I and II colon cancer population. Indeed, the 5-year OS rate was 91.1% in patients with localised colon cancer collected by the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results program and the Center of Disease Control and Prevention (CDC's) National Program of Cancer Registries [2]. It is also important to notice that the postoperative CEA dosage is probably more relevant than the preoperative one to stratify patients' risk of death and recurrence as recently reported [3,4].

In this context, we provide a confirmation of their findings in a fully external validation cohort of stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments and in the postoperative setting. We have analysed patients from the MOSAIC randomised prospective phase III trial [5] that compared adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin (5FU/LV) to oxaliplatin+ 5FU/LV (FOLFOX4) and enrolled 899 patients with stage II colon cancer (448 (49.8%) treated with 5FU/LV and 451 (50.2%) with FOLFOX4). CEA level was measured after surgery. Postoperative CEA level was an inclusion criterion (CEA < 10 ng/mL) in the MOSAIC trial. CEA serum sample assessment was not centralised. The prognostic value of CEA for OS and DFS in this population (both arms) of patients with stage II colon cancer was validated using a cut-off of 2.35 ng/mL. The 3-year OS was 95% (CEA ≤2.35 ng/mL) and 90% (CEA >2.35 ng/mL) and the 3-year DFS was 88% (CEA ≤2.35 ng/mL) and 78% (CEA >2.35 ng/mL). The log-rank test p-value was 0.02 for OS and 0.006 for DFS. In the Cox regression univariate analysis, HR for OS and DFS in patients with a CEA level >2.35 ng/mL were 1.46 (95% CI: 1.05–2.05, p = 0.03) and 1.51 (95% CI: 1.12–2.03, p = 0.006), respectively. Our results confirmed of the optimal cut-off for CEA level identified by Margalit *et al.* in the postoperative setting and for patients with stage II colon cancer treated by adjuvant treatments. In addition, we modelled the relation between CEA in its continuous form and outcomes with the restricting cubic splines approach and we confirmed that patients with higher CEA level (superior to 2.35 ng/

mL) were at the highest risk for recurrence or death. We also searched in our cohort the optimal cut point to maximise log-rank statistics with the Hothorn and Lausen method [6], and we found 2.77 ng/mL for both DFS (HR for CEA > 2.77 ng/mL: 1.83, 95% CI: 1.33–2.51, p < 0.0001) and OS (HR for CEA > 2.77 ng/mL: 1.84, 95% CI: 1.26–2.62, p = 0.001). This cut-off value is very close to the 2.35 cut-off identified in Margalit *et al.* study.

Overall, in addition to the data brought by Margalit *et al.*, we validate the interest of postoperative CEA levels found below the upper limit of normal to stratify patients' survival in stage II colon cancer treated with standard adjuvant treatments.

Conflict of interest statement

None declared.

References

- [1] Margalit O, Mamtani R, Yang Y-X, Reiss KA, Golan T, Halpern N, et al. Assessing the prognostic value of carcinoembryonic antigen levels in stage I and II colon cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990;2018(94):1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.112>.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2017; 2017(67):177–93. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>.
- [3] Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of preoperative and postoperative serum carcinoembryonic antigen and colon cancer outcome. *JAMA Oncol* 2018;4:309–15. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4420>.
- [4] Lu C-Y, Uen Y-H, Tsai H-L, Chuang S-C, Hou M-F, Wu D-C, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer* 2011;104:1178–84. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.40>.
- [5] 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>.
- [6] Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal* 2003;43(2): 121–37.

4.2.2 Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade II

4.2.2.1 *Référence bibliographique*

Association of post-operative CEA with survival and oxaliplatin benefit in patients with stage II colon cancer : a post hoc analysis of the MOSAIC trial.

Auclin E, André T, Taieb J, Banzi M, Van Laethem JL, Taberero J, Hickish T, de Gramont A, Vernerey D. **Br J Cancer.** 2019 Jul 12. doi: 10.1038/s41416-019-0521-7.

4.2.2.2 *Introduction*

Comme discuté dans l'introduction de cette thèse, le traitement adjuvant des patients atteints de cancer du colon de stade II pose certaines questions. En effet, après la chirurgie réalisée à but curatif, une chimiothérapie peut être proposée à certains patients pour une durée de 6 mois. Cette chimiothérapie est généralement proposée aux patients de mauvais pronostic avec un statut microsatellitaire stable (MSS ou pMMR), c'est-à-dire ayant au moins un des facteurs suivant : statut pT4, ou occlusion intestinale tumorale, ou perforation tumorale, ou présence d'embolies veineux/lymphatiques/péri nerveux, ou tumeur peu différenciée, ou analyse de moins de 12 ganglions. Dans l'étude MOSAIC cette définition a été simplifiée pour la suivante : pT4, perforation digestive tumorale, moins de 10 ganglions analysés. Chez ces patients de mauvais pronostic, une chimiothérapie à base de fluoropyrimidine est proposée. L'étude MOSAIC a montré que l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2 chez les patients ayant un cancer colique de stade II à haut risque de rechute n'augmentait pas la survie globale à 10 ans (71,7% pour le groupe LV5FU2 contre 75,4% pour le groupe FOLFOX, p=0.58).

L'antigène carcinoembryonnaire (ACE) est un marqueur tumoral sanguin peu onéreux connu pour être associé au pronostic des patients atteints de cancer du colon, quel que soit le stade. Il est sécrété dans 90% des cas. Les sociétés savantes telles que l'*European Society of Medical Oncology* (ESMO) recommande son dosage pour le suivi des patients opérés. De larges études ont montré que la valeur de 5 ng/mL, communément acceptée en tant que limite supérieure de la normale, n'est pas optimale et qu'un seuil à 2,35 ng/mL serait préférable.

Les objectifs de cette étude post-hoc étaient : i) évaluer et valider de façon précise la valeur pronostique de l'ACE sur la SSM et la SG des patients atteints d'un cancer du colon de stade II, ii) de déterminer la valeur prédictive de l'ACE pour le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2.

4.2.2.3 Population de l'étude

Dans cette étude nous avons inclus tous les patients de l'étude MOSAIC (NCT00275210) ayant un cancer du colon de stade II. L'autre critère d'inclusion était la disponibilité du dosage de l'ACE en post opératoire.

A noter que l'ACE était en soi un critère d'inclusion dans l'essai puisque seuls les patients avec une valeur de l'ACE inférieure à 10 ng/mL étaient incluables. Ce dosage n'était pas centralisé dans un seul laboratoire.

La définition des groupes de risque de récurrence utilisée dans cette étude était double :

- Définition montrée dans la population de l'étude (définition MOSAIC) : statut pT4, ou perforation digestive tumorale, ou moins de 10 ganglions analysés.
- Définition MOSAIC modifiée pour coller aux recommandations européennes : statut pT4, ou perforation digestive tumorale, ou moins de 12 ganglions analysés.

4.2.2.4 Méthodologie

Le critère de jugement principal était la SSM, définie comme le temps entre la randomisation et la rechute (locale ou à distance) ou l'occurrence d'un deuxième cancer colique ou le décès. En critère de jugement secondaire nous avons choisi la SG, définie comme le temps entre la randomisation et le décès du patient. Les patients n'ayant pas fait l'événement étaient censurés à la date de leur dernier suivi. La SSM et la SG ont été estimées avec la méthode Kaplan Meier et des taux de survie à des temps définis ont été donnés avec leur intervalle de confiance à 95%. La durée médiane de suivi a été calculée avec la méthode du *reverse* Kaplan Meier.

Lorsqu'il a été considéré comme variable continue, la relation entre l'ACE et les critères de jugement a été modélisée par la méthode des splines cubiques restreints et vérifiée par les polynômes fractionnaires multiples. Lorsque l'ACE a été étudié en tant que

variable catégorielle, la valeur seuil utilisée était celle montrée par Margalit et al dans une cohorte de 45449 patients avec un cancer du colon de stades I et II (2,35 ng/mL). De plus, nous avons réalisé une analyse de sensibilité en cherchant la valeur seuil optimale dans notre cohorte.

La valeur pronostique de l'ACE sur la survie (SSM et SG) a d'abord été testée par un modèle de Cox univarié, ainsi que les autres variables disponibles. Les variables atteignant la significativité en univarié ou connues pour avoir un impact pronostique majeur ont été réunies dans un modèle de Cox multivarié.

La recherche de la valeur prédictive de l'ACE sur le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2 a été faite par l'étude du terme d'interaction dans un modèle de Cox et illustrée par des courbes de Kaplan Meier.

4.2.2.5 Résultats

4.2.2.5.1 Caractéristiques de la population

Parmi les 2246 patients de l'étude MOSAIC, 899 avaient un cancer du colon de stade II. Le dosage de l'ACE post opératoire était disponible chez 867 patients (96,4%) dont 834 (96,2%) avaient un ACE inférieur à 5 ng/mL et 664 (76,6%) inférieur à 2,35 ng/mL.

Concernant les groupes de risque, 434 (48,65%) et 520 (58,3%) patients avaient un haut risque de rechute selon la définition de MOSAIC et la définition de MOSAIC modifiée. Le statut MSI était réparti de façon équitable entre les patients ayant l'ACE < ou \geq 2,35 ng/mL (12,4% versus 16,3% p=0,36).

Les caractéristiques des patients de l'étude sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: caractéristiques de la population de l'étude MOSAIC atteinte d'un cancer du colon de stade II.

		Patients stade II Etude MOSAIC (N=899)
Age, années*	≤ 70	798 (88.77%)
	> 70	101 (11.23%)
Sexe*	Female	407 (45.27%)
	Male	492 (54.73%)
Indice de masse corporelle*	Maigre	27 (3%)
	Normal	438 (48.72%)
	Surpoids	324 (36.04%)
	Obèse	110 (12.24%)
Bras de traitement*	FOLFOX4	451 (50.17%)
	LV5FU2	448 (49.83%)
Localisation tumorale*	Gauche	580 (64.52%)
	Droite	319 (35.48%)
Grade histologique	G1/2	763 (89.55%)
	G3/4	89 (10.45%)
	Manquant	47
Groupe de risque, stade II (définition MOSAIC)	Elevé [§]	434 (48.65%)
	Faible ^{§§}	458 (51.35%)
	Manquant	7
Groupe de risque, stade II (définition MOSAIC modifiée)	Elevé	520 (58.3%)
	Faible	372 (41.7%)
	Manquant	7
Stade T*	T3	728 (81%)
	T4	171 (19%)

Nombre de ganglions analysés*	Médiane (IQR)	12 (8-19)
Performance status*	0-1	799 (88.9%)
	≥ 2	100 (11.1%)
Perforation intestinale*		81 (9.01%)
Occlusion intestinale*		158 (17.58%)
Emboles vasculaires	Présents	80 (16.29%)
	Manquant	408
Statut MMR	dMMR	48 (13.15%)
	pMMR	317 (86.85%)
	Manquant	534
ACE, ng/mL	Médiane (IQR)	1.4 (0.9-2.2)
Seuil standard, ng/mL)	≤ 5	834 (96.19%)
	> 5	33 (3.81%)
Seuil rapporté par Margalit et al., ng/mL	≤ 2.35	664 (76.6%)
	> 2.35	203 (23.4%)
Seuil défini par la méthode de Hothorn, ng/mL	≤ 2.77	724 (83.51%)
	> 2.77	143 (16.49%)
	Manquant	32
Temps entre la chirurgie et le dosage de l'ACE, semaines	Médiane (IQR)	4.4 (3.3-5.4)
Temps de suivi, années	Médiane	8.8 (7.9-9.5)

*: pas de données manquantes

§ T4, perforation digestive, ou moins de 10 ganglions analysés

§§ T1-3 et absence de perforation digestive et 10 ou plus ganglions analysés

4.2.2.5.2 ACE post opératoire et survie

Lorsqu'il était étudié sous forme de variable continue, une relation linéaire a été mise en évidence entre l'ACE et les critères de survie (Figure 1). Plusieurs populations de risque différent ont été mises en évidence dans la population ayant un ACE inférieur à 5 ng/mL. Ce constat nous a permis de pouvoir considérer l'ACE sous forme catégorielle en prenant une valeur seuil inférieure à la valeur seuil classique de 5 ng/mL.

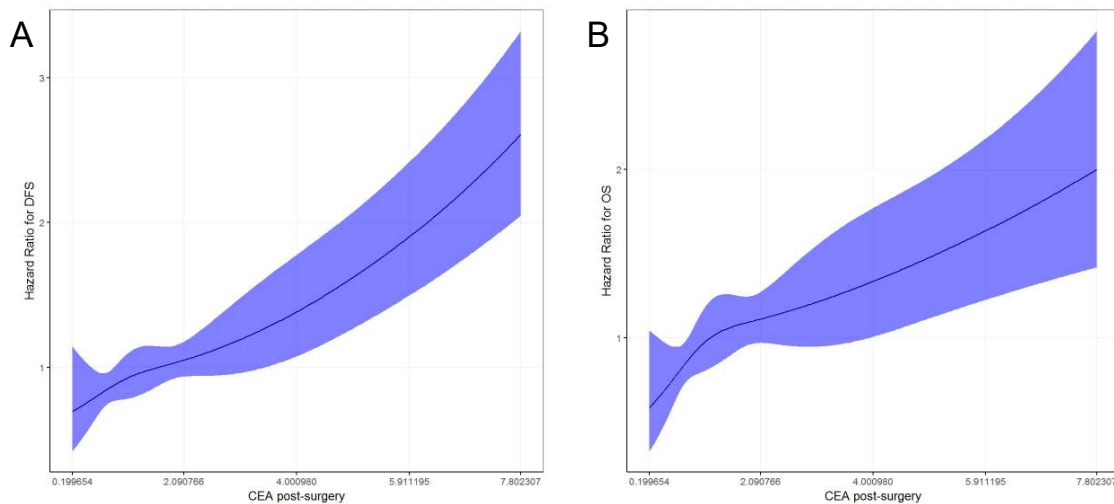


Figure 1 : relation entre la valeur post opératoire de l'ACE en tant que variable continue et la SSM (A) ou la SG (B). Cette relation a été obtenue par la méthode des splines cubiques restreints.

Quand nous l'avons considéré comme une variable catégorielle, les taux de SSM à 3 ans étaient :

- 86,6% contre 75,5% chez les patients ayant un ACE \leq 5 ng/mL et $>$ 5 ng/mL respectivement (p=0,53).
- 88,5% contre 78,7% chez les patients ayant un ACE \leq 2,35 ng/mL et $>$ 2,35 ng/mL respectivement (p=0,006).

Ces résultats sont illustrés dans la figure 2.

Par ailleurs, les analyses de sensibilité à la recherche de la meilleure valeur seuil pour l'ACE dans notre cohorte ont retrouvé une valeur de 2,77 ng/mL, ce qui est très proche de la valeur publiée par Margalit et al.

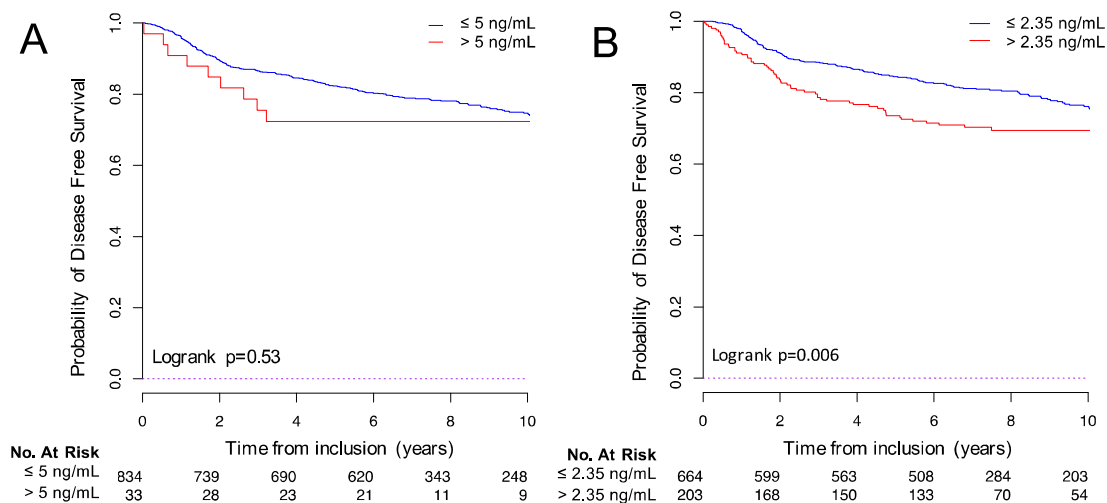


Figure 2 : courbes de Kaplan Meier pour la DFS selon la valeur seuil classique de l'ACE (A) et la valeur publiée par Margalit et al (B).

4.2.2.5.3 ACE comme facteur pronostique indépendant

En analyse univariée, un dosage post opératoire de l'ACE > 2,35 ng/mL était associé de façon péjorative avec la SSM et la SG :

- HR pour la SSM : 1,51 ; IC95% : 1,12-2,03 ; p<0,0001
- HR pour la SG : 1,46 ; IC95% : 1,05-2,05 ; p=0,03.

Après ajustement sur l'âge, le sexe, la localisation tumorale, l'occlusion digestive tumorale et le groupe de risque de récurrence (définition MOSAIC), l'élévation de l'ACE supérieure à 2,35 ng/mL restait un facteur de risque indépendant en terme de SSM et de SG :

- HR pour la SSM : 1,49 ; IC95% : 1,10-2,00 ; p=0,009
- HR pour la SG : 1,90 ; IC95% : 1,33-2,72 ; p<0,0001.

Ces résultats sont résumés dans les tableaux 2 et 3.

		HR	95% CI	P
Age, années	> 70	1.94	1.37-2.76	<0.0001
Sexe	Homme	1.35	1.02-1.79	0.035
Localisation tumorale	Droit	0.78	0.58-1.06	0.111
Groupe de risque (MOSAIC)	Faible	0.74	0.56-0.98	0.035
Occlusion intestinale	Oui	1.48	1.07-2.03	0.016
ACE, mg/mL	> 2.35	1.49	1.10-2.00	0.009

Tableau 2 : modèle de Cox multivarié pour la SSM

		HR	95% CI	P
Age, années	> 70	2.06	1.40-3.04	<0.0001
Sexe	Homme	1.50	1.09-2.07	0.013
Localisation tumorale	Droit	0.76	0.54-1.07	0.117
Groupe de risque (MOSAIC)	Faible	0.66	0.48-0.91	0.011
Occlusion intestinale	Oui	1.64	1.16-2.33	0.005
ACE, ng/mL	> 2.35	1.45	1.04-2.04	0.029

Tableau 3 : modèle de Cox multivarié pour la SG

4.2.2.5.4 Valeur prédictive du dosage post opératoire de l'ACE

Le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2 en terme de SSM et de SG était différent selon les groupes d'ACE. Seuls les patients ayant un haut risque de rechute selon la définition de MOSAIC avec un ACE élevé (> 2,35 ng/mL) en post opératoire avaient un bénéfice de l'adjonction de l'oxaliplatine à leur chimiothérapie adjuvante (p-valeur pour l'interaction : 0,09 pour la SSM et 0,03 pour la SG).

Ces résultats sont montrés dans les tableaux 4 et 5, et illustrés par les figures 3 et 4.

Tableau 4 : Taux de SSM à 3 ans selon le bras de traitement et le dosage de l'ACE

	Tous les patients N	LV5FU2 N	FOLFOX N	LV5FU2 % (IC95%)	FOLFOX % (IC95%)	Différence absolue	Différence relative	HR pour l'effet du traitement (IC95%)	P valeur de l'interaction entre ACE (≤ 2.35 , >2.35) et traitement (LV5FU2, FOLFOX)
Population globale	899	448	451	84.7 (81.4-88.1)	87.1 (84-90)	+2.4	+2.8		0.11
- ACE ≤ 2.35	664	333	331	88.2 (84.8-91.7)	88.7 (85.4-92.2)	+0.5	+0.6	1.07 (0.77-1.47)	
- ACE > 2.35	203	97	106	76 (67.9-85.1)	81.1 (74-88.9)	+5.1	+6.7	0.67 (0.41-1.11)	
Population à risque élevé[§]	434	222	212	81.3 (76.2-86.6)	86.3 (81.7-91)	+5	+6.1		0.09
- ACE ≤ 2.35	320	158	162	84 (78.4-89.9)	86.3 (81.2-91.8)	+2.3	+2.7	0.95 (0.62-1.45)	
- ACE > 2.35	102	55	47	74 (63.2--86.7)	87.2 (78.2-97.3)	+13.2	+17.8	0.47 (0.23-0.97)	
Population à risque faible^{§§}	458	223	235	87.9 (83.7-92.3)	88 (83.9-92.3)	+0.1	+0.1		0.78
- ACE ≤ 2.35	338	172	166	91.8 (87.8-96)	91.5 (87.3-95.8)	-0.3	-0.3	1.18 (0.71-1.95)	
- ACE > 2.35	100	42	58	78.6 (67.1-92)	75.8 (65.6-87.7)	-2.8	-3.6	0.99 (0.47-2.10)	

[§] T4, perforation tumorale ou moins de 10 ganglions analysés

^{§§} T1-3 et absence de perforation tumorale et 10 ou plus ganglions analysés

NOTE. La différence absolue à un temps T est la différence entre les pourcentages de survie observés entre les 2 bras de traitement au temps T. La différence relative donne la proportion d'augmentation ou diminution du taux de survie entre les bras de traitement.

Tableau 5 : Taux de SG à 3 ans selon le bras de traitement et le dosage de l'ACE

	LV5FU2 % (IC95%)	FOLFOX % (IC95%)	Différence absolue	Différence relative	HR pour l'effet du traitement (IC95%)	P valeur de l'interaction entre ACE (≤ 2.35, >2.35) et traitement (LV5FU2, FOLFOX)
Population globale	94.6 (92.5-96.7)	93.7 (91.5-96)	-0.9	-0.9		0.03
- ACE ≤ 2.35	97.3 (95.5-99)	93.9 (91.3-96.5)	-3.4	-3.5	1.28 (0.89-1.85)	
- ACE > 2.35	88.4 (82.2-95.1)	92.5 (87.6-97.6)	+4.1	+4.6	0.63 (0.36-1.12)	
Population à risque élevé[§]	93.1 (89.9-96.6)	92.9 (89.5-96.4)	-0.2	-0.2		0.03
- ACE ≤ 2.35	95.5 (92.3-98.8)	92.5 (88.6-96.7)	-3	-3.1	1.18 (0.73-1.92)	
- ACE > 2.35	87 (78.4-96.5 [°])	93.6 (86.9-100)	+6.6	+7.6	0.44 (0.21-0.95)	
Population à faible risque^{§§}	95.9 (93.4-98.6)	94.8 (92-97.7)	-1.1	-1.1		1
- ACE ≤ 2.35	98.8 (97.2-100)	95.7 (92.7-98.9)	-3.1	-3.1	1.34 (0.77-2.36)	
- ACE > 2.35	90.3 (81.8-99.8)	91.4 (84.4-98.9)	+1.1	+1.2	1.28 (0.47-3.45)	

[§] T4, perforation tumorale ou moins de 10 ganglions analysés

^{§§} T1-3 et absence de perforation tumorale et 10 ou plus ganglions analysés

NOTE. La différence absolue à un temps T est la différence entre les pourcentages de survie observés entre les 2 bras de traitement au temps T. La différence relative donne la proportion d'augmentation ou diminution du taux de survie entre les bras de traitement.

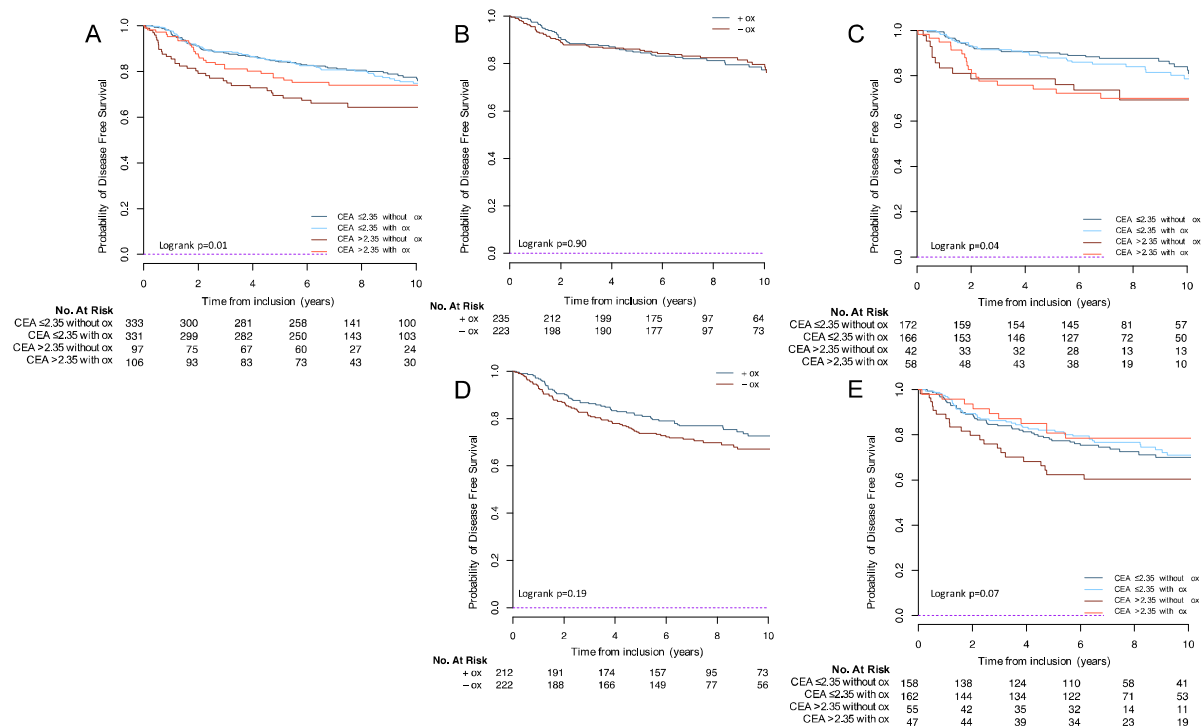


Figure 3 : Courbes de Kaplan Meier montrant le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine pour la SSM chez tous les patients (A), les patients à bas risque de récurrence selon la définition de MOSAIC sans et avec stratification selon le dosage de l'ACE post opératoire (B et C), les patients à haut risque de récurrence selon la définition de MOSAIC sans et avec stratification selon le dosage de l'ACE post opératoire (D et E)

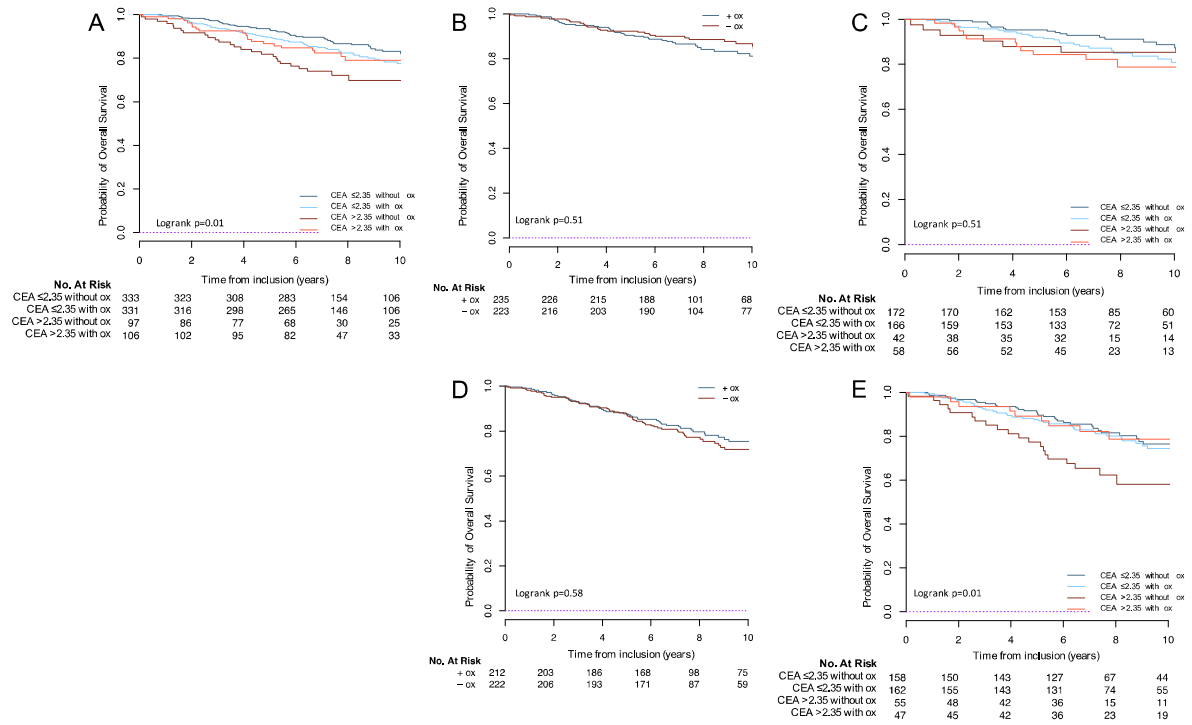


Figure 4 : Courbes de Kaplan Meier montrant le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine pour la SG chez tous les patients (A), les patients à bas risque de récurrence selon la définition de MOSAIC sans et avec stratification selon le dosage de l'ACE post opératoire (B et C), les patients à haut risque de récurrence selon la définition de MOSAIC sans et avec stratification selon le dosage de l'ACE post opératoire (D et E)

Les analyses de sensibilité réalisées en utilisant la définition des risques de rechute de MOSAIC modifiée ainsi que la valeur seuil optimale dans notre cohorte (2,77 ng/mL) concordaient avec les résultats principaux de cette étude.

4.2.2.6 Conclusions de l'étude

Nos résultats montrent que le dosage post opératoire de l'ACE est un facteur pronostique indépendant et fort de la SSM et de la SG chez les patients traités pour un cancer du colon de stade II.

Dans la population de l'étude MOSAIC, seuls les patients ayant un cancer du colon de stade II à haut risque de rechute avec un ACE post opératoire élevé (> 2,35 ng/mL) semblent bénéficier de l'ajout de l'oxaliplatine à une chimiothérapie adjuvante par LV5FU2. Le dosage de l'ACE devrait être inclus dans les facteurs de stratification des futurs essais évaluant la stratégie thérapeutique des cancers du colon de stade II.

4.2.2.7 Manuscrit scientifique



ARTICLE

Clinical Study

Association of post-operative CEA with survival and oxaliplatin benefit in patients with stage II colon cancer: a post hoc analysis of the MOSAIC trial

Edouard Auclin^{1,2,3}, Thierry André^{4,5}, Julien Taieb^{1,6}, Maria Banzi⁷, Jean-Luc Van Laethem⁸, Josep Tabernero⁹, Tamas Hickish¹⁰, Aimery de Gramont^{5,11} and Dewi Vernerey^{2,3,5}

BACKGROUND: Adjuvant treatment for stage II colon cancer (CC) can be proposed to patients with high-risk disease. Recently, 2.35 ng/mL carcinoembryonic antigen (CEA) was identified as the best cut-off value. This post hoc analysis of the MOSAIC trial assessed post-operative CEA prognostic value for survival outcomes and predictive value for the addition of oxaliplatin to adjuvant treatment.

METHODS: Prognostic and predictive values of post-operative CEA in patients with stage II CC were evaluated with Kaplan–Meier survival curves and Cox model with interaction terms. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were estimated.

RESULTS: Among 899 stage II CC patients, post-operative CEA was available in 867 (96.4%); and 434 (48.65%) had a high-risk stage II disease. The 3-year DFS rate was 88.5% and 78.7% in the ≤ 2.35 ng/mL and > 2.35 ng/mL group, respectively ($P = 0.006$). Use of oxaliplatin showed survival benefit only in patients with high-risk stage II CC and post-operative CEA > 2.35 ng/ml (interaction term $P = 0.09$ and 0.03 for DFS and OS).

CONCLUSION: CEA is a strong prognostic factor for DFS and OS in stage II CC. In the MOSAIC trial, only high-risk stage II CC patients with post-operative CEA > 2.35 ng/mL benefited from the addition of oxaliplatin to LV5FU2.

TRIAL REGISTRATION: NCT00275210 (January 11, 2006).

British Journal of Cancer (2019) 121:312–317; <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0521-7>

BACKGROUND

Colon cancer (CC) is the third most common cancer in men and women.^{1,2} Seventy-five percent of the patients are diagnosed at a localised stage; where a curative treatment can be proposed. Although adjuvant chemotherapy after curative surgery is recommended for stage III CC patients,³ its survival benefit for stage II CC is still debated. In this latter group of patients, adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy with or without oxaliplatin is used. The results of subgroups analyses of large adjuvant trials and meta-analysis have demonstrated several risk factors for recurrence or death in stage II CC that guide adjuvant treatment decisions.³ In the MOSAIC trial, the estimated 10-year probability of overall survival (OS) was 75.4% for FOLFOX4 (5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin) and 71.7% for LV5FU2 (fluorouracil and leucovorin)^{4,5} in high-risk CC patients with a simplified definition of high-risk stage II disease (T4, tumour perforation, or <10 examined lymph nodes). In this study, the addition of oxaliplatin to LV5FU2 did not

provide any survival benefit for low-risk stage II CC patients. Nowadays, there is a need to better identify patients for whom the addition of oxaliplatin to LV5FU2 can reduce disease relapse or death, but also to limit useless long-lasting toxicities induced by oxaliplatin.

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a well-known low cost biological tumour marker used in CC since 1965.⁶ Previous large studies have shown that elevated pre-operative CEA levels are associated with worse prognosis in patients with stage I and II disease, who did not receive adjuvant chemotherapy, and for whom pre-operative CEA value of 2.35 ng/mL was defined as an optimal cut-off point for survival stratification.⁷

The aims of this post hoc study were (i) to assess and validate precisely the prognostic value of post-operative CEA for disease-free survival (DFS) and OS in patients with stage II CC treated by adjuvant chemotherapy and (ii) to determine the additional predictive value of post-operative CEA for the benefit of the addition of oxaliplatin to LV5FU2.

¹Department of Hepato-Gastroenterology and Gastrointestinal Oncology, Sorbonne Paris-Cité, Paris Descartes University, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; ²Methodology and Quality of Life Unit in Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France; ³Bourgogne Franche-Comté University, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, France; ⁴Department of Medical Oncology, Sorbonne University, Hôpital Saint Antoine, Paris, France; ⁵Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR), Paris, France; ⁶UMR-S 1147, INSERM, Paris, France; ⁷Unit of Medical Oncology, Clinical Cancer Center, AUSL-IRCCS Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy; ⁸Department of Gastroenterology and Digestive diseases, Hopital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium; ⁹Vall d'Hebron University Hospital and Institute of Oncology (VHIO), CIBERONC, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹⁰Department of Oncology, Royal Bournemouth Hospital and Bournemouth University, Bournemouth, UK and ¹¹Department of Oncology, Institut Hospitalier Franco-Britannique, Levallois-Perret, France
Correspondence: Dewi Vernerey (dvernerey@chu-besancon.fr)

Received: 5 March 2019 Revised: 12 June 2019 Accepted: 18 June 2019
Published online: 12 July 2019

METHODS

Population

All stage II CC patients from the MOSAIC phase III trial (NCT00275210) were included in this post hoc analysis.⁴ Post-operative CEA <10 ng/mL was an inclusion criterion in the MOSAIC trial. The CEA measurement was not centralised.

Definition of high-risk stage II CC

High-risk stage II CC was defined as being characterised by one of the following factors: T4, tumour perforation, and <10 or <12 examined lymph nodes (the MOSAIC definition and the modified MOSAIC definition, respectively).

Statistical analysis

Median values (interquartile range) and frequencies (percentage) were provided for the description of continuous and categorical variables, respectively. Medians and proportions were compared using Student's *t*-test and chi-square test (or Fisher's exact test, if appropriate), respectively.

DFS was defined as the time between randomisation and local/distant relapse, second colorectal/rectal occurrence, or death, whichever occurred first. Alive patients without relapse and second colorectal/rectal cancer were censored at the date of their last follow-up.

OS was defined as the time between randomisation and death from any cause. Patients known to be alive were censored at the date of their last follow-up.

DFS and OS were estimated using the Kaplan–Meier method and described using median or rate at specific time points with their 95% confidence intervals (95% CIs). Follow-up was calculated using the reverse Kaplan–Meier method.

When used continuously, the association between CEA and survival was investigated with the restricted cubic splines method with graphical evaluation. When used as a categorical variable, the CEA cut-point defined by Margalit et al. in a cohort of 45 449 stage II CC patients was applied. A sensitivity analysis was performed with the Horton and Lausen method to find the best CEA cut-off for risk stratification in our cohort.⁸

The association of demographic, clinical, biological and molecular factors with survival was first assessed by the univariate Cox-proportional-hazard model, providing hazard ratios (HRs) and 95% CIs. Parameters with *P*-values of <0.10 in univariate analysis and/or clinically relevant variables were entered into the multi-variable Cox-regression model.

A differential DFS and OS treatment effect among the identified CEA risk groups but also when considering the CEA risk groups identified as an additional parameter to include in classical well-established risk group definitions was evaluated with an interaction term in the Cox-regression model and illustrated with Kaplan–Meier curves.

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 <0.05 were considered statistically significant and a threshold of 0.1 was used for interaction terms. All tests were two-sided.

RESULTS

Characteristics of patients

Among the 2246 patients included in the MOSAIC trial, 899 had stage II CC. Post-operative CEA was available in 867 (96.4%) patients; 834 (96.2%) had CEA <5 ng/mL and 664 (76.6%) <2.35 ng/mL.

Overall, 434 (48.65%) and 520 (58.3%) patients had high-risk stage II CC according to the MOSAIC and the modified MOSAIC definition, respectively (Table 1). The MSI status was well balanced between patients with CEA <2.35 and >2.35 ng/mL (12.4% vs 16.3%, *P* = 0.36).

Table 1. Patient characteristics

	MOSAIC Trial Stage II CC patients (N = 899)
Age at inclusion, years	≤ 70 798 (88.77%) > 70 101 (11.23%)
Gender ^a	Female 407 (45.27%) Male 492 (54.73%)
Body mass index ^a	Underweight 27 (3%) Normal 438 (48.72%) Overweight 324 (36.04%) Obese 110 (12.24%)
Type of adjuvant chemotherapy ^a	FOLFOX4 451 (50.17%) LV5FU2 448 (49.83%)
Tumour location ^a	Left 580 (64.52%) Right 319 (35.48%)
Histoprognostic grade	G1/2 763 (89.55%) G3/4 89 (10.45%) Missing 47
Stage II risk group (MOSAIC definition)	High ^b 434 (48.65%) Low ^c 458 (51.35%) Missing 7
Stage II risk group (modified MOSAIC definition)	High 520 (58.3%) Low 372 (41.7%) Missing 7
T-stage ^a	T3 728 (80.98%) T4 171 (19.02%)
Number of nodes examined ^a	Median (IQR) 12 (8–19)
Performance status*	0–1 799 (88.9%) ≥ 2 100 (11.1%)
Bowel perforation ^a	81 (9.01%)
Bowel obstruction ^a	158 (17.58%)
Vascular invasion	Yes 80 (16.29%) Missing 408
MMR status	dMMR 48 (13.15%) pMMR 317 (86.85%) Missing 534
CEA level, ng/mL	Median (IQR) 1.4 (0.9–2.2)
standard CEA cut-off level, ng/mL	≤ 5 834 (96.19%) > 5 33 (3.81%)
CEA cut-off level reported by Margalit et al., ng/mL	≤ 2.35 664 (76.6%) > 2.35 203 (23.4%)
CEA cut-off level according to Hothorn method, ng/mL	≤ 2.77 724 (83.51%) > 2.77 143 (16.49%) Missing 32
Time between surgery and CEA measurement, weeks	Median (IQR) 4.4 (3.3–5.4)
Follow-up, years Median	Median 8.8 (7.9–9.5)

CC colon cancer, MMR mismatch repair, CEA carcinoembryonic antigen, CI confidence interval, IQR interquartile range
^ano missing data
^bT4, tumour perforation, or fewer than 10 lymph nodes examined
^cT1–3 and no tumour perforation and 10 or more lymph nodes examined

Post-operative CEA and survival

When post-operative CEA was used as continuous variable, a gradual risk suggesting a linear relation between post-operative CEA and DFS and OS was identified (Fig. 1). Different risk populations among patients with a post-operative CEA level of <5 ng/mL were determined. This result validates in our cohort the lower cut-off of 2.35 ng/mL found by Margalit et al.

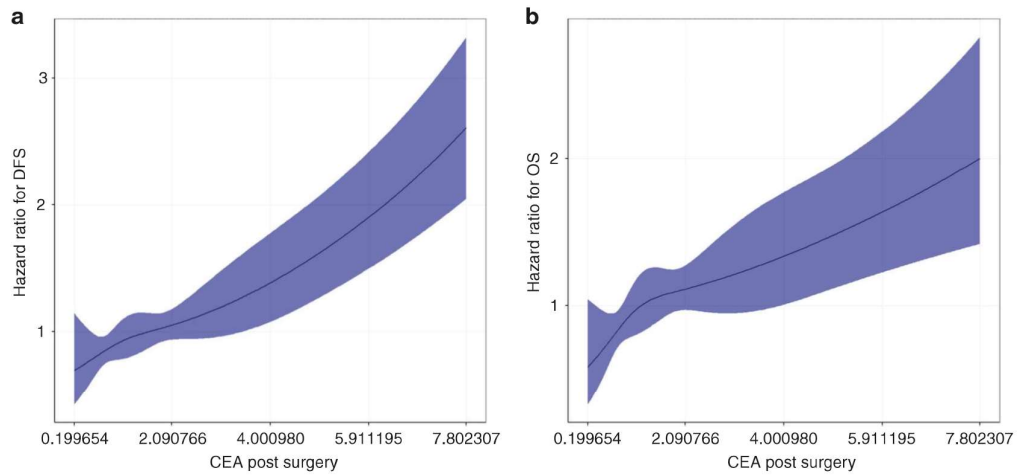


Fig. 1 Association between CEA and DFS (a) or OS (b) by the restricted cubic splines method

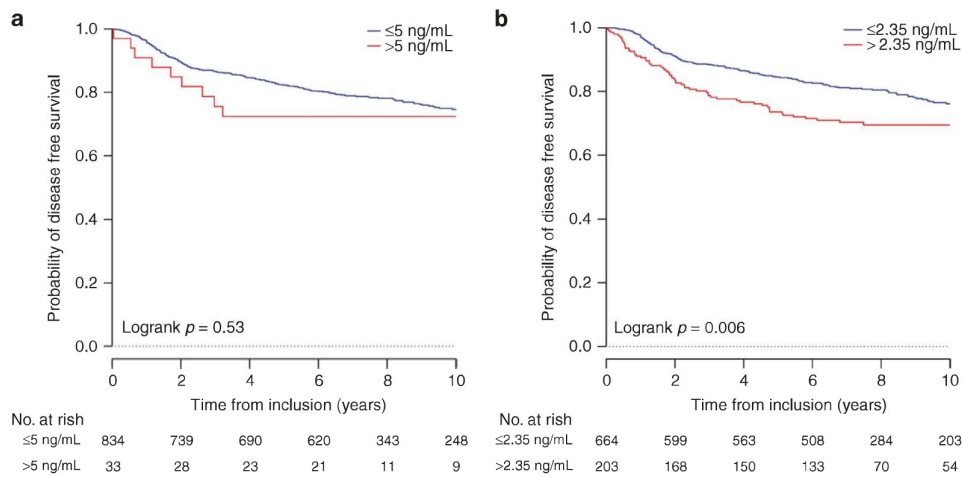


Fig. 2 DFS according to (a) CEA 5 ng/mL and CEA 2.35 ng/mL (b)

When post-operative CEA was used as a categorical variable, a strong trend was observed between ≤ 5 and > 5 ng/mL values and DFS, with the 3-year DFS rate of 86.6% and 75.5% in the ≤ 5 and > 5 ng/mL groups, respectively; $P = 0.53$. However, the difference was not significant (Fig. 2a).

When using the 2.35 ng/mL cut-off identified by Margalit et al, patients with a post-operative CEA level ≤ 2.35 ng/mL were at lower risk of recurrence or death. The 3-year DFS rate was 88.5 and 78.7% for patients with CEA ≤ 2.35 ng/mL and > 2.35 ng/mL, respectively ($P = 0.006$; Fig. 2b).

Similar results were observed with OS (Supplementary Fig. S1). In the sensitivity analysis, a threshold value of 2.77 ng/mL was identified as the optimal CEA cut-off (Supplementary Figs. S2 and S3).

Independent prognostic value of post-operative CEA
In univariate analysis, a post-operative CEA level of > 2.35 ng/mL was associated with DFS and OS (DFS: HR 1.51, 95% CI 1.12–2.03; $P = 0.006$ and OS: HR 1.46, 95% CI 1.05–2.05; $P = 0.03$).

After adjustment for age, gender, tumour location, bowel obstruction, and MOSAIC risk group, CEA > 2.35 ng/mL was still significantly associated with DFS (HR 1.49, 95% CI 1.10–2.00;

		HR	95% CI	P
Age, years	> 70	1.94	1.37–2.76	< 0.0001
Gender	Male	1.35	1.02–1.79	0.035
Tumour location	Right	0.78	0.58–1.06	0.111
MOSAIC risk group	Low	0.74	0.56–0.98	0.035
Bowel obstruction	Yes	1.48	1.07–2.03	0.016
CEA level, ng/mL	> 2.35	1.49	1.10–2.00	0.009

HR hazard ratio, CI confidence interval, CEA carcinoembryonic antigen

$P = 0.009$) and OS (HR 1.90, 95% CI 1.33–2.72; $P < 0.0001$; Table 2 and Supplementary Table S1).

Predictive value of post-operative CEA
The benefit of the addition of oxaliplatin to LV5FU2 in term of DFS and OS was different between the two CEA groups

Table 3. Disease-free survival according to treatment arm and CEA level

DFS	All N	LV5FU2 arm N	FOLFOX arm N	3 y % (95% CI)		Absolute change ^d	Relative change ^e	HR for treatment effect ^c (95% CI)	P-value for the interaction term between CEA (≤ 2.35 , > 2.35) and Treatment Arm (LV5FU2, FOLFOX)
				LV5FU2 arm	FOLFOX arm				
Whole population	899	448	451	84.7 (81.4–88.1)	87.1 (84–90)	+2.4	+2.8		0.11
CEA ≤ 2.35	664	333	331	88.2 (84.8–91.7)	88.7 (85.4–92.2)	+0.5	+0.6	1.07 (0.77–1.47)	
CEA > 2.35	203	97	106	76 (67.9–85.1)	81.1 (74–88.9)	+5.1	+6.7	0.67 (0.41–1.11)	
High-risk ^a population	434	222	212	81.3 (76.2–86.6)	86.3 (81.7–91)	+5	+6.1		0.09
High-risk - CEA ≤ 2.35	320	158	162	84 (78.4–89.9)	86.3 (81.2–91.8)	+2.3	+2.7	0.95 (0.62–1.45)	
High-risk - CEA > 2.35	102	55	47	74 (63.2–86.7)	87.2 (78.2–97.3)	+13.2	+17.8	0.47 (0.23–0.97)	
Low-risk ^b population	458	223	235	87.9 (83.7–92.3)	88 (83.9–92.3)	+0.1	+0.1		0.78
Low-risk - CEA ≤ 2.35	338	172	166	91.8 (87.8–96)	91.5 (87.3–95.8)	-0.3	-0.3	1.18 (0.71–1.95)	
Low-risk - CEA > 2.35	100	42	58	78.6 (67.1–92)	75.8 (65.6–87.7)	-2.8	-3.6	0.99 (0.47–2.10)	

Absolute difference at time X gives the difference between percentages observed in the two treatment arms at time X; the relative difference at time X gives the proportion of increase or decrease in survival rate of one arm relative to the other arm at time X

^aT4, tumour perforation, or fewer than 10 lymph nodes examined

^bT1–3 and no tumour perforation and 10 or more lymph nodes examined

^cHR for treatment effect (the addition of oxalipatin to the LV5FU2 regimen)

^dAbsolute difference reflects a comparison of survival between the FOLFOX and LV5FU2 arms

^eRelative difference reflects a ratio of the observed survival in the FOLFOX arm and the LV5FU2 arm [(X year OS rate in the FOLFOX group - X year OS rate in the LV5FU2 group)/(X year OS rate in the LV5FU2 group) *100]

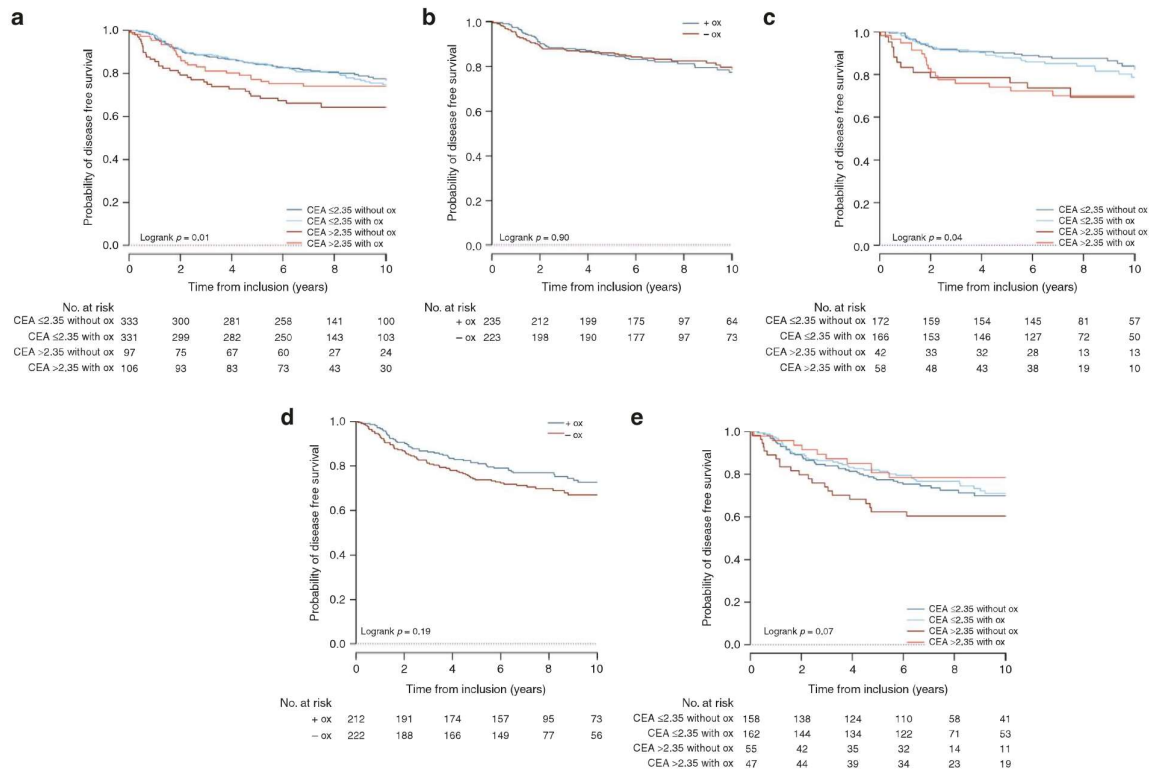


Fig. 3 Benefit for DFS with the addition of oxalipatin to LV5FU2 in **a** all patients, **b** the MOSAIC low-risk patients, **c** the MOSAIC low-risk patients after CEA stratification, **d** the MOSAIC high-risk patients, and **e** the MOSAIC high-risk patients after CEA stratification. Figure 3 abbreviations: Ox oxalipatin; +ox with oxalipatin; Ox without oxalipatin

(Table 3 and Supplementary Table S2). Only patients with high post-operative CEA levels seemed to have survival benefit from oxalipatin addition to LV5FU2 (interaction terms $P=0.09$; Fig. 3a).

Among patients with high post-operative CEA levels, the benefit from oxalipatin addition was observed in the high-risk stage II CC patients (DFS interaction term $P=0.09$ and OS interaction term $P=0.03$), but not with low-risk stage tumours (DFS

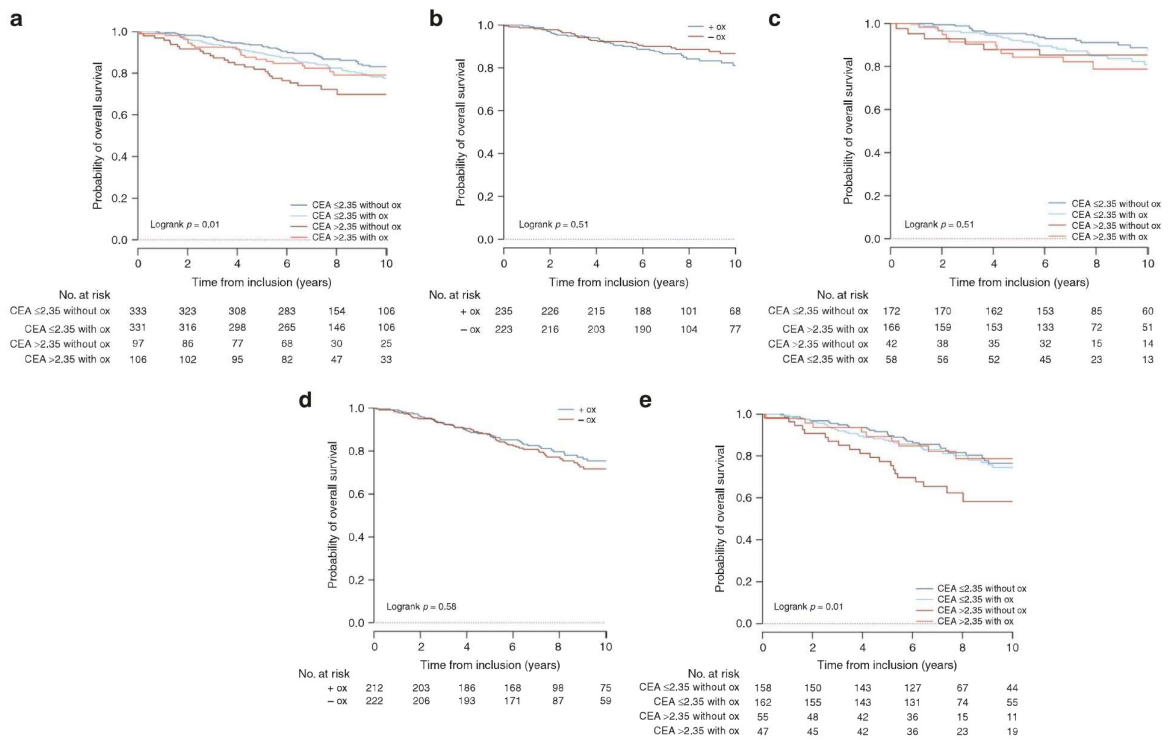


Fig. 4 Benefit for OS with the addition of oxalipatin to LV5FU2 in (a) all patients, (b) the MOSAIC low-risk patients, (c) the MOSAIC low-risk patients after CEA stratification, (d) the MOSAIC high-risk patients, and (e) the MOSAIC high-risk patients after CEA stratification. Figure 4 abbreviations: Ox: oxalipatin; + ox: with oxalipatin; - ox: without oxalipatin

interaction term $P = 0.78$ and OS interaction term $P = 1$). Patients with high-risk stage II tumours and CEA >2.35 ng/mL represent 25% of all stage II patients included in this post hoc analysis. The addition of oxalipatin had no survival advantage in patients with low-risk stage II disease and CEA <2.35 ng/mL (75% of the study population; Fig. 3c-e; Table 3 and Supplementary Table S2).

These results were replicated for the OS endpoint (Fig. 4) and using the modified MOSAIC definition for risk groups (Supplementary Figs. S4 and S5). When assessed in the population aged ≤ 70 years, the predictive value of CEA level was also observed in the high-risk group (Supplementary Figs. S6 and S7).

Similar results were observed with the optimal CEA cut-off value of 2.77 ng/mL (Supplementary Table S3).

DISCUSSION

In this post hoc analysis of the MOSAIC study, post-operative serum CEA level, with the cut-off of 2.35 ng/mL, was an independent prognostic factor in CC patients with stage II disease. Moreover, CEA appeared to be a predictive factor of the benefit from the addition of oxalipatin to LV5FU2 in adjuvant therapy for high-risk stage II CC.

The prognostic value of post-operative CEA has been demonstrated for stage I to IV CC.⁹ Our results are in line with the literature, as we also showed that a lower cut-off of CEA is more suitable level for death or recurrence risk stratification. The cut-off values of 2.35 ng/mL (Margalit et al. study)⁷ and 2.77 ng/mL (defined in our cohort study) suggest that the common 5 ng/mL cut-off is clearly not optimal for risk stratification of patients with CC. The magnitude of the prognostic value of the CEA level was important in our study. Indeed, patients with high level of CEA had a 50% increased risk of death or recurrence compared to

those who had CEA <2.35 ng/mL in multivariate analysis. We analysed the post-operative CEA level given the results by Konishi et al. who showed that the pre-operative CEA level is not a relevant marker of recurrence in localised CC if CEA is normalised after surgery.¹⁰

We showed in our study that only patients with high-risk stage II CC and high post-operative CEA level benefited from the addition of oxalipatin in terms of DFS, with a 13% absolute increase in 3-year DFS rate. Another predictive factor of oxalipatin benefit that has been published, is a high-risk score with the Oncotype Dx genomic signature.¹¹ In fact, Yothers et al. showed, in a limited cohort of patients, that only stage II CC with high risk Oncotype Dx genomic signature seemed to benefit from the addition of oxalipatin to adjuvant therapy.

Circulating tumour DNA (ctDNA) has shown remarkable prognostic value for OS and RFS in very small cohorts of patients with early-stage CC.¹²⁻¹⁴ Lu et al. suggested that the combination of post-operative serum CEA levels assessment and persistent post-operative circulating tumour cells detection is prognostic predictor of early relapse in stage II-III CC patients.¹⁵

All the above results suggest that a minimal residual disease may be associated with ctDNA, circulating tumour cells, CEA, or prognostic genomic signatures and that patients harbouring these factors are those who can benefit most from treatment intensification.

In our study, we used the risk groups definition published by André et al in 2015 (T4, tumour perforation, or less than 10 examined lymph nodes). This definition was published in the MOSAIC population, in order to lose as less information as possible. As it is slightly different from the ESMO consensus definition (12 lymph nodes examined instead of 10), we also validated our results with the latter definition (modified MOSAIC

definition). Moreover, in order to deal with potential confounding factors related to comorbidities, we performed sensitivity analysis in the ≤ 70 years' population. Again, similar results were observed, adding to their reliability.

In addition, in patients with high-risk stage II CC and post-operative CEA >2.35 ng/mL most deaths occurred within 2 years after surgery. This strongly suggest that post-operative imaging including PET-scan should be performed in those patients in order to further look at metastases before engaging adjuvant therapy, especially in randomised clinical trials.

Our results are robust and obtained with the best material available to study the interest to consider post-operative CEA information among classical high and low-risk classification in order to better identify patients who can benefit most from the addition of oxaliplatin to LV5FU2. Ideally, our findings should be validated in an external cohort data. Unfortunately, such data do not exist. Indeed, no randomised trial that have studied the addition of oxaliplatin to LV5FU2 in stage II CC patients provide precise post-operative CEA data. Another limit of this study is the lack of smoking habit data, a possible confusion factor. Therefore, clinician should interpret these results with caution in smoking patients.

CONCLUSION

Our results show that post-operative CEA is a strong prognostic factor for DFS and OS in stage II CC. In the MOSAIC trial, only high-risk stage II CC with post-operative CEA >2.35 ng/mL (~25% of our stage II population) were identified to benefit from the addition of oxaliplatin to LV5FU2. CEA >2.35 ng/mL should be included in the definition of high-risk stage II CC and should lead to post-operative check-up before adjuvant therapy. Moreover, it should be included in the future trials assessing adjuvant strategies in stage II CC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The editorial assistance with preparation of the manuscript was provided by Magdalena Benetkiewicz (PhD, GERCOR).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.A.: data analysis, manuscript writing. T.A.: data collection, manuscript writing and reviewing. J.T.: manuscript writing and reviewing. M.B., J.L.V.L., J.T., T.H. and A.G.: data collection, manuscript reviewing. D.V.: data analysis, manuscript writing and reviewing.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0521-7>.

Competing interests: Thierry André: Honoraria—AMGEN; Bayer; Bristol-Myers Squibb; PRMA Consulting; Roche/Genentech; Sanofi; SERVIER; Xbiotech. Consulting or Advisory Role—Amgen; Bayer; Bristol-Myers Squibb; Guardant Health; HalioDX; MSD Oncology; Mundipharma; Roche/Genentech; SERVIER. Travel, Accommodations, Expenses—Amgen; Bristol-Myers Squibb; MSD Oncology; Roche/Genentech. Julien Taieb: Consulting or Advisory Role—Amgen; Baxalta; Celgene; Lilly; Merck KGaA; Roche; SERVIER; Sirtex Medical. Speakers' Bureau—Amgen; Baxalta; Lilly; Merck; Roche/Genentech; Sanofi; SERVIER. Maria Banzi: Honoraria—Merck; Roche (I). Travel, Accommodations, Expenses—Merck; Pfizer; Roche. Josep Tabernero: Consulting or Advisory Role—Amgen; Boehringer Ingelheim; Celgene; Chugai Pharma; ImClone Systems; Lilly; Merck; Merck Serono; Millennium; Novartis; Roche/Genentech; Sanofi; Taiho Pharmaceutical. Tamas Hickish: Stock and Other Ownership Interests—Knowledge To Practice. Patents, Royalties, Other Intellectual Property—Bournemouth University (Inst). Travel, Accommodations, Expenses—Philips Healthcare; XBiotech. Aimery De Gramont: Honoraria—Chugai Pharma; Yakult. Dewi Vernerey: Consulting or Advisory Role—HalioDX; Janssen-Cilag; OSE Immunotherapeutics; Prestizia. The remaining authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate: The MOSAIC trial was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients have given their written consent to be enrolled in the MOSAIC trial. Written informed consent was required from all patients and the study was approved by the ethics committees of the participating centres. The use of the data for translational research was approved by the ethic committee of Ile De France (April 29, 2009).

Funding: None.

Consent to publish: Not applicable.

Data availability: Dataset of the study can be found with the corresponding author.

Note: This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
2. Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C. & Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann. Oncol.* **25**, 1650–1656 (2014).
3. Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A. et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **24**(Suppl 6), vi64–72 (2013).
4. 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.* **350**, 2343–2351 (2004).
5. André, T., de Gramont, 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.* **33**, 4176–4187 (2015).
6. Gold, P. & Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **122**, 467–481 (1965).
7. Margalit, O., Mamtani, R., Yang, Y.-X., Reiss, K. A., Golan, T., Halpern, N. et al. Assessing the prognostic value of carcinoembryonic antigen levels in stage I and II colon cancer. *Eur. J. Cancer.* **94**, 1–5 (2018).
8. Hothorn, T. & Lausen, B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput. Stat. Data Anal.* **43**, 121–137 (2003).
9. Thirunavukarasu, P., Sukumar, S., Sathaiyah, M., Mahan, M., Pragaatheeswarar, K. D., Pingpank, J. F. et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J. Natl. Cancer. Inst.* **103**, 689–697 (2011).
10. Konishi, T., Shimada, Y., Hsu, M., Tufts, L., Jimenez-Rodriguez, R., Cercek, A. et al. Association of preoperative and postoperative serum carcinoembryonic antigen and colon cancer outcome. *JAMA Oncol.* **4**, 309–315 (2018).
11. Yothers, G., O'Connell, M. J., Lee, M., Lopatin, M., Clark-Langone, K. M., Millward, C. et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J. Clin. Oncol.* **31**, 4512–4519 (2013).
12. Fan, G., Zhang, K., Yang, X., Ding, J., Wang, Z. & Li, J. Prognostic value of circulating tumor DNA in patients with colon cancer: systematic review. *PLoS ONE*. **12**, e0171991 (2017).
13. Lecomte, T., Berger, A., Zinzindohoué, F., Micard, S., Landi, B., Blons, H. et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int. J. Cancer* **100**, 542–548 (2002).
14. Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* **8**, 346ra92 (2016).
15. Lu, C.-Y., Uen, Y.-H., Tsai, H.-L., Chuang, S.-C., Hou, M.-F., Wu, D.-C. et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br. J. Cancer* **104**, 1178–1184 (2011).

4.2.3 Exemple de l'ACE dans les cancers du colon de stade III

4.2.3.1 *Référence bibliographique*

Carcinoembryonic Antigen Levels and Survival in Stage III Colon Cancer : Post hoc Analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials.

Auclin E, Taieb J, Lepage C, Aparicio T, Faroux R, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Benetkiewicz M, Banzi M, Louvet C, Van Laethem JL, Tabernero J, Hickish T, de Gramont A, André T, Vernerey D. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2019 Jul;**28**(7):1153-1161. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0867.

4.2.3.2 *Introduction*

Lorsqu'il existe un envahissement ganglionnaire à l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire d'une tumeur colique, on parle de cancer du colon de stade III. Dans cette situation, il est recommandé par les sociétés savantes d'effectuer une chimiothérapie adjuvante par FOLFOX 6 mois ou XELOX 3 mois selon l'envahissement ganglionnaire et le stade pT de la tumeur. Au total, 100% des patients sont traités par chimiothérapie dont 50% sont déjà guéri par la chirurgie et 30% rechuteront (pas de bénéfice d'un traitement adjuvant) au prix de neuropathies séquellaires chez ces patients qui auraient pu ne pas être traités. Nous avons donc besoin de marqueurs pronostiques afin d'adapter au mieux le traitement des patients atteints d'un cancer du colon de stade III.

L'ACE est un marqueur tumoral sanguin peu onéreux connu pour être associé au pronostic des patients atteints de cancer du colon, quel que soit le stade. Il est sécrété dans 90% des cas. Les sociétés savantes telles que l'ESMO recommande son dosage pour le suivi des patients opérés. Récemment, Konishi et al ont montré que le dosage de l'ACE en post opératoire avait un intérêt par rapport au dosage pré opératoire. En effet, les patients ayant un ACE élevé en pré opératoire ont le même pronostic que les patients avec un ACE normal en pré opératoire, si celui-ci est normalisé après la chirurgie. D'où l'intérêt d'évaluer le dosage post opératoire de l'ACE. Par ailleurs, la valeur seuil pour la normalité du dosage est débattue, et récemment une valeur à 2,35 ng/mL a été validée par Margalit et al sur une population importante de patients atteints de cancer du colon de stades I et II. D'autres auteurs ont montré qu'une valeur de 3 ng/mL permettait de mieux sélectionner les patients à bas/haut risque de rechute ou décès.

Les objectifs de cette étude étaient : i) évaluer et valider de façon précise la valeur pronostique pour la SSM et la SG du dosage de l'ACE en post opératoire d'un cancer du colon de stade III, ii) de remettre en question la valeur supérieure de la normale de 5 ng/mL usuellement utilisée, et iii) d'évaluer la valeur additionnelle de l'ACE par rapport à la classification TNM pour stratifier de façon optimale le risque de décès ou de rechute chez ces patients.

4.2.3.3 Population de l'étude

Dans cette étude nous avons inclus tous les patients de l'étude MOSAIC (NCT00275210) ayant un cancer du colon de stade III. Cette cohorte a servi de cohorte de découverte. Les patients traités dans l'essai PETACC-8 (NCT00265811) ont servi de cohorte de validation externe. Tous ces patients étaient atteints d'un cancer du colon de stade III.

A noter que l'ACE était en soi un critère d'inclusion dans les essais puisque seuls les patients avec une valeur de l'ACE inférieure à 10 ng/mL dans MOSAIC et <1,5 fois la limite supérieure de la normale dans PETACC-8 étaient incluables. Ce dosage n'était pas centralisé dans un seul laboratoire.

4.2.3.4 Méthodologie

Le critère de jugement principal était la SSM, définie comme le temps entre la randomisation et la rechute (locale ou à distance) ou l'occurrence d'un deuxième cancer colique ou le décès. En critère de jugement secondaire nous avons choisi la SG, définie comme le temps entre la randomisation et le décès du patient. Les patients n'ayant pas fait l'événement étaient censurés à la date de leur dernier suivi. La SSM et la SG ont été estimées avec la méthode Kaplan Meier et des taux de survie à des temps définis ont été donnés avec leur intervalle de confiance à 95%. La durée médiane de suivi a été calculée avec la méthode du *reverse* Kaplan Meier.

Lorsqu'il a été considéré comme variable continue, la relation entre l'ACE et les critères de jugement a été modélisée par la méthode des splines cubiques restreints et vérifiée par les polynômes fractionnaires multiples. Lorsque l'ACE a été étudié en tant que variable catégorielle, nous avons recherché différentes valeurs seuils au sein de la population ayant un dosage inférieur à 5 ng/mL :

- Par la méthode « arbitraire » des percentiles : utilisation de la valeur médiane et des terciles au sein de la population ayant un dosage inférieur à 5 ng/mL
- Par la méthode de maximisation du log-rank, permettant de rechercher le meilleur seuil au sein d'une population donnée.

La valeur pronostique de l'ACE sur la survie a d'abord été testée par un modèle de Cox univarié, ainsi que les autres variables disponibles. Les variables atteignant la significativité en univarié ou connues pour avoir un impact pronostique majeur ont été réunies dans un modèle de Cox multivarié. La discrimination du modèle de Cox a été évaluée grâce au c-index.

La recherche de la valeur prédictive de l'ACE sur le bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2 ou du cetuximab au FOLFOX a été faite par l'étude du terme d'interaction dans un modèle de Cox et illustrée par des courbes de Kaplan Meier.

4.2.3.5 Résultats

4.2.3.5.1 Caractéristiques des patients

Dans la cohorte de découverte, 1347 patients ayant un cancer du colon de stade III provenant de l'étude MOSAIC ont été inclus. La valeur du dosage post opératoire de l'ACE était disponible chez 1292 patients (95,5%).

Dans la cohorte de validation externe, 2552 patients atteints d'un cancer du colon de stade III ont été inclus, dont 2480 (97,2%) avaient le dosage d'ACE disponible.

Les caractéristiques des deux cohortes sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1: caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires des patients de la cohorte de découverte et de la cohorte de validation externe.

		Cohorte de découverte N=1347	Cohorte de validation externe N=2552	p
Age (années)*	< 70	1157 (85.9%)	2283 (89.4%)	0.001
	≥ 70	190 (14.1%)	269 (10.5%)	
Sexe*	Femme	621 (46.1%)	1091 (42.7%)	0.04
	Homme	726 (53.9%)	1461 (57.2%)	
Indice de masse corporelle	Normal	661 (49.2%)	1127 (44.8%)	<0.0001
	Maigreur	49 (3.7%)	51 (2.03%)	
	Surpoids	461 (34.3%)	926 (36.8%)	
	Obèse	172 (12.8%)	411 (16.3%)	
	Manquant	4	37	
Performance status	0-1	1153 (85.6%)	2430 (99.7%)	<0.0001
	≥ 2	194 (14.4%)	6 (0.25%)	
	Manquant	0	116	
Bras de traitement*	FOLFOX	672 (49.9%)	1277 (50.0%)	
	LV5FU2	675 (50.1%)	-	
	FOLFOX-cetuximab	-	1275 (50.0%)	
Localisation tumorale	Gauche	895 (66.4%)	1549 (61.0%)	<0.0001
	Droite	451 (33.5%)	964 (38.0%)	
	Gauche + droite	1 (0.1%)	26 (1.0%)	
	Manquant	0	13	
Stade T	T1 – T2	119 (8.8%)	265 (10.4%)	0.08
	T3	977 (72.6%)	1765 (69.3%)	
	T4	250 (18.6%)	518 (20.3%)	
	Manquant	1	4	
Stade N	N1	882 (65.7%)	1595 (62.5%)	0.05
	N2	460 (34.3%)	957 (37.5%)	
	manquant	5		
Grade histologique	G1/2	1085 (84.4%)	2051 (81.4%)	0.02
	G3/4	201 (15.6%)	469 (18.6%)	
	Manquant	61	32	
Perforation intestinale*	Oui	75 (5.6%)	121 (4.7%)	0.26
Occlusion intestinale*	Oui	260 (19.3%)	416 (16.3%)	<0.0001
ACE (ng/mL)	Médiane (IQR)	1.4 (1-2.3)	1.91 (0.9-2.2)	
ACE (ng/mL)	≤ 5	1243 (96.2%)	2378 (95.89%)	0.63
	> 5	49 (3.8%)	102 (4.11%)	
ACE^S (ng/mL)	0 to 1 .30*	630 (48.8%)	1172 (47.2%)	0.64

	1.30 to 5	613 (47.4%)	1205 (48.6%)	
	> 5	49 (3.8%)	103 (4.1%)	
ACE^{§§} (ng/mL)	0 to 1	492 (38.1%)	888 (35.8%)	0.36
	1 to 2	429 (33.2%)	887 (35.8%)	
	2 to 5	322 (24.9%)	602 (24.3%)	
	> 5	49 (3.8%)	103 (4.1%)	
	Manquant	55	72	
Temps entre la chirurgie et le dosage de l'ACE (semaines)	Médiane (IQR)	4.3 (3.3-5.4)	5.1 (4.0-6.3)	<0.0001
	Manquant	56	70	
Statuts BRAF et MMR	BRAF^{WT}/dMMR	28 (4.8%)	103 (6.4%)	0.003
	BRAF^{mut}/pMMR	51 (8.8%)	126 (7.9%)	
	BRAF^{mut}/dMMR	12 (2.1%)	64 (4.0%)	
	BRAF^{WT}/pMMR	488 (84.3%)	1308 (81.7%)	
	Manquant	768	951	
Temps de suivi médian (IC95%), années*		9.6 (9.5-9.8)	5.85 (5.71-5.91)	

Abréviations : WT: sauvage, mut: muté

Les variables sont décrites de la façon suivante : n (%) sauf les variables continues pour lesquelles la médiane et le range sont montrés.

**aucune donnée manquante*

§la médiane a été utilisée pour séparer les patients avec un dosage de l'ACE < 5 ng/mL.

§§Les terciles ont été utilisés pour séparer les patients avec un dosage de l'ACE < 5 ng/mL

Les p-valeurs concernent la comparaison entre les 2 cohortes de l'étude

4.2.3.5.2 Association du dosage post opératoire de l'ACE avec la survie sous sa forme continue

Dans la cohorte de découverte, l'approche des splines cubiques restreints a montré que les patients avec un ACE supérieur à 5 ng/mL étaient à risque plus important de rechute et de décès et que la population des patients ayant un dosage considéré comme normal était une population hétérogène en terme de risque de faire ces événements. La relation entre l'ACE sous forme continue et la SSM pouvait être modélisée sous forme d'une fonction racine carrée (Figure 1). La transformation sous forme d'une fonction racine carrée était aussi la meilleure transformation de la variable ACE proposée par l'analyse des polynômes fractionnaires.

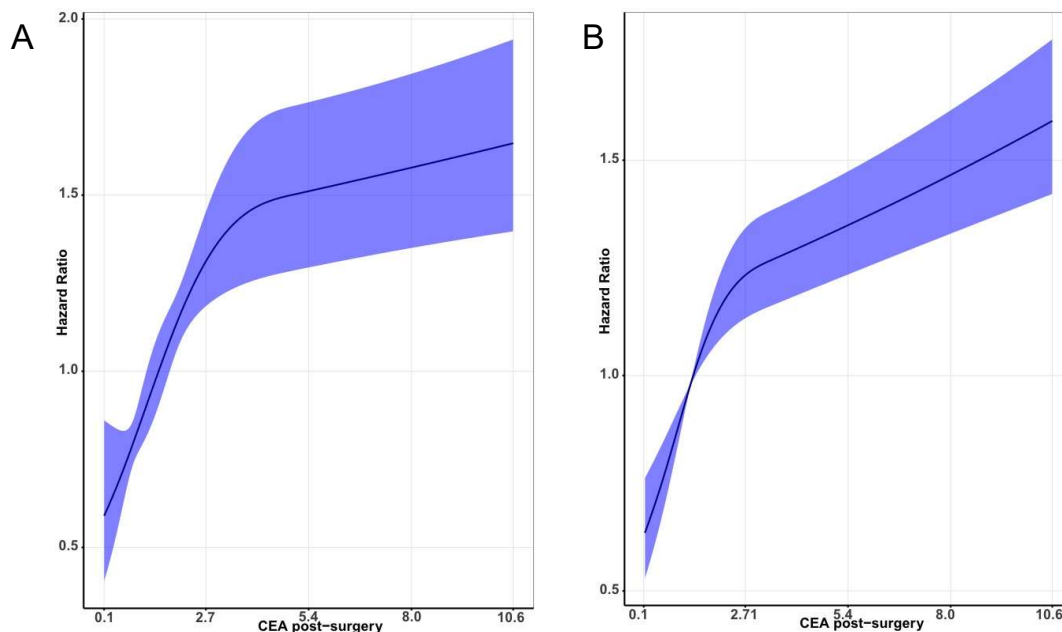


Figure 1 : relation entre l'ACE et la SSM dans la cohorte de découverte (A) et dans la cohorte de validation externe (B). On voit que la relation entre le dosage de l'ACE et la SSM suit une fonction racine carrée.

4.2.3.5.3 Association entre les critères de jugement et l'ACE sous sa forme catégorielle

Dans la cohorte de découverte, les patients ayant un dosage post opératoire de l'ACE supérieur à 5 ng/mL avaient une survie sans maladie diminuée par rapport à ceux ayant un ACE inférieur à 5 ng/mL avec un taux de SSM à 3 ans de 45% contre 70%, respectivement

($p < 0,0001$). Au sein de la population ayant un ACE inférieur à 5 ng/mL nous avons identifié des sous groupes de pronostic différent en terme de SSM et SG.

La valeur seuil trouvée grâce à la méthode des percentiles ou celle de maximisation du log-rank étaient la même valeur de 1,30 ng/mL. En utilisant les 3 groupes ainsi définis on retrouve 3 populations au pronostic différent ($p < 0,0001$) :

- 0-1,30 ng/mL : 75% de taux de SSM à 3 ans
- 1,30-5 ng/mL : 65% de taux de SSM à 3 ans
- supérieur à 5 ng/mL : 45% de taux de SSM à 3 ans.

Ces résultats ont été validés pour la survie globale, et dans la cohorte de validation externe pour les 2 critères de jugement.

4.2.3.5.4 ACE comme facteur pronostique indépendant

L'analyse univariée a montré que l'élévation de l'ACE en post opératoire était associée péjorativement avec la SSM. En analyse multivariée, l'ACE restait un facteur pronostique indépendant (tableau 2). Les patients avec un dosage post opératoire de l'ACE entre 1,30 et 5 ng/mL avaient un HR pour la SSM de 1,67 (IC95% : 1,28-2,19) comparés au patients ayant un ACE inférieur à 1,30 ng/mL. Ces résultats ont été validés pour la SG et dans la cohorte de validation externe pour les 2 critères de jugement (tableau 3).

Tableau 3 : modèle de Cox multivarié pour la SSM dans la cohorte de validation externe

		HR	IC95%	p
Age	> 70	1.27	0.97-1.66	0.08
ACE	< 1.30 ng/mL	Ref		<0.0001
	1.30 to 5 ng/mL	1.40	1.16-1.68	
	> 5 ng/mL	2.69	1.89-3.82	
Statuts <i>BRAF</i> et MMR	<i>BRAF</i> ^{WT} /pMMR	Ref		0.09
	<i>BRAF</i> ^{mut} /pMMR	1.11	0.81-1.51	
	<i>BRAF</i> ^{WT} /dMMR	0.88	0.60-1.29	
	<i>BRAF</i> ^{mut} /dMMR	0.49	0.27-0.89	
Stade N	N2	2.18	1.82-2.60	<0.0001

Abréviations : WT: sauvage, mut: muté

Tableau 2 : modèles de Cox univariés et multivariés pour la SSM (A) et la SG (B) dans la cohorte de découverte

2A		Univarié					Multivarié N patients=547			
		N pts	N evt	HR	IC95%	p	HR	IC95%	p	
Age (années)	> 70	190	92	1.27	1.01-1.58	0.04	1.5	1.09-2.07	0.01	
Sexe	Homme	726	294	0.98	0.83-1.16	0.84				
Indice de masse corporelle	Maigreur	49	18	0.96	0.60-1.55	0.14				
	Surpoids	461	207	1.20	1.00-1.44					
	Obèse	172	64	0.91	0.69-1.20					
Bras de traitement	LV5FU2	675	293	1.26	1.07-1.49	0.007				
Localisation tumorale	Droite	452	187	1.08	0.90-1.29	0.40				
Grade histologique	G3/4	201	90	1.27	1.01-1.59	0.04				
Performance status	≥ 1	970	388	0.98	0.81-1.18	0.81				
Perforation intestinale	Oui	75	42	1.68	1.23-2.31	0.001				
Occlusion intestinale	Oui	260	125	1.37	1.12-1.68	0.002				
ACE	0 to 1.30 ng/ml	630	212	Ref		<0.0001	Ref		<0.0001	
	1.30 to 5 ng/ml	613	286	1.53	1.28-1.83		1.67	1.28-2.19		
	> 5 ng/mL	49	29	2.75	1.86-4.05		2.68	1.53-4.69		
ACE	0 to 1 ng/ml	492	166	Ref		<0.0001				
	1 to 2 ng/ml	429	175	1.25	1.01-1.54					
	2 to 5 ng/ml	322	157	1.62	1.30-2.02					
	> 5 ng/ml	49	29	2.72	1.83-4.03					
Statuts BRAF et MMR	BRAF ^{WT} /pMMR	488	212	Ref		0.42	Ref		0.22	
	BRAF ^{mut} /pMMR	51	22	1.08	0.70-1.68		1.03	0.65-1.64		
	BRAF ^{WT} /dMMR	28	8	0.62	0.31-1.26		0.65	0.32-1.32		
	BRAF ^{mut} /dMMR	12	3	0.57	0.18-1.78		0.36	0.11-1.14		
Stade T	T3	977	384	1.90	1.30-2.80	<0.0001				
	T4	250	131	2.79	1.85-4.19					
Stade N	N2	460	237	1.89	1.59-2.24	<0.0001	1.93	1.49-2.50	<0.0001	

Abréviations : pts: patients, evt: événements, WT: sauvage, mut: muté

2B

		Univarié					Multivarié (N patients=531)		
		N pts	N evt	HR	95% CI	P	HR	95%CI	P
Age (années)	> 70	190	82	1.375	1.08-1.75	.009	1.62	1.13-2.31	.008
Sexe	Male	726	254	1.046	0.87-1.26	.63			
Bras de traitement	LV5FU2	675	250	1.255	1.04-1.51	.02			
Localisation tumorale	Right Colon	452	165	1.18	0.97-1.42	.09			
Grade histologique	G3/4	201	85	1.52	1.20-1.93	<.0001	1.91	1.25-2.91	.003
Performance status	≥ 1	970	335	1.08	0.88-1.33	.47			
Perforation intestinale	Yes	75	38	1.886	1.35-2.63	<.0001			
Occlusion intestinale	Yes	260	113	1.494	1.21-1.85	<.0001			
ACE, ng/mL	< 1.30	630	179	Ref			Ref		.0005
	1.30 to 5	613	240	1.50	1.23-1.82	<.0001	1.73	1.27-2.34	
	> 5	49	26	2.58	1.71-3.89		2.35	1.26-4.39	
ACE, ng/mL	0 to 1	492	138	Ref		<.0001			
	1 to 2	429	146	1.24	0.99-1.57				
	2 to 5	322	135	1.67	1.32-2.12				
	> 5	49	26	2.60	1.71-3.96				
Statuts BRAF et MMR	BRAF ^{WT} /pMMR	488	170	Ref		.46	Ref		.03
	BRAF ^{mut} /pMMR	51	20	1.31	0.83-2.09		1.37	0.83-2.25	
	BRAF ^{WT} /dMMR	28	7	0.71	0.33-1.51		0.57	0.26-1.26	
	BRAF ^{mut} /dMMR	12	3	0.73	0.23-2.28		0.19	0.04-0.78	
Stade T	T3	977	320	2.232	1.421-3.507	<.0001	2.18	0.95-4.97	.005
	T4	250	119	3.661	2.279-5.881		3.30	1.740-7.74	
Stade N	N2	460	207	1.96	1.63 -2.357	<.0001	1.97	1.47-2.65	<.0001

Abréviations: pts: patients, evt: événements, WT:sauvage, mut: muté

4.2.3.5.5 Valeur pronostique additionnelle de l'ACE au sein des groupes pronostiques déjà définis par la classification TNM

Dans la cohorte de découverte, 729 (54,3%) et 614 (45,7%) patients avaient respectivement un cancer du colon de stade III à bas risque (T3N1) et haut risque (T4 et/ou N2). Le dosage post opératoire de l'ACE au sein de ces deux populations permettait d'identifier un gradient pronostique pour la SSM et la SG.

Ces résultats ont été validés dans la cohorte de validation externe. Ils sont montrés dans la figure 3.

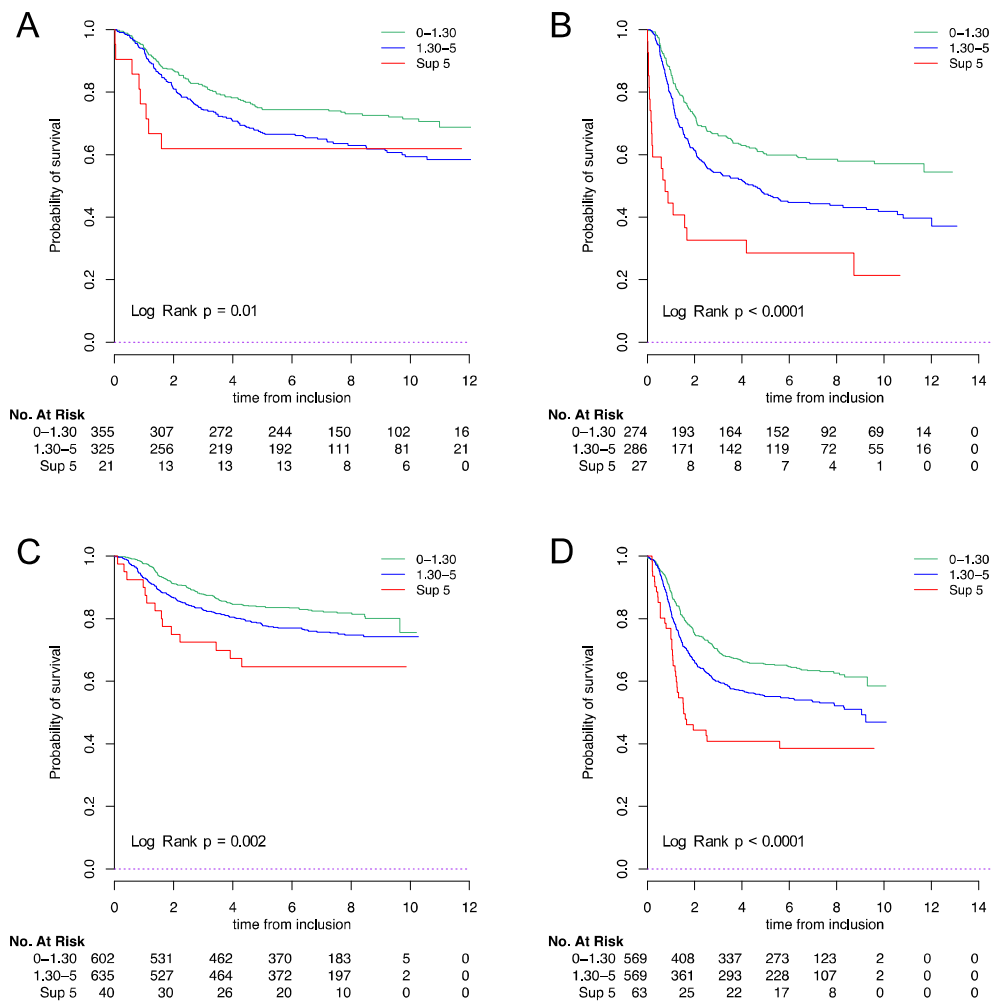


Figure 3: Courbes de Kaplan Meier montrant l'association entre le dosage de l'ACE (≤ 1.30 ng/mL, 1.30-5 ng/mL, > 5ng/mL) et la SSM selon les groupes de risques définis pour le cancer du colon de stade III. **A** : cohorte MOSAIC à faible risque (T3N1). **B** : cohorte MOSAIC à risque élevé (T4 et/ou N2). **C** : cohorte PETACC-8 à faible risque. **D** : cohorte PETACC-8 à haut risque.

4.2.3.5.6 Bénéfice de la chimiothérapie selon le groupe de risque défini par l'ACE

Dans la cohorte de découverte, le bénéfice en survie de l'adjonction de l'oxaliplatine au LV5FU2 n'était pas différent entre les groupes pronostiques définis par le dosage de l'ACE. Il n'y avait pas d'interaction entre les groupes d'ACE et le bras de traitement ($p=0,5371$ pour la SSM et $p=0,6761$ pour la SG).

De même, dans la cohorte de validation externe, il n'y avait pas de bénéfice à l'ajout du cetuximab au FOLFOX dans aucun des groupes d'ACE (p pour l'interaction= $0,8629$ pour la SSM, et $p=0,2412$ pour la SG).

4.2.3.6 Conclusions de l'étude

Cette étude confirme la forte valeur pronostique du dosage post opératoire de l'ACE en terme de SSM et SG dans deux larges cohortes de patients atteints d'un cancer du colon de stade III traités par chimiothérapie adjuvante. Les patients ayant un dosage considéré comme « normal » (< 5 ng/mL) représentent une population hétérogène en terme de risque de rechute et de décès, suggérant que la valeur seuil de 5 ng/mL n'est pas optimale. Par ailleurs, l'ACE devrait figurer de façon systématique dans les facteurs d'ajustement des analyses des futurs essais de phase III dans le cancer du colon adjuvant.

4.2.3.7 Manuscrit scientifique

Carcinoembryonic Antigen Levels and Survival in Stage III Colon Cancer: *Post hoc* Analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials



Edouard Auclin^{1,2,3}, Julien Taieb¹, Come Lepage⁴, Thomas Aparicio⁵, Roger Faroux⁶, Enrico Mini⁷, Gunnar Folprecht⁸, Ramon Salazar⁹, Magdalena Benetkiewicz¹⁰, Maria Banzi¹¹, Christophe Louvet¹², Jean-Luc Van Laethem¹³, Josep Taberero¹⁴, Tamas Hickish¹⁵, Aimery de Gramont¹⁶, Thierry André¹⁷, and Dewi Vernerey^{2,3,10}

Abstract

Background: We explored and validated the association of postoperative carcinoembryonic antigen (CEA) with disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in stage III colon cancer.

Methods: Patients with stage III colon cancer from the MOSAIC and PETACC-8 trials were enrolled. The relation between CEA and outcomes was continuously modeled with the restricted cubic splines (RCS) method. Association of CEA with outcomes was assessed by the Kaplan–Meier method, with two risk groups among patients with a CEA level ≤ 5 ng/mL. Multivariate Cox proportional hazard models were constructed.

Results: The CEA level was available in 1,292 (96%) and 2,477 (97%) patients in the discovery and validation cohorts. The RCS analysis confirmed that patients with a

CEA level >5 ng/mL were at highest risk of recurrence or death and those with a CEA level ≤ 5 ng/mL presented a heterogeneous risk population. In the discovery cohort, the 3-year DFS rate was 75%, 65%, and 45% in a group of patients with CEA level of 0–1.30 ng/mL ($n = 630$), 1.30–5 ng/mL ($n = 613$), and >5 ng/mL ($n = 49$), respectively ($P < 0.001$). CEA was independently associated with endpoints. All findings were confirmed in the validation cohort.

Conclusions: Postoperative CEA level was highly and independently associated with DFS and OS, especially in patients with a CEA level of ≤ 5 ng/mL, suggesting that this cutoff is not optimal.

Impact: CEA levels should be applied more accurately in future trials and clinical practice.

¹Sorbonne Paris-Cité, Paris Descartes University, Hepato-Gastroenterology and Gastrointestinal Oncology Department, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France. ²Methodology and Quality of Life Unit in Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France. ³University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, France. ⁴Department of Gastroenterology, CHU Le Bocage, INSERM U1231, Dijon, France. ⁵Department of Gastroenterology and Digestive Oncology, Hôpital Saint Louis, Sorbonne Paris-Cité, Paris Diderot University, Paris, France. ⁶Department of Gastroenterology, Centre Hospitalier Départemental Les Oudairies, La Roche-Sur-Yon, France. ⁷Department of Health Sciences, Section of Clinical Pharmacology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy. ⁸Medical Department I, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden, Germany. ⁹Institut Català d'Oncologia, Oncobell Program, IDI-BELL, CIBERONC, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ¹⁰Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR), Paris, France. ¹¹Unit of Medical Oncology, Clinical Cancer Center, AUSL-IRCCS Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy. ¹²Unit of Medical Oncology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. ¹³Gastroenterology and Digestive Department, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Belgium. ¹⁴Vall d'Hebron University Hospital and Institute of Oncology (VHIO), CIBERONC, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁵Department of Oncology, Royal Bournemouth Hospital and Bournemouth University, Bournemouth, England. ¹⁶Department of Oncology, Institut Hospitalier Franco-Britannique, Levallois-Perret, France. ¹⁷Sorbonne University and Department of Medical Oncology, Hôpital Saint Antoine, Paris, France.

Corresponding Author: Dewi Vernerey, Besançon University Hospital, INSERM UMR1098, 3 Boulevard Alexandre Fleming, Besançon 25030, France. Phone: 338-121-8776; Fax: 381-218-775; E-mail: dvernerey@chu-besancon.fr

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2019;28:1153–61

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0867

©2019 American Association for Cancer Research.

Introduction

Colon cancer is the third most common cancer in men and women (1, 2). When diagnosed at a localized stage, curative management is proposed to patients including surgery and adjuvant chemotherapy if lymph node involvement is observed (stage III colon cancer). In stage III disease, fluoropyrimidine-based adjuvant treatment improved patient outcomes (3). The addition of oxaliplatin to a fluoropyrimidine chemotherapy backbone has produced additional benefit by increasing the 3-year disease-free survival (DFS) rate (4–6), and the oxaliplatin-containing combination became the worldwide standard adjuvant treatment in the setting of colon cancer. Recently, the findings of the International Duration Evaluation of Adjuvant Therapy collaboration have provided useful information in helping oncologists discuss the duration of adjuvant therapy (7–10). To optimize the value of this treatment, better tumor markers or better awareness of tumor markers to improve the recurrence risk detection rate are needed.

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a well-known, low-cost biological tumor marker for colon cancer (11, 12), overexpressed in 90% of colorectal cancer cases (13). The European Society of Medical Oncology (ESMO) guidelines recommend CEA determination in a postoperative follow-up period (14). Previous large studies have shown that elevated preoperative CEA levels are associated with worse prognosis in all stage colon cancer patients (15) and in stage I and II colon cancer patients who did not receive adjuvant chemotherapy (16).

The results by Konishi and colleagues showed that the preoperative CEA level is not a relevant marker of recurrence in localized colon cancer if CEA is normalized after surgery (17), thus underlining the importance of postoperative CEA. Another study by Lu and colleagues identified high postoperative CEA level of ≥ 5 ng/mL as an independent prognostic predictor of early relapse (18). The CEA upper limit of normal (ULN) levels vary between different institutions, ranging from 3.0 to 5.0 ng/mL, with a cutoff of 5.0 ng/mL used by most centers even though this value remains debated (15, 16, 19). Recently, Margalit and colleagues defined preoperative CEA of 2.35 ng/mL as an optimal cut-off point for predicting survival of stage I and II colon cancer (16). Likewise, Kim and colleagues suggested preoperative CEA of 3 ng/mL as the best cut-off value to identify stage III colon cancer patients with low and high risk of death or recurrence (19).

The aims of this *post hoc* analysis were (i) to assess and precisely validate the postoperative CEA prognostic value for DFS and OS in patients with stage III colon cancer receiving standard adjuvant treatments; (ii) to challenge the standard 5 ng/mL as threshold value to discriminate patients with low and high risk of recurrence or death; and (iii) to determine the additional value of postoperative CEA for the TNM classification to better stratify patients for risk of death and of recurrence.

Materials and Methods

Population

Stage III colon cancer patients for a discovery cohort were selected from the MOSAIC phase III trial (NCT00275210; refs. 4, 20). The MOSAIC study showed a survival benefit with the addition of oxaliplatin to adjuvant 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV; the FOLFOX4 regimen) in patients with colon cancer. External validation cohort was obtained with the PETACC-8 phase III trial population (NCT00265811; ref. 21). The PETACC-8 study failed to show a survival benefit for adjuvant combination of FOLFOX and cetuximab in patients with stage III colon cancer. Both trials were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines and approved by the appropriate Ethics Committees.

Follow-up

In both study cohorts, the radiologic evaluation was made at randomization and every 6 months during the first 5 years of follow-up.

The MOSAIC database was locked on April 25, 2014, and the PETACC-8 database on October 27, 2016.

Data extraction

Demographics, cancer history, pathologic, clinical, biological parameters, and efficacy outcomes (DFS and OS) were prospectively collected at the time of randomization.

Postoperative CEA serum measurements

For both study cohorts, a postoperative CEA value (MOSAIC: <10 ng/mL; PETACC-8: $\leq 1.5 \times$ ULN) was an inclusion criterion. The serum CEA measurements were not centralized. In the PETACC-8 study, the ULN for CEA was available for all patients; the median CEA value was 5 ng/mL [interquartile range (IQR), 3.8–5].

Statistical analysis

Median (IQR) values and proportions (percentage) were used for continuous and categorical variables, respectively. Median and proportions were compared using the Wilcoxon–Mann–Whitney test and the χ^2 -test (or the Fisher exact test, if appropriate), respectively.

DFS was defined as the time between randomization and local/distant relapse, second colorectal/rectal occurrence, or death, whichever occurred first. Alive patients without relapse and second colorectal cancer were censored at the date of their last follow-up. OS was defined as the time between randomization and death from any cause. Patients known to be alive were censored at the date of their last follow-up.

DFS and OS were estimated using Kaplan–Meier method and described using median or rate at specific time points with their 95% confidence intervals (95% CI). Follow-up was calculated using the reverse Kaplan–Meier method (22).

When used continuously, the association between CEA and survival was investigated using the fractional polynomials method (23–25) and was validated by the restricted cubic splines method with graphical evaluation. Different cutoffs of CEA level in the discovery cohort were explored to investigate an association between CEA and survival (categorical). These were based on the percentiles (median and tercile) and optimal cut-off point (log-rank maximization) methods (26).

The association of demographic, clinical, biological, and molecular factors with survival was assessed with univariate Cox proportional hazards model. Variables with *P* values of less than 0.10 and/or clinically relevant variables were entered into an intermediate multivariable Cox regression model. Final multivariable model was constructed with statistically significant variables of the intermediate model. The correlation between variables was verified before construction of the multivariate models, in order to deal with potential collinearity. All multivariate models were stratified on the basis of adjuvant treatment received. Hazard proportionality was assessed for each categorical variable using the Schoenfeld residual-based test and a graphical method.

The predictive value and the discrimination ability of the final model were assessed with the Harrell's concordance index (C-index; ref. 27). The robustness of the statistical models was assessed by multiple imputation procedure (assessment of potential bias arising from missing data for parameters involved in the multivariable model; ref. 28).

The differential treatment effects on DFS and OS among CEA risk groups were evaluated with an interaction term in the Cox proportional hazards model.

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

Results

Characteristics of patients

In the discovery cohort, 1,347 patients with stage III colon cancer from the MOSAIC study were enrolled. Postoperative CEA was available in 1,292 (95.9%) patients; 1,243 (96.2%) had a CEA level below 5 ng/mL. The median time between surgery and CEA measurement was 4.3 weeks and the median follow-up was 9.6 years (Table 1).

Table 1. Characteristics of the discovery ($n = 1,347$) and external validation ($n = 2,552$) populations

		Discovery cohort <i>N</i> = 1,347	External validation cohort <i>N</i> = 2,552	<i>P</i>
Age (years) ^a	<70	1157 (85.9%)	2283 (89.4%)	0.001
	≥70	190 (14.1%)	269 (10.5%)	
Gender ^a	Female	621 (46.1%)	1091 (42.7%)	0.04
	Male	726 (53.9%)	1461 (57.2%)	
Body mass index	Normal	661 (49.2%)	1127 (44.8%)	<0.0001
	Underweight	49 (3.7%)	51 (2.03%)	
	Overweight	461 (34.3%)	926 (36.8%)	
	Obese	172 (12.8%)	411 (16.3%)	
	Missing	4	37	
Performance status	0–1	1153 (85.6%)	2430 (99.7%)	<0.0001
	≥2	194 (14.4%)	6 (0.25%)	
	Missing	0	116	
Treatment arm ^a	FOLFOX	672 (49.9%)	1277 (50.0%)	
	LV5FU2	675 (50.1%)	-	
	FOLFOX-cetuximab	-	1275 (50.0%)	
	Left colon	895 (66.4%)	1549 (61.0%)	
Tumor location	Right colon	451 (33.5%)	964 (38.0%)	<0.0001
	Both	1 (0.1%)	26 (1.0%)	
T stage	Missing	0	13	0.08
	T1 – T2	119 (8.8%)	265 (10.4%)	
	T3	977 (72.6%)	1765 (69.3%)	
	T4	250 (18.6%)	518 (20.3%)	
	Missing	1	4	
N stage	N1	882 (65.7%)	1595 (62.5%)	0.05
	N2	460 (34.3%)	957 (37.5%)	
	Missing	5	-	
Histoprognostic grade	G1/2	1085 (84.4%)	2051 (81.4%)	0.02
	G3/4	201 (15.6%)	469 (18.6%)	
	Missing	61	32	
	Yes	75 (5.6%)	121 (4.7%)	
Intestinal perforation ^a	Yes	260 (19.3%)	416 (16.3%)	<0.0001
	Missing	61	32	
Intestinal obstruction ^a	Yes	260 (19.3%)	416 (16.3%)	<0.0001
	Missing	61	32	
CEA (ng/mL)	Median (IQR)	1.4 (1–2.3)	1.91 (0.9–2.2)	0.63
	≤5	1243 (96.2%)	2378 (95.89%)	
CEA ^b (ng/mL)	>5	49 (3.8%)	102 (4.11%)	0.64
	Missing	55	72	
	0 to 1.30 ^a	630 (48.8%)	1172 (47.2%)	
	1.30 to 5	613 (47.4%)	1205 (48.6%)	
CEA ^c (ng/mL)	>5	49 (3.8%)	103 (4.1%)	0.36
	Missing	55	72	
	0 to 1	492 (38.1%)	888 (35.8%)	
	1 to 2	429 (33.2%)	887 (35.8%)	
	2 to 5	322 (24.9%)	602 (24.3%)	
Time between surgery and CEA measurement (week)	>5	49 (3.8%)	103 (4.1%)	<0.0001
	Missing	55	72	
BRAF and MMR status	Median (IQR)	4.3 (3.3–5.4)	5.1 (4.0–6.3)	0.003
	Missing	56	70	
	<i>BRAF</i> ^{WT} /dMMR	28 (4.8%)	103 (6.4%)	
	<i>BRAF</i> ^{mut} /pMMR	51 (8.8%)	126 (7.9%)	
	<i>BRAF</i> ^{mut} /dMMR	12 (2.1%)	64 (4.0%)	
Median follow-up time (95% CI), years ^a	<i>BRAF</i> ^{WT} /pMMR	488 (84.3%)	1308 (81.7%)	
	Missing	768	951	
		9.6 (9.5–9.8)	5.85 (5.71–5.91)	

NOTE: Variables are described as *n* (%) except for continuous variables, which are described as median (IQR). *P* values refer to the differences between the discovery and validation cohorts.

Abbreviations: dMMR, deficient mismatch repair; LV5FU2, 5-fluorouracil chemotherapy; mut, mutated; N stage, nodal stage according to the TNM classification; pMMR, proficient mismatch repair; T stage, tumor stage according to the TNM classification; WT, wild type.

^aNo missing data.

^bMedian approach was used to split the population of patients with a level of CEA <5 ng/mL.

^cTertile approach was used to split the population of patients with a level of CEA <5 ng/mL.

In the external validation cohort, 2,552 patients with stage III colon cancer from the PETACC-8 study were enrolled. The median time between surgery and CEA measurement was 5.1 weeks and the median follow-up was 5.85 years (Table 1).

Association of postoperative CEA in its continuous form with survival

In the discovery cohort, the restricted cubic splines approach showed that patients with a CEA level of >5 ng/mL were at highest risk of recurrence or death. Patients with a CEA level

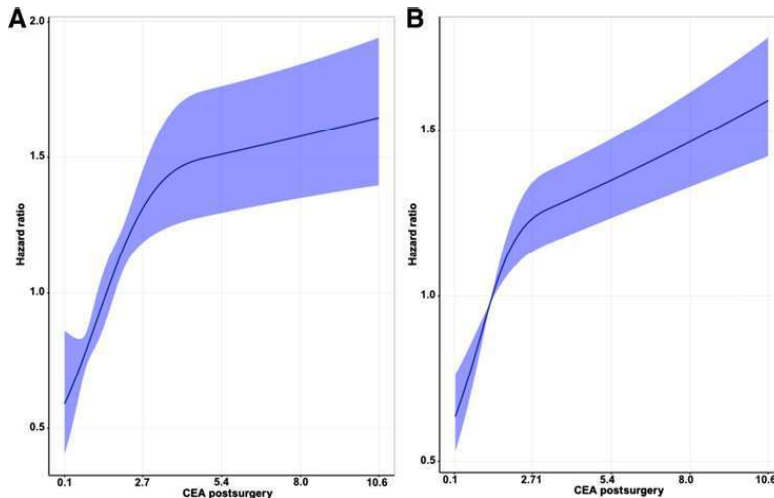


Figure 1. Restricted cubic splines modeling of hazard ratio (HR) for DFS as a function of postoperative CEA level. HR for DFS in stage III colon cancer as a function of postoperative CEA level in the discovery cohort (A) and in the validation cohort (B). Association between CEA and DFS was modeled using restricted cubic splines, showing a square root relation between those variables. Estimates were derived from Cox model. The purple area around the blue line represents the 95% CI.

of ≤ 5 ng/mL did not present a homogeneous risk population. A gradual risk suggested a square root relation between CEA and DFS (Fig. 1A). The square root transformation was the best to model the relation between CEA and survival endpoints with the fractional polynomials method. Similar observations were made for the external validation cohort (Fig. 1B) and for OS endpoint (Supplementary Fig. S1). These results allowed to identify different risk populations among patients with a level of CEA lower than 5 ng/mL.

Survival according to postoperative categorical CEA

The 5 ng/mL cut-off value of CEA allowed to identified two populations with distinct DFS risk profiles (CEA ≤ 5 ng/mL population: the 3-year DFS rate of 70%; and CEA > 5 ng/mL population: the 3-year DFS rate of 45%; Fig. 2A).

Considering the important number of patients with CEA ≤ 5 ng/mL, the median and tertile approach were used to determine 2 and 3 populations in these patients (Table 1). Figure 2B shows a distinct DFS risk profile in the two median based populations identified in patients with CEA ≤ 5 ng/mL. The 3-year DFS rate was 75%, 65%, and 45% for CEA < 1.30 ng/mL, CEA 1.30 to 5 ng/mL, and CEA > 5 ng/mL groups, respectively ($P < 0.0001$). The optimal cut-off value determined by the Hothorn and Lausen method (Supplementary Fig. S2) was equal to 1.30 ng/mL for patients with a CEA level of ≤ 5 ng/mL, reinforcing the choice of CEA 1.30 to determine different risk populations in these patients. These results were fully confirmed in the external validation cohort (Fig. 2C and D) and were also validated for OS in both cohorts (Supplementary Fig. S3). Similar results were observed for DFS and OS with the tertile approach for both study cohorts (Supplementary Fig. S4).

Consistent observations were found in a subgroup analysis of treatments and of times between surgery and CEA measurement for both cohorts (Supplementary Figs. S5–S8).

Patients' characteristics according to CEA level groups are presented in Supplementary Tables S1 and S2.

Postoperative CEA level as independent prognostic factor for survival

In univariate and multivariate analyses, CEA level was found to be significantly associated with DFS. The independent prognostic value of CEA was also confirmed in multivariate analysis. Patients with CEA between 1.30 and 5 mg/mL had a HR of 1.67 (95% CI, 1.28–2.19) compared to those with CEA < 1.30 ng/mL (Table 2). Similar results were obtained for OS (Table 2).

In the sensitivity analysis, multiple imputation procedure provided analogous results in the discovery cohort (Supplementary Tables S3 and S4). All results were replicated in the external validation cohort (Table 3; Supplementary Table S5).

Additional value of postoperative CEA for DFS risk stratification within TNM risk subgroups

In the discovery cohort, 729 (54.3%) and 614 (45.7%) patients had low-risk (T3N1) and high-risk (T4 or N2) stage III colon cancer, respectively. As expected, DFS differed according to these subgroups (Supplementary Fig. S9). Among the low and high-risk subgroups, the postoperative CEA level classification allowed to identify populations with different DFS and OS risk profiles (Fig. 3; Supplementary Figs. S9 and S10). Similar results were obtained in the external validation cohort for both DFS and OS (Fig. 3; Supplementary Fig. S9).

Chemotherapy regimen benefit across CEA risk groups

In the discovery cohort, the survival benefit from the addition of oxaliplatin to 5-fluorouracil was not different across different CEA groups in term of DFS and OS. No statistically significant interaction between CEA groups and treatment the arm (5-FU/LV vs. FOLFOX) was found ($P = 0.5371$ and $P = 0.6761$, respectively; Supplementary Fig. S11).

In the validation cohort, no interaction between the CEA risk groups and the treatment arm (cetuximab-FOLFOX vs. FOLFOX) in terms of DFS and OS was found ($P = 0.8629$ and $P = 0.2412$, respectively).

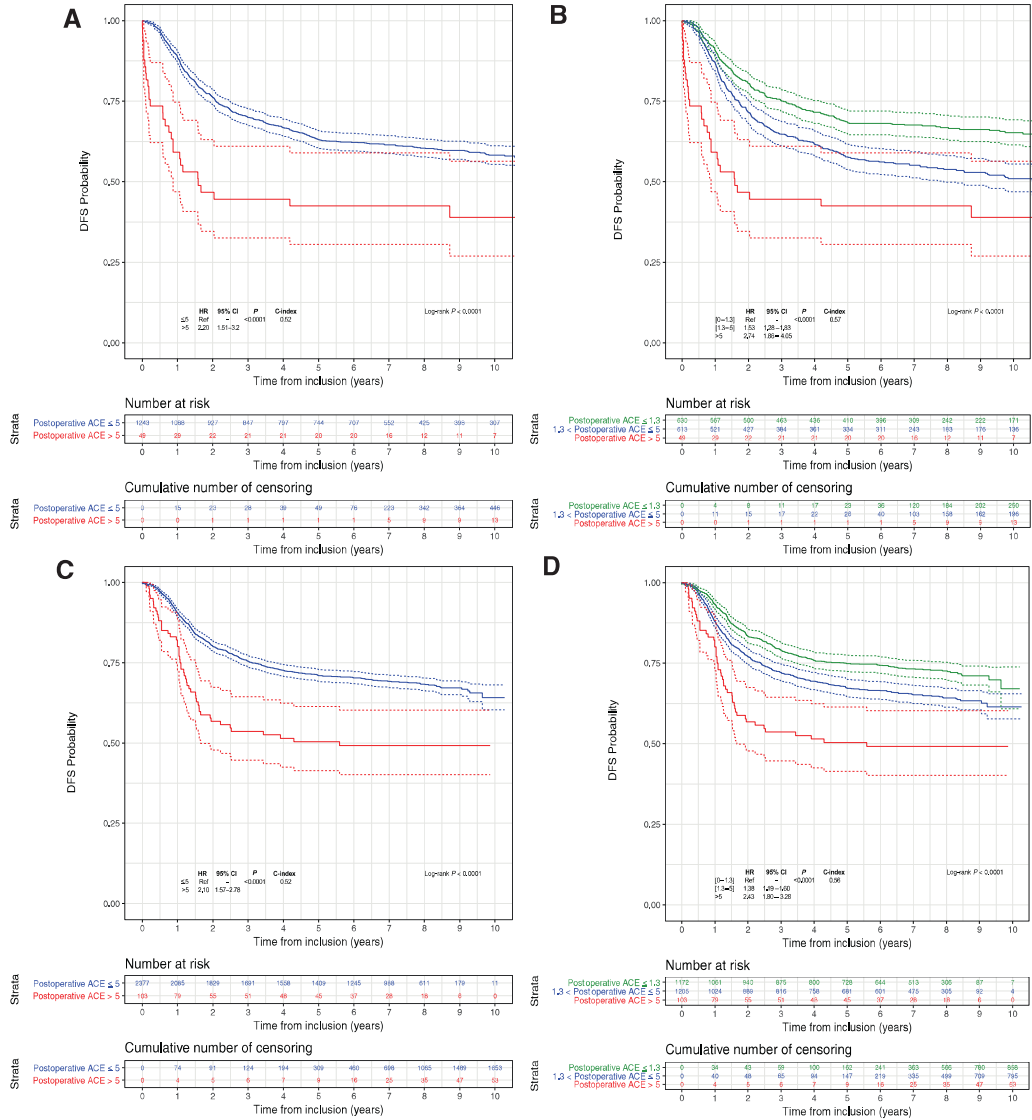


Figure 2. Association between CEA and DFS in the discovery and validation cohorts. Kaplan-Meier survival curves for DFS of stage III colorectal cancer patients in the MOSAIC cohort according to the standard CEA levels (A; \leq or $>$ 5 ng/mL), in the MOSAIC cohort according to the new CEA levels (B; \leq 1.30 ng/mL, 1.30–5 ng/mL, $>$ 5 ng/mL), in the PETACC-8 cohort according to the standard CEA levels (C; \leq or $>$ 5 ng/mL), and in the PETACC-8 cohort according to the new CEA levels (D; \leq 1.30 ng/mL, 1.30–5 ng/mL, $>$ 5 ng/mL). *P* values were estimated using the log-rank test. The discrimination ability of the CEA level was evaluated with the C-index. HR and 95% confidence intervals were obtained with a Cox regression method.

Discussion

This study confirmed strong prognostic value of postoperative CEA level for DFS and OS in two large cohorts of patients with stage III colon cancer treated with adjuvant chemotherapy. Patient

with a CEA level of $>$ 5 ng/mL had a worse risk profile for recurrence and death. Distinct risk profiles were identified in patients with CEA \leq 5 ng/mL currently considered as a single population with normal CEA values.

Table 2A. Univariate and multivariate Cox proportional hazards model for DFS in the discovery cohort

		N pts	N evt	Univariate		Final multivariate N patients = 547	
				HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age	>70	190	92	1.27 (1.01-1.58)	0.04	1.5 (1.09-2.07)	0.01
Gender	Male	726	294	0.98 (0.83-1.16)	0.84		
Body mass index	Underweight	49	18	0.96 (0.60-1.55)	0.14		
	Overweight	461	207	1.20 (1.00-1.44)			
	Obese	172	64	0.91 (0.69-1.20)			
Treatment arm	LV5FU2	675	293	1.26 (1.07-1.49)	0.007		
Tumor location	Right colon	452	187	1.08 (0.90-1.29)	0.40		
Histoprognostic grade	G3/4	201	90	1.27 (1.01-1.59)	0.04		
Performance status	≥ 1	970	388	0.98 (0.81-1.18)	0.81		
Intestinal perforation	Yes	75	42	1.68 (1.23-2.31)	0.001		
Intestinal obstruction	Yes	260	125	1.37 (1.12-1.68)	0.002		
CEA level	0 to 1.30 ng/mL	630	212	Ref	<0.0001	Ref	<0.0001
	1.30 to 5 ng/mL	613	286	1.53 (1.28-1.83)		1.67 (1.28-2.19)	
	>5 ng/mL	49	29	2.75 (1.86-4.05)		2.68 (1.53-4.69)	
CEA level	0 to 1 ng/mL	492	166	Ref	<0.0001		
	1 to 2 ng/mL	429	175	1.25 (1.01-1.54)			
	2 to 5 ng/mL	322	157	1.62 (1.30-2.02)			
BRAF and MMR status	>5 ng/mL	49	29	2.72 (1.83-4.03)			
	<i>BRAF</i> ^{WT} /pMMR	4488	212	Ref	0.42	Ref	0.22
	<i>BRAF</i> ^{mut} /pMMR	51	22	1.08 (0.70-1.68)		1.03 (0.65-1.64)	
	<i>BRAF</i> ^{WT} /dMMR	28	8	0.62 (0.31-1.26)		0.65 (0.32-1.32)	
T stage	<i>BRAF</i> ^{mut} /dMMR	12	3	0.57 (0.18-1.78)		0.36 (0.11-1.14)	
	T3	977	384	1.90 (1.30-2.80)	<0.0001		
N stage	T4	250	131	2.79 (1.85-4.19)			
	N2	460	237	1.89 (1.59-2.24)	<0.0001	1.93 (1.49-2.50)	<0.0001

NOTE: Univariate variables that reached statistical significance ($P < 0.10$) or that did not reach significance but are known to be strongly associated with DFS were included in the multivariable model. A final multivariable model (displayed here) was realized with the statistically significant variables of the intermediate model. Abbreviations: dMMR, deficient mismatch repair; evt, events; LV5FU2, 5-fluorouracil chemotherapy; mut, mutated; N stage, nodal stage according to the TNM classification; pMMR, proficient mismatch repair; pts, patients; T stage, tumor stage according to the TNM classification; WT, wild type.

Table 2B. Univariate and multivariate Cox proportional hazards model for OS in the discovery cohort

		N pts	N evt	Univariate		Final multivariate N patients = 531	
				HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age	>70	190	82	1.375 (1.08-1.75)	0.009	1.62 (1.13-2.31)	0.008
Gender	Male	726	254	1.046 (0.87-1.26)	0.63		
Treatment arm	LV5FU2	675	250	1.255 (1.04-1.51)	0.02		
Tumor location	Right colon	452	165	1.18 (0.97-1.42)	0.09		
Histoprognostic grade	G3/4	201	85	1.52 (1.20-1.93)	<0.0001	1.91 (1.25-2.91)	0.003
Performance status	≥ 1	970	335	1.08 (0.88-1.33)	0.47		
Intestinal perforation	Yes	75	38	1.886 (1.35-2.63)	<0.0001		
Intestinal obstruction	Yes	260	113	1.494 (1.21-1.85)	<0.0001		
CEA level, ng/mL	< 1.30	630	179	Ref		Ref	0.0005
	1.30 to 5	613	240	1.50 (1.23-1.82)	<0.0001	1.73 (1.27-2.34)	
	> 5	49	26	2.58 (1.71-3.89)		2.35 (1.26-4.39)	
CEA level, ng/mL	0 to 1	492	138	Ref	<0.0001		
	1 to 2	429	146	1.24 (0.99-1.57)			
	2 to 5	322	135	1.67 (1.32-2.12)			
BRAF and MMR status	> 5	49	26	2.60 (1.71-3.96)			
	<i>BRAF</i> ^{WT} /pMMR	488	170	Ref	0.46	Ref	0.03
	<i>BRAF</i> ^{mut} /pMMR	51	20	1.31 (0.83-2.09)		1.37 (0.83-2.25)	
	<i>BRAF</i> ^{WT} /dMMR	28	7	0.71 (0.33-1.51)		0.57 (0.26-1.26)	
T stage	<i>BRAF</i> ^{mut} /dMMR	12	3	0.73 (0.23-2.28)		0.19 (0.04-0.78)	
	T3	977	320	2.232 (1.421-3.507)	<0.0001	2.18 (0.95-4.97)	0.005
N stage	T4	250	119	3.661 (2.279-5.881)		3.30 (1.240-7.74)	
	N2	460	207	1.96 (1.63-2.357)	<0.0001	1.97 (1.47-2.65)	<0.0001

NOTE: Univariate variables that reached statistical significance ($P < 0.10$) or that did not reach significance but are known to be strongly associated with DFS were included in the multivariable model. A final multivariable model (displayed here) was realized with the statistically significant variables of the intermediate model. Abbreviations: dMMR, deficient mismatch repair; evt, events; LV5FU2, 5-fluorouracil chemotherapy; mut, mutated; N stage, nodal stage according to the TNM classification; pMMR, proficient mismatch repair; pts, patients; T stage, tumor stage according to the TNM classification; WT, wild type.

One of the questions that arises from our results is the choice of the CEA cutoff for risk prediction. Kim and colleagues showed in their recent retrospective study of 965 patients with stage III colon cancer that the optimal cutoff for preoperative

CEA was 3 ng/mL in the training and validation sets (19). Other studies evaluating preoperative CEA also showed that colon cancer patients with CEA levels inferior to 2.5 or 2.7 ng/mL had better OS and DFS (29-31). Recently, in a large study of 45,449

Table 3. Multivariate proportional hazards Cox model for DFS in the validation cohort

		HR (95% CI)	P
Age	>70	1.27 (0.97–1.66)	0.08
CEA level	<1.30 ng/mL	Ref	<0.0001
	1.30 to 5 ng/mL	1.40 (1.16–1.68)	
	>5 ng/mL	2.69 (1.89–3.82)	
BRAF and MMR status	BRAF ^{WT} /pMMR	Ref	0.09
	BRAF ^{mut} /pMMR	1.11 (0.81–1.51)	
	BRAF ^{WT} /dMMR	0.88 (0.60–1.29)	
	BRAF ^{mut} /dMMR	0.49 (0.27–0.89)	
N stage	N2	2.18 (1.82–2.60)	<0.0001

Abbreviations: dMMR, deficient mismatch repair; mut, mutated; N stage, nodal stage according to the TNM classification; pMMR, proficient mismatch repair; WT, wild type.

patients with stage I and II colon cancer not receiving adjuvant chemotherapy, preoperative CEA level of 2.35 ng/mL was defined as the best cutoff to predict survival (16). The results of these studies suggest that a CEA value of 5 ng/mL is not optimal. We identified considerable DFS and OS heterogeneity in the population with postoperative CEA ≤ 5 ng/mL, providing new data in favor of a lower CEA cutoff in the postoperative setting for stage III colon cancer. Defining a lower cutoff for postoperative CEA will allow to construct more accurate prediction models and will better stratify patients for adjuvant treatment.

Nicholson and colleagues showed that the sensitivity of a CEA level of 2.5 ng/mL is better than the standard 5 ng/mL value (82%

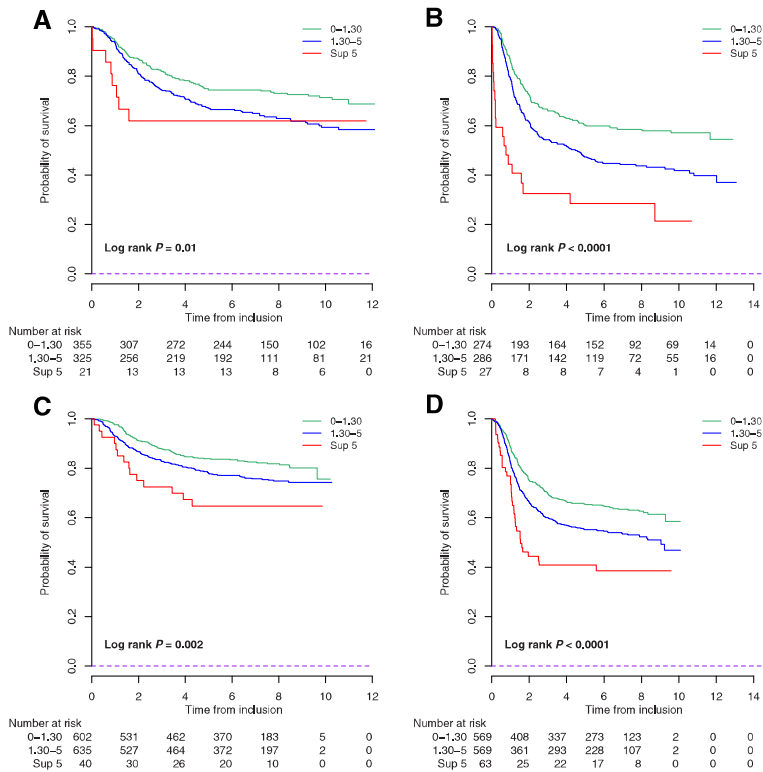
vs. 71%), but with rather low specificity (80% vs. 88%; ref. 32). Nevertheless, in adjuvant colorectal cancer, higher sensitivity is more relevant for detecting disease recurrence. If the sensitivity is good for a lower CEA cutoff, the question about reproducibility of the measures below 5 ng/mL has to be addressed. Analytic sensitivity of most automated immunoassay systems for measuring CEA is under 1 ng/mL. For instance, analytic sensitivity of the Abbott immunoassay used in our center is 0.5 ng/mL, whereas for Beckmann immunoassays, which are also widely used, is less than 0.7 ng/mL. Thus, reliable management decisions can be made with CEA levels below 5 ng/mL.

Recently, molecular and immunologic prognostic factors in predicting colon cancer patients' prognosis have been identified (33–36). In our study, the postoperative CEA performance seems similar to these molecular/immunologic scores for DFS and OS risk stratification in patients with stage III colon cancer. These observations and the fact that CEA is a low-cost biological tumor marker reinforce its interest.

With the breakthrough of liquid biopsy, circulating tumor DNA (ctDNA) has been assessed in early-stage colon cancer (37–39). Very high prognostic value of ctDNA for OS and RFS has been showed in very small cohorts (37, 39). However, no study to date has assessed the prognostic value of ctDNA in stage III colon cancer. Currently, three studies are ongoing (NCT03416478, NCT02842203, NCT03312374). Our results suggest that prognostic value of ctDNA should absolutely be evaluated together

Figure 3.

Association between CEA and DFS within stage III colon cancer risk groups. Kaplan–Meier survival curves for DFS of stage III colorectal cancer patients in the MOSAIC low-risk (T3N1) group (A), in the MOSAIC high-risk (T4 or N2) group (B), in the PETACC-8 low-risk group (C), and in the PETACC-8 high-risk group according to the new CEA levels (C: ≤1.30 ng/mL, 1.30–5 ng/mL, >5 ng/mL). P values were estimated using the log-rank test.



with CEA as a covariate in multivariate analysis. Similarly, Lu and colleagues showed that combining postoperative CEA levels assessment with the presence of postoperative circulating tumor cells may be valuable tool in predicting early relapse and survival rate in patients with stage II and III colon cancer (18). Such combination was also found to be of interest for better disease prediction in the study of non-small cell lung cancer (40).

We identified the additional prognostic value of postoperative CEA for survival endpoints among conventional TNM risk classification. Recently, the results of the IDEA study suggested that shorter adjuvant chemotherapy could be administered in the subgroup of patients with T3/N1 disease (7–10). However, given that these results are still debated, postoperative CEA level might assist in clinical decision-making in this setting.

Although prediction tools already exist in localized colon cancer (41–44), these do not include postoperative CEA level. In the light of our results, a careful consideration of this measurement should be made in scoring tools to predict DFS and OS for localized colon cancer in the future.

Our study has several strengths. We evaluated postoperative CEA in adjuvant stage III colon cancer that was of more interest than preoperative CEA. This study was constructed in the framework of two large international multicenter phase III trials offering a broad spectrum of reliable parameters including molecular status at inclusion and the largest postoperative CEA assessment data in stage III colon cancer. Moreover, patients in these studies were treated with 5-fluorouracil and leucovorin in combination with oxaliplatin in majority of cases (50%). We built our analysis in a rigorous methodologic framework respecting the transparent reporting of the multivariate model TRIPOD statement (25). Showing the same results for both cohorts, we confirmed the robustness of our data.

The current study also has some limitations. Given that CEA level was an inclusion criterion in the MOSAIC and PETACC-8 trials, this analysis includes a low number of patients with high CEA. Importantly, CEA level may be affected by factors that were not available in our cohorts, mainly smoking status and other comorbidities (45). However, the robustness and the magnitude of the association observed support the notion of a cancer-derived effect on the outcomes. A second potential limitation is that in our study CEA assessment is established within different ranges, according to each manufacture, and most of the time low threshold values are considered as insufficiently sensitive. The large DFS and OS differences between subgroups of patient with CEA <5 ng/mL suggest that the findings apply across CEA values obtained from a broad range of laboratories. Despite the heterogeneity of the adjuvant regimens received and the multiples laboratories that performed the CEA measurement, postoperative CEA identified in the overall population was still relevant in all subgroups.

To conclude, in these two large cohorts, we showed that the postoperative CEA level is a highly independent prognostic factor for DFS and OS. We further confirmed that patients with CEA ≤5

ng/mL should not be considered as a single-risk population. These results support a routine postoperative CEA testing, suggesting its future interest for optimizing clinical trials design and for defining risk-adapted and personalized strategies for stage III colon cancer management.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

G. Folprecht reports receiving a commercial research grant from Merck-Serono (for a clinical study), has received speakers bureau honoraria from Merck-Serono, Roche/Genentech, Sanofi-Aventis, Lilly, Amgen, and is a consultant/advisory board member for Merck-Serono, Bayer, MSD, BMS, Shire, Roche/Genentech, Servier, Laboratoire HRA Pharma, Amgen, Mundipharma. J. Tabernero is a consultant/advisory board member for Array Biopharma, AstraZeneca, Bayer, BeiGene, Boehringer Ingelheim, Chugai, Genentech, Inc., Genmab A/S, Halozyme, Imugene Limited, Inflection Biosciences Limited, Ipsen, Kura Oncology, Lilly, MSD, Menarini, Merck Serono, Merrimack, Merus, Molecular Partners, Novartis, Peptomyc, Pfizer, Pharmacytics, ProteoDesign SL, Rafael Pharmaceuticals, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Sanofi, SeaGen, Seattle Genetics, Servier, Symphogen, Taiho, VCN Biosciences, Biocartis, Foundation Medicine, HaliDX SAS, and Roche Diagnostics. T. Hickish is a medical director at IQHealth Tech and is a consultant/advisory board member for Sobi International and Lilly. T. André has received speakers bureau honoraria from Sanofi and is a consultant/advisory board member for Roche. D. Vernerey is a consultant/advisory board member for OSE, HaliDX, Pfizer, and Jansen. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Auclin, J. Taieb, C. Louvet, J. Tabernero, D. Vernerey
Development of methodology: E. Auclin, J. Taieb, D. Vernerey
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): C. Lepage, T. Aparicio, R. Faroux, E. Mini, G. Folprecht, R. Salazar, M. Banzi, C. Louvet, J.-L. Van Laethem, J. Tabernero, T. Hickish, A. de Gramont, T. André
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Auclin, J. Taieb, E. Mini, R. Salazar, M. Benetkiewicz, J. Tabernero, T. André, D. Vernerey
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Auclin, J. Taieb, C. Lepage, T. Aparicio, R. Faroux, E. Mini, G. Folprecht, R. Salazar, M. Benetkiewicz, C. Louvet, J.-L. Van Laethem, J. Tabernero, A. de Gramont, T. André, D. Vernerey
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): J. Tabernero, T. André
Study supervision: J. Tabernero, D. Vernerey
Other (providing final approval of the version to be submitted): M. Benetkiewicz

Acknowledgments

We thank Pr. Jean-Paul Feugas and Dr. Laurent Bermont for their help regarding the automated immunoassay systems.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received August 6, 2018; revised November 16, 2018; accepted April 16, 2019; published online July 1, 2019.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68:7–30.
2. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol* 2014;25:1650–6.
3. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet Lond Engl* 1995;345:939–44.
4. 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.
5. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011;29:3768–74.

6. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465–71.
7. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2018;378:1177–88.
8. André T, Vernerey D, Mineur L, Bennouna J, Desrame J, Faroux R, et al. 3 versus 6 months of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer: disease-free survival results from a randomized, open-label, International Duration Evaluation of Adjuvant (IDEA) France, phase III trial. *J Clin Oncol* 2018;36:1469–77.
9. Sobrero A, Lonardi S, Rosati G, Di Bartolomeo M, Ronzoni M, Pella N, et al. FOLFOX or CAPOX in stage II to III colon cancer: efficacy results of the Italian Three or Six Colon Adjuvant Trial. *J Clin Oncol* 2018;36:1478–85.
10. Iveson TJ, Kerr RS, Saunders MP, Cassidy J, Hollander NH, Tabernero J, et al. 3 versus 6 months of adjuvant oxaliplatin-fluoropyrimidine combination therapy for colorectal cancer (SCOT): an international, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2018;19:562–78.
11. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121:439–62.
12. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965;122:467–81.
13. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005;23:338–51.
14. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24(Suppl 6):vi64–vi72.
15. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiyah M, Mahan M, Pragatheeswarar KD, Pingpank JF, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:689–97.
16. Margalit O, Mamtani R, Yang YX, Reiss KA, Golan T, Halpern N, et al. Assessing the prognostic value of carcinoembryonic antigen levels in stage I and II colon cancer. *Eur J Cancer* 2018;94:1–5.
17. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of preoperative and postoperative serum carcinoembryonic antigen and colon cancer outcome. *JAMA Oncol* 2018;4:309–15.
18. Lu CY, Uen YH, Tsai HL, Chuang SC, Hou MF, Wu DC, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer* 2011;104:1178–84.
19. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Heo SJ, Kim JH, et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a prognostic factor for recurrence and survival after curative resection followed by adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2017;24:227–35.
20. André T, de Gramont 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.
21. Taieb J, Tabernero 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 colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:862–73.
22. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials* 1996;17:343–6.
23. Royston P, Altman DG. Regression using fractional polynomials of continuous covariates: Parsimonious parametric modelling. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat* 1994;43:429–67.
24. Royston P, Sauerbrei W. Multivariable model - building: a pragmatic approach to regression analysis based on fractional polynomials for modelling continuous variables. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Multivariable+Model+Building%3A+A+Pragmatic+Approach+to+Regression+Analysis+based+on+Fractional+Polynomials+for+Modelling+Continuous+Variables-p-9780470028421>.
25. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JP, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 2015;162:W1–73.
26. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal* 2003;43:121–37.
27. Harrell FE, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996;15:361–87.
28. Rubin D. Introduction. In: *Multiple imputation for nonresponse in surveys*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 1987. p. 1–26.
29. Moreno García V, Cejas P, Blanco Codesido M, Feliu Batlle J, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:741–8.
30. Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg* 1999;23:721–6.
31. Giessen-Jung C, Nagel D, Glas M, Spelsberg F, Lau-Werner U, Modest DP, et al. Preoperative serum markers for individual patient prognosis in stage I-III colon cancer. *Tumour Biol* 2015;36:7897–906.
32. Nicholson BD, Shinkins B, Mant D. Blood measurement of carcinoembryonic antigen level for detecting recurrence of colorectal cancer. *JAMA* 2016;316:1310–1.
33. Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol* 2013;31:4512–9.
34. Galon J, Mlecnik B, Marliot F, Ou FS, Bifulco CB, Lugli A, et al. Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *J Clin Oncol* 2016;34(suppl 15; abstr 3500):3500.
35. Emile JF, Malicot KL, Tabernero J, Mini E, Folprecht G, Van Laethem JL, et al. Validation of the prognostic impact of lymphocyte infiltration (LI) in patients (pts) with stage III colon cancer (CC) treated with adjuvant FOLFOX+/- cetuximab: a PETACC8 translational study. *J Clin Oncol* 2016;34(suppl 4S; abstr 553):553.
36. 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.
37. Fan G, Zhang K, Yang X, Ding J, Wang Z, Li J. Prognostic value of circulating tumor DNA in patients with colon cancer: systematic review. *PLoS One* 2017;12:e0171991.
38. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 2002;100:542–8.
39. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra92.
40. Chen X, Wang X, He H, Liu Z, Hu JF, Li W. Combination of circulating tumor cells with serum carcinoembryonic antigen enhances clinical prediction of non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2015;10:e0126276.
41. Weiser MR, Landmann RG, Kattan MW, Gonen M, Shia J, Chou J, et al. Individualized prediction of colon cancer recurrence using a nomogram. *J Clin Oncol* 2008;26:380–5.
42. Weiser MR, Gonen M, Chou JF, Kattan MW, Schrag D. Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J Clin Oncol* 2011;29:4796–802.
43. Renfro LA, Grothey A, Xue Y, Saltz LB, André T, Twelves C, et al. ACCENT-based web calculators to predict recurrence and overall survival in stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106. doi: 10.1093/jnci/dju333.
44. Nagata H, Ishihara S, Oba K, Tanaka T, Hata K, Kawai K, et al. Development and validation of a prediction model for postoperative peritoneal metastasis after curative resection of colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2018;25:1366–73.
45. Alexander JC, Silverman NA, Chretien PB. Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels. *JAMA* 1976;235:1975–9.

4.3 Du facteur pronostique au score pronostique intégratif

4.3.1.1 Référence bibliographique

Precise analysis of prognostic factors in stage III colon cancer and construction of a prognostic score : post-hoc analysis of the PETACC-8 study.

Manuscrit en cours de préparation.

Auclin E, Vernerey D, Lepage C, Mini E, Folprecht G, Salazar R, Van Laethem JL, Tabernero J, Blons H, Laurent-Puig P, Taieb J.

4.3.1.2 Introduction

Dans les parties précédentes de ce travail de thèse, nous avons vu que les cancers du colon de stade III étaient sur-traités par chimiothérapie adjuvante. En effet, seuls 20% bénéficient de cette dernière au prix de neuropathies périphériques séquellaires de l'oxaliplatine chez environ 10% des patients. Les bénéfices des thérapies ciblées montrés au stade métastatique n'ont pas été translatés au stade III. C'est le cas du cetuximab, anti-EGFR, dont l'étude PETACC-8 n'a pas montré de bénéfice à son association à la chimiothérapie adjuvante par FOLFOX.

A l'ère de la médecine de précision, plusieurs facteurs pronostiques ont été découverts dans le cancer du colon de stade III, et certains outils ont été créés pour aider le clinicien dans l'indication d'administrer ou non une chimiothérapie adjuvante. Dans cette perspective, des scores utilisant des données cliniques, pathologiques et moléculaires ont été développés. Des signatures moléculaires telles que l'Oncotype Dx Colon® sont efficaces pour déterminer des groupes de patients à risques différents de récurrence mais ils sont peu discriminant, et leur capacité à prédire le bénéfice de la chimiothérapie n'a pas été réellement démontré.

Par ailleurs, trois scores ont été développés à partir de larges études de phase III : ACCENT, Numeracy et le score MSKCC. Leurs performances en terme de pronostic sont moins importantes que ce que l'on pourrait espérer. Par exemple, le score créé grâce à la base ACCENT a un c-index de 0.66 pour la survie globale. Cette efficacité modérée est certainement liée à l'absence de considération des paramètres moléculaires lors de l'établissement de ces scores. Dienstmann et al ont montré récemment que l'inclusion des

variables moléculaires améliorerait significativement l'estimation du pronostic des patients atteints de cancer du colon de stades II et III.

L'objectif de cette étude était de développer et valider un score pronostique de la SSM et de la SG, basé sur les caractéristiques cliniques pathologiques biologiques et moléculaires, dans les cancers du colon de stade III. L'objectif secondaire était d'évaluer l'apport des données moléculaires dans l'estimation du pronostic des patients atteints d'un cancer du colon de stade III.

4.3.1.3 Méthodologie

4.3.1.3.1 Patients

Les patients atteints d'un cancer du colon de stade III ayant participé à l'étude de phase III PETACC-8 (NCT00265811) ont été inclus.

4.3.1.3.2 Analyse statistique

Le critère de jugement principal était la SSM, définie comme le temps entre la randomisation et la rechute (locale ou à distance) ou l'occurrence d'un deuxième cancer colique ou le décès. En critère de jugement secondaire nous avons choisi la SG, définie comme le temps entre la randomisation et le décès du patient. Les patients n'ayant pas fait l'événement étaient censurés à la date de leur dernier suivi. La SSM et la SG ont été estimées avec la méthode Kaplan Meier et des taux de survie à des temps définis ont été donnés avec leurs intervalles de confiance à 95%. La durée médiane de suivi a été calculée avec la méthode du *reverse* Kaplan Meier.

La relation entre les critères de jugement et les variables continues a été évaluée par la méthode des splines cubiques restreints et vérifiée par les polynômes fractionnaires multiples afin d'utiliser la meilleure transformation possible.

La valeur pronostique des différentes variables sur la survie a d'abord été testée par un modèle de Cox univarié. Les variables atteignant la significativité en univarié ou connues pour avoir un impact pronostique majeur ont été réunies dans un modèle de Cox multivarié. La discrimination du modèle de Cox a été évaluée grâce au c-index et la calibration a été vérifiée graphiquement à 3 et 6 ans. Une validation interne a été obtenue grâce à la méthode du *bootstrap*.

- L'application du modèle pronostique a été faite de deux façons :
- Approche individuelle : construction d'un nomogramme pour chaque critère de jugement.
 - Approche populationnelle : création d'un score pronostique à partir des coefficients β du modèle de Cox.

L'apport des variables moléculaires aux facteurs pronostiques classiques a été évalué à l'aide du c-index précédemment décrit. Plusieurs modèles ont ainsi été créés : clinique (Clin), clinique + pathologique (Clin.path), Clin.path + biologique (Clin.path.bio), et Clin.path.bio + moléculaire (Clin.path.bio.mol). Pour chacun de ces modèles le c-index a été évalué et la différence entre les différents modèles a été estimée.

Enfin, le caractère prédictif du score pronostique pour l'efficacité du cetuximab en situation adjuvante a été exploré à l'aide d'un terme d'interaction dans un modèle de Cox d'une part, et graphiquement par l'intermédiaire de courbes de Kaplan Meier d'autre part.

4.3.1.4 Résultats

4.3.1.4.1 Caractéristiques de la population de l'étude

Parmi les 2559 patients inclus dans l'étude PETACC-8, nous n'avons pas inclus 7 patients qui avaient une maladie métastatique à l'inclusion. Les caractéristiques moléculaires (mutations *RAS* et *BRAF*, statut MSI) étaient disponibles chez 1637 patients (Figure 1).

Les caractéristiques des patients sont décrites dans le Tableau 1.

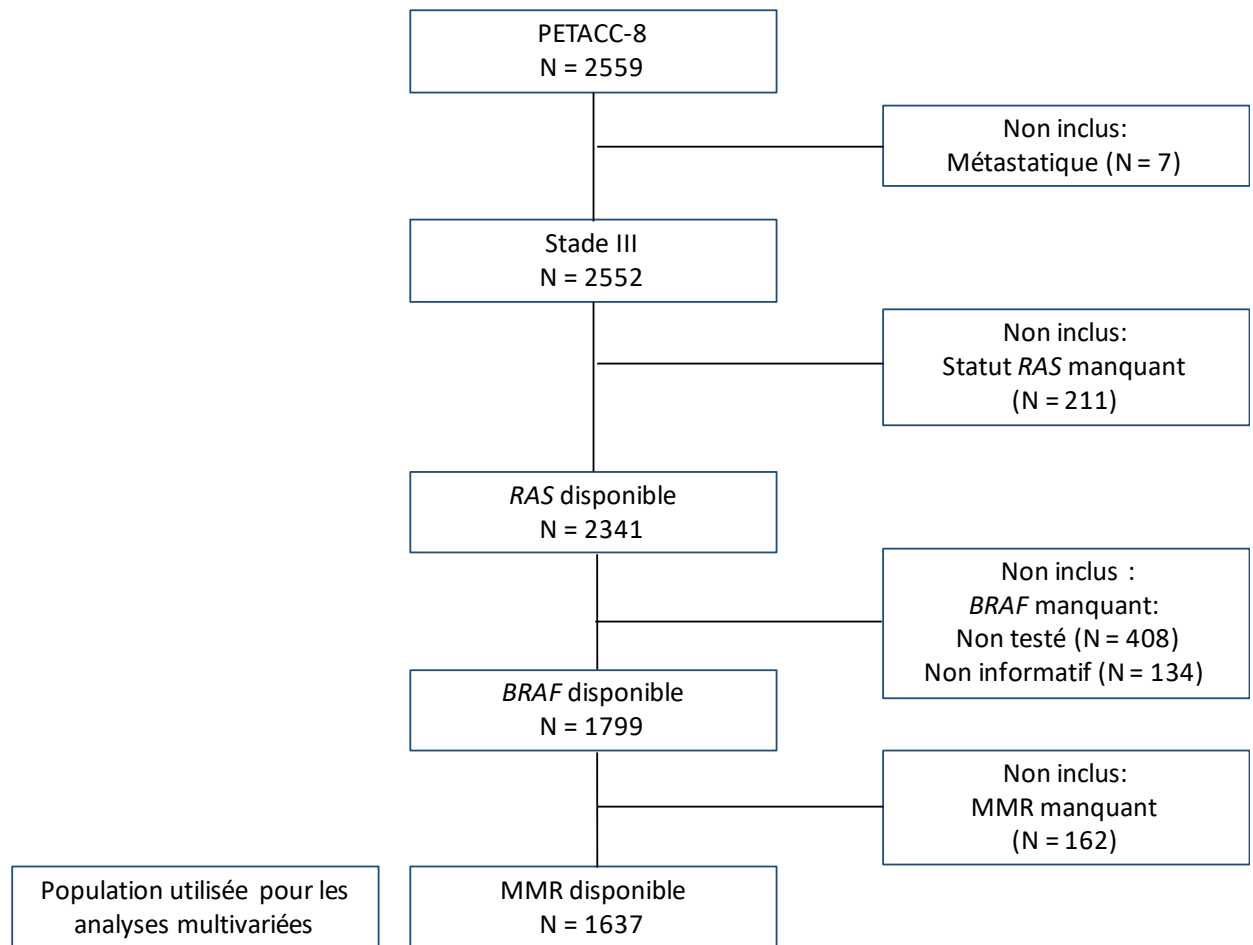


Figure 1 : diagramme de flux des patients de l'étude

Variable		Population de stade III N = 2552
Age (années)	> 70	269 (10.54%)
Sexe	Femme	1091 (42.75%)
Bras de traitement	FOLFOX	1277 (50.04%)
	FOLFOX cetuximab	1275 (49.96%)
Localisation tumorale	Gauche	1549 (61.64%)
	Droite	964 (38.36%)
	Manquant	39
Indice de masse corporelle	Normal	1136 (45.17%)
	Maigreur	51 (2.03%)
	Surpoids	920 (36.58%)
	Obèse	408 (16.22%)
	Manquant	37
Laparotomie	Oui	1791 (70.21%)
	Manquant	1
Grade histologique	G1/2	2051 (81.39%)
	G3/4	469 (18.61%)
	Manquant	32
Stade T	pT1/2	266 (10.44%)
	pT3	1765 (69.24%)
	pT4	518 (20.32%)
	Manquant	3
Stade N	pN1	1595 (62.5%)
	pN2	957 (37.5%)
Groupe de risque selon TNM	Elevé (T4 et/ou N2)	1234 (48.39%)
	Faible (T3N1)	1316 (51.61%)
	Manquant	2
Emboles lymphatiques	Présents	1144 (56.50%)
	Manquant	527
Emboles vasculaires	Présents	1125 (44.1%)
	Manquant	1
Occlusion intestinale		416 (16.3%)
Perforation intestinale		121 (4.74%)
Performance status	0	2000 (82.1%)
	≥ 1	436 (17.9%)
	Manquant	116
ACE, ng/mL	Médiane (IQR°)	1.4 (0.9-2.2)
	> 5 ng/mL	102 (4.11%)
	Manquant	72
Statut RAS	Muté	970 (51.54%)
	Manquant	670
Statut BRAF et MMR	pMMR BRAF ^{WT}	1308 (81.7%)

dMMR <i>BRAF</i> ^{mut}	64 (4%)
dMMR <i>BRAF</i> ^{WT}	103 (6.43%)
pMMR <i>BRAF</i> ^{mut}	126 (7.87%)
NA	951

Tableau 1 : caractéristiques de la population de l'étude PETACC-8 ayant un cancer du colon de stade III.

4.3.1.4.2 Construction des modèles univariés et multivariés

Les variables disponibles ont d'abord été testées en univarié pour rechercher une association avec les deux critères de jugement. Suite à cette analyse univariée, nous avons construit plusieurs modèles dans le but d'investiguer l'apport de chaque groupe de variables pour le pronostic des patients :

- Modèle clinique (Clin)
- Modèle clinique et pathologique (Clin.path)
- Modèle clinique, pathologique et biologique (Clin.path.bio)
- Modèle clinique, pathologique, biologique et moléculaire (Clin.path.bio.mol)

Ces modèles sont résumés dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2 : modèles de Cox multivariés pour la survie sans maladie

Clinique (n= 2434, n événements = 749)	HR (IC95%)	P
Age > 70 ans	1.28 (1.03-1.58)	0.02
Sexe masculin	1.23 (1.06-1.43)	0.007
Indice de masse corporelle		
Normal	1	
Maigre	1.90 (1.24-2.91)	0.01
Surpoids	1.04 (0.89-1.23)	
Obèse	1.22 (0.99-1.49)	
Laparotomie	1.16 (0.98-1.36)	0.08
Occlusion intestinale	1.28 (1.06-1.53)	0.009
Perforation intestinale	1.73 (1.30-2.29)	<0.0001
Performance status ≥1	1.30 (1.09-1.55°)	0.003

Clinique et pathologique (N=2051, n événements=625)	HR (IC95%)		P
Age > 70 ans	1.40 (1.12-1.76)		0.004
Sexe masculin	1.26 (1.07-1.49)		0.006
Indice de masse corporelle			
Normal	1		
Maigre	1.65 (1.03-2.65)		0.05
Surpoids	1.06 (0.89-1.27)		
Obèse	1.26 (1.01-1.58)		
Laparotomie	1.17 (0.98-1.40)		0.09
Occlusion intestinale	1.07 (0.87-1.31)		0.52
Perforation intestinale	1.20 (0.87-1.66)		0.26
Performance status ≥1	1.28 (1.06-1.55)		0.01
Grade histologique G3/4	1.25 (1.03-1.51)		0.02
pT			
pT1-2	1		
pT3	1.68 (1.18-2.39)		<0.0001
pT4	3.20 (2.20-4.65)		
pN2	1.68 (1.43-1.98)		<0.0001
Emboles lymphatiques et/ou vasculaires	1.01 (0.85-1.20)		0.92

Clinique, pathologique et biologique (N=1976 n événements=601)	HR (IC95%)	p
Age > 70 ans	1.37 (1.09-1.74)	0.008
Sexe masculin	1.32 (1.11-1.57)	0.002
Indice de masse corporelle		
Normal	1	0.02
Maigreur	1.75 (1.092.82)	
Surpoids	1.09 (0.91-1.32)	
Obèse	1.31 (1.04-1.64)	
Laparotomie	1.12 (0.93-1.35)	0.23
Occlusion intestinale	1.08 (0.88-1.33)	0.48
Perforation intestinale	1.28 (0.92-1.78)	0.13
Performance status ≥1	1.24 (1.02-1.51)	0.03
Grade histologique G3/4	1.17 (0.96-1.42)	0.13
pT		
pT1-2	1	<0.0001
pT3	1.58 (1.10-2.27)	
pT4	3.05 (2.08-4.47)	
pN2	1.69 (1.43-1.99)	<0.0001
Emboles lymphatiques et/ou vasculaires	0.99 (0.83-1.19)	0.96
Phosphatases alcalines	1.002 (1-1.003)	0.04
Hémoglobine	1.01 (0.95-1.07)	0.86
Plaquettes	1 (1-1)	0.32
ACE (transformation racine carrée)	1.45 (1.28-1.64)	<0.0001

Clinique, pathologique, biologique et moléculaire (N=1243 n événements=384)	HR (IC95%)	Bootstrap IC95%	p
Age > 70 ans	1.18 (0.87-1.60)	0.85-1.69	0.28
Sexe masculin	1.27 (1/02-1.59)	1.02-1.63	0.03
Indice de masse corporelle			
Normal	1		0.06
Maigreur	1.65 (0.88-3.08)	0.71-3.49	
Surpoids	0.95 (0.75-1.20)	0.73-1.20	
Obèse	1.31 (0.99-1.74)	0.96-1.75	
Laparotomie	1.06 (0.83-1.34)	0.82-1.34	0.65
Occlusion intestinale	1.09 (0.84-1.42)	0.81-1.40	0.50
Perforation intestinale	1.16 (0.76-1.75)	0.73-1.82	0.50
Performance status ≥1	1.28 (1.01-1.62)	0.98-1.64	0.04
Grade histologique G3/4	1.20 (0.93-1.54)	0.91-1.58	0.15
pT			
pT1-2	1		<0.0001
pT3	1.59 (0.99-2.56)	1.03-2.71	
pT4	3.17 (1.93-5.21)	2.00-5.65	
pN2	1.78 (1.45-2.20)	1.45-2.27	<0.0001
Emboles lymphatiques et/ou vasculaires	1.02 (0.81-1.29)	0.81-1.28	0.86
Phosphatases alcalines	1.002 (1-1.004)	0.99-1.004	0.02
Hémoglobine	0.98 (0.91-1.06)	0.90-1.06	0.62
Plaquettes	1 (0.99-1.00)	0.99-1.06	0.72
ACE (transformation racine carrée)	1.50 (1.30-1.72)	1.26-1.95	<0.0001
Mutation <i>RAS</i>	1.56 (1.26-1.94)	1.23-1.97	0.0001
Status MMR/ <i>BRAF</i>			
pMMR/ <i>BRAF</i> wt	1		0.006
dMMR/ <i>BRAF</i> wt	1.02 (0.67-1.56)	0.63-1.55	
dMMR/ <i>BRAF</i> mut	0.40 (0.18-0.93)	0.11-0.85	
pMMR/ <i>BRAF</i> mut	1.62 (1.12-2.33)	1.04-2.32	

Tableau 3 : modèles de Cox multivariés pour la survie globale

Clinique (n= 2399, n événements= 540)	HR (IC95%)	P
Age > 70 ans	1.53 (1.20-1.93)	<0.0001
Sexe masculin	1.33 (1.11-1.59)	0.002
Indice de masse corporelle		
Normal	1	
Maigre	2.09 (1.29-3.41)	0.01
Surpoids	1.08 (0.89-1.31)	
Obèse	1.27 (1.00-1.61)	
Localisation tumorale, colon droit	1.29 (1.08-1.53)	0.004
Laparotomie	1.27 (1.04-1.55)	0.02
Occlusion intestinale	1.29 (1.04-1.60)	0.02
Perforation intestinale	1.67 (1.20-2.33)	0.003
Performance status ≥1	1.46 (1.19-1.79)	<0.0001
Clinique, pathologique et biologique (N=1976 n événements=601)	HR (IC95%)	p
Age > 70 ans	1.58 (1.24-2.01)	<0.0001
Sexe masculin	1.46 (1.21-1.77)	<0.0001
Indice de masse corporelle		
Normal	1	0.04
Maigre	1.70 (1.02-1.77)	

Clinique et pathologique (N=2368, n événements=532)	HR (IC95%)		P
Age > 70 ans	1.64 (1.30-2.09)		<0.0001
Sexe masculin	1.34 (1.12-1.60)		0.002
Indice de masse corporelle			
Normal	1		
Maigre	1.77 (1.07-2.93)		0.04
Surpoids	1.08 (0.88-1.31)		
Obèse	1.29 (1.02-1.65)		
Localisation tumorale, colon droit	1.16 (0.97-1.38)		0.10
Laparotomie	1.29 (1.05-1.58)		0.01
Occlusion intestinale	1.12 (0.90-1.40)		0.29
Perforation intestinale	1.23 (0.87-1.73)		0.24
Performance status ≥1	1.39 (1.14-1.71)		0.001
Grade histologique G3/4	1.30 (1.05-1.59)		0.01
pT			
pT1-2	1		
pT3	1.84 (1.20-2.82)		<0.0001
pT4	3.49 (2.23-5.45)		
pN2	1.94 (1.63-2.32)		<0.0001
Emboles vasculaires	1.15 (0.96-1.37)		0.12
Clinique, pathologique, biologique et moléculaire (N=1430 n événements=329)	HR (IC95%)	Bootstrap IC95%	p
Age > 70 ans	1.40 (1.03-1.92)	1.02-1.98	0.03
Sexe masculin	1.45 (1.14-1.85)	1.11-1.96	0.003
Indice de masse corporelle			
Normal	1		0.03
Maigre	1.91 (1.01-3.62)	0.90-4.17	

Surpoids	1.12 (0.91-1.37)	
Obèse	1.34 (1.05-1.72)	
Localisation tumorale, colon droit	1.05 (0.87-1.27)	0.60
Laparotomie	1.25 (1.02-1.55)	0.03
Occlusion intestinale	1.12 (0.90-1.41)	0.31
Perforation intestinale	1.23 (0.87-1.75)	0.24
Performance status ≥ 1	1.30 (1.06-1.61)	0.01
Grade histologique G3/4	1.23 (0.99-1.53)	0.06
pT		
pT1-2	1	<0.0001
pT3	1.67 (1.08-2.59)	
pT4	3.19 (2.01-5.05)	
pN2	1.69 1.90 (1.59-2.27)	<0.0001
Emboles vasculaires	1.16 (0.97-1.39)	0.11
ALAT	0.99 (0.98-0.99)	0.005
Hémoglobine	0.97 (0.91-1.04)	0.43
Plaquettes	1 (1-1)	0.10
Neutrophiles	1.00 (0.95-1.06)	0.43
ACE (transformation racine carrée)	1.46 (1.28-1.67)	<0.0001

Surpoids	0.96 (0.74-1.24)	0.72-1.25	
Obèse	1.36 (1.01-1.84)	0.98-1.87	
Localisation tumorale, colon droit	1.02 (0.79-1.31)	0.78-1.35	0.87
Laparotomie	1.17 (0.90-1.52)	0.91-1.56	0.24
Occlusion intestinale	1.17 (0.88-1.55)	0.86-1.54	0.28
Perforation intestinale	1.12 (0.71-1.75)	0.63-1.77	0.62
Performance status ≥ 1	1.36 (1.06-1.75)	1.02-1.76	0.02
Grade histologique G3/4	1.34 (1.02-1.76)	1.00-1.80	0.04
pT			
pT1-2	1		<0.0001
pT3	1.62 (0.92-2.87)	0.97-3.11	
pT4	3.11 (1.72-5.64)	1.83-6.18	
pN2	1.85 1.47-2.33)	1.48-2.41	<0.0001
Emboles vasculaires	1.11 (0.88-1.39)	0.86-1.41	0.39
ALAT	0.99 (0.98-1.00°)	0.98-1.00	0.05
Hémoglobine	0.95 (0.87-1.04)	0.86-1.04	0.26
Plaquettes	1.00 (1.00-1.00)	1.00-1.00	0.09
Neutrophiles	0.99 (0.92-1.06)	0.92-1.07	0.77
ACE (transformation racine carrée)	1.52 (1.31-1.76)	1.28-1.97	<0.0001
Mutation RAS	1.46 (1.15-1.85)	1.13-1.87	0.002
Statut MMR/BRAF			
pMMR/BRAFwt	1		0.004
dMMR/BRAFwt	0.81 (0.49-1.36)	0.44-1.37	
dMMR/BRAFmut	0.39 (0.16-1.00)	0.10-0.89	
pMMR/BRAFmut	1.64 (1.13-2.38)	1.07-2.46	

4.3.1.4.3 Performance du modèle et validation interne

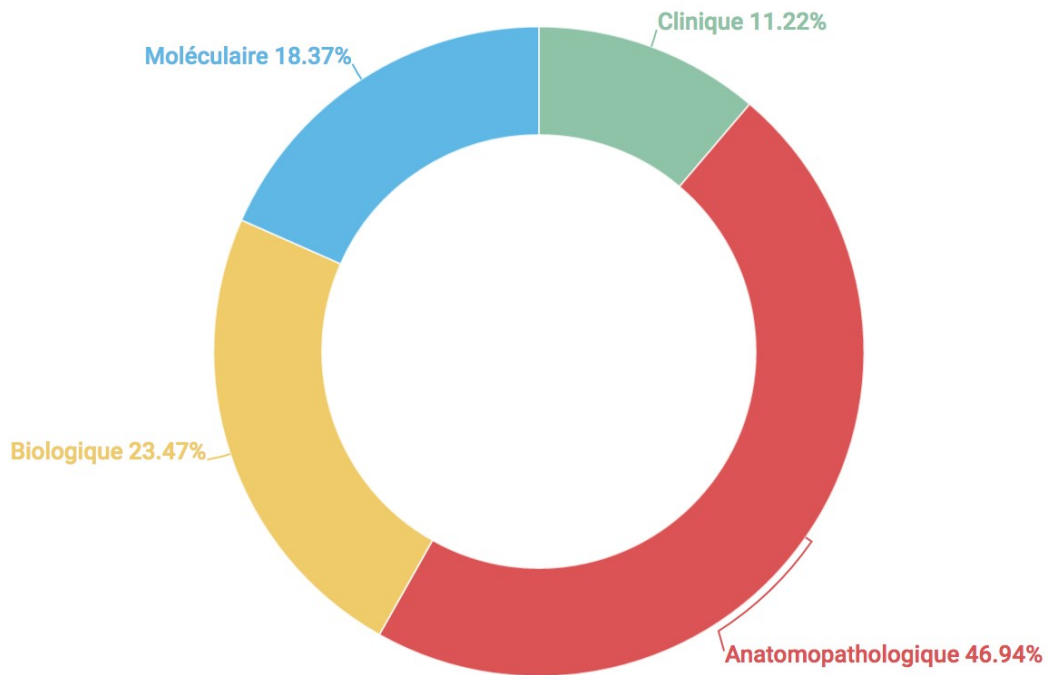
Le modèle multivarié final avait un c-index de 0,72 (IC95% : 0,69-0,75) pour la survie sans maladie et de 0,77 (IC95% : 0,73-0,81) pour la survie globale. L'addition des données pathologiques, biologiques aux variables cliniques permettait à chaque fois d'augmenter le c-index par rapport au modèle précédent. Cependant, l'augmentation du c-index n'était pas significative lors de l'ajout des variables moléculaires au modèle Clin.path.bio. Ces données sont résumées dans le Tableau 4. La part de variance de chaque groupe de variables dans le modèle est représentée dans la Figure 2. Le modèle retenu était le modèle incluant les données de biologie moléculaire (Clin.path.bio.mol).

Par ailleurs, la calibration des modèles Clin.path.bio.mol à 3 et 6 ans était acceptable (Figure 3).

Survie sans maladie			Survie globale		
	c index	95%CI		c index	95%CI
Clin	0.56	0.53-0.60	Clin	0.61	0.56-0.66
Clin.path	0.68	0.65-0.72	Clin.path	0.72	0.68-0.76
Différence	0.12	0.08-0.16	Différence	0.11	0.07-0.16
Clin.path	0.68`	0.65-0.72	Clin.path	0.72	0.68-0.76
Clin.path.bio	0.71	0.68-0.74	Clin.path.bio	0.75	0.72-0.79
Différence	0.02	0.01-0.04	Différence	0.03	0.01-0.05
Clin.path.bio	0.71	0.68-0.74	Clin.path.bio	0.75	0.72-0.79
Clin.path.bio.mol	0.72	0.69-0.75	Clin.path.bio.mol	0.77	0.73-0.81
Différence	0.01	-0.003-0.03	Différence	0.01	-0.004-0.03

Tableau 4 : c-index et différence entre les c-index des modèles multivariés créés pour la survie sans maladie et la survie globale.

A



B

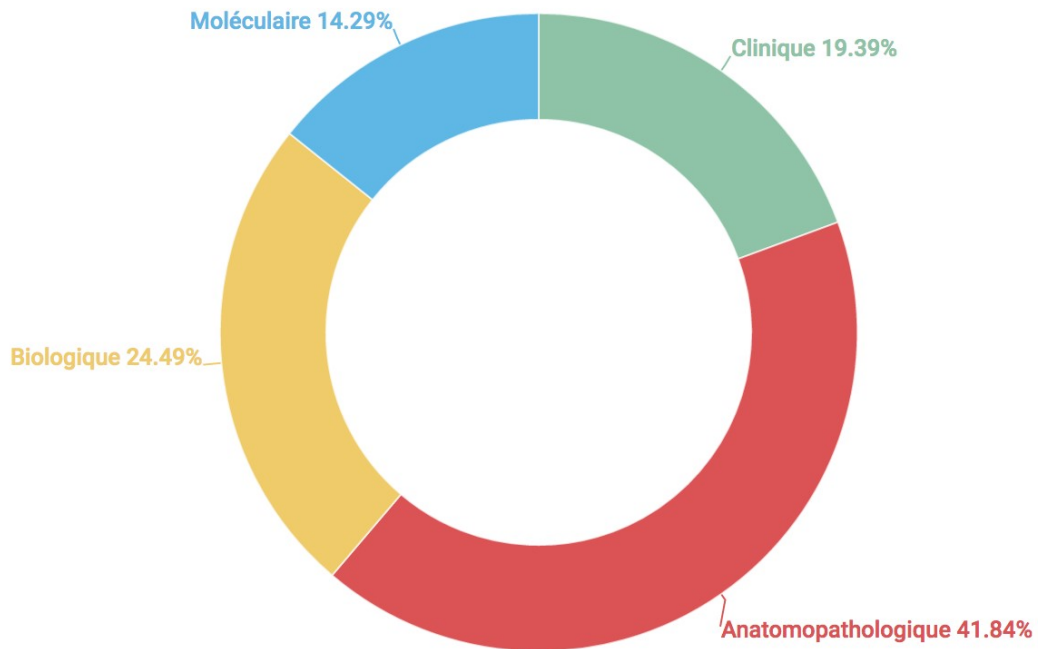


Figure 2 : représentation graphique de la part de la variance dédiée à chaque groupe de variables au sein du modèle multivarié final pour la survie sans maladie (**A**), et pour la survie globale (**B**).

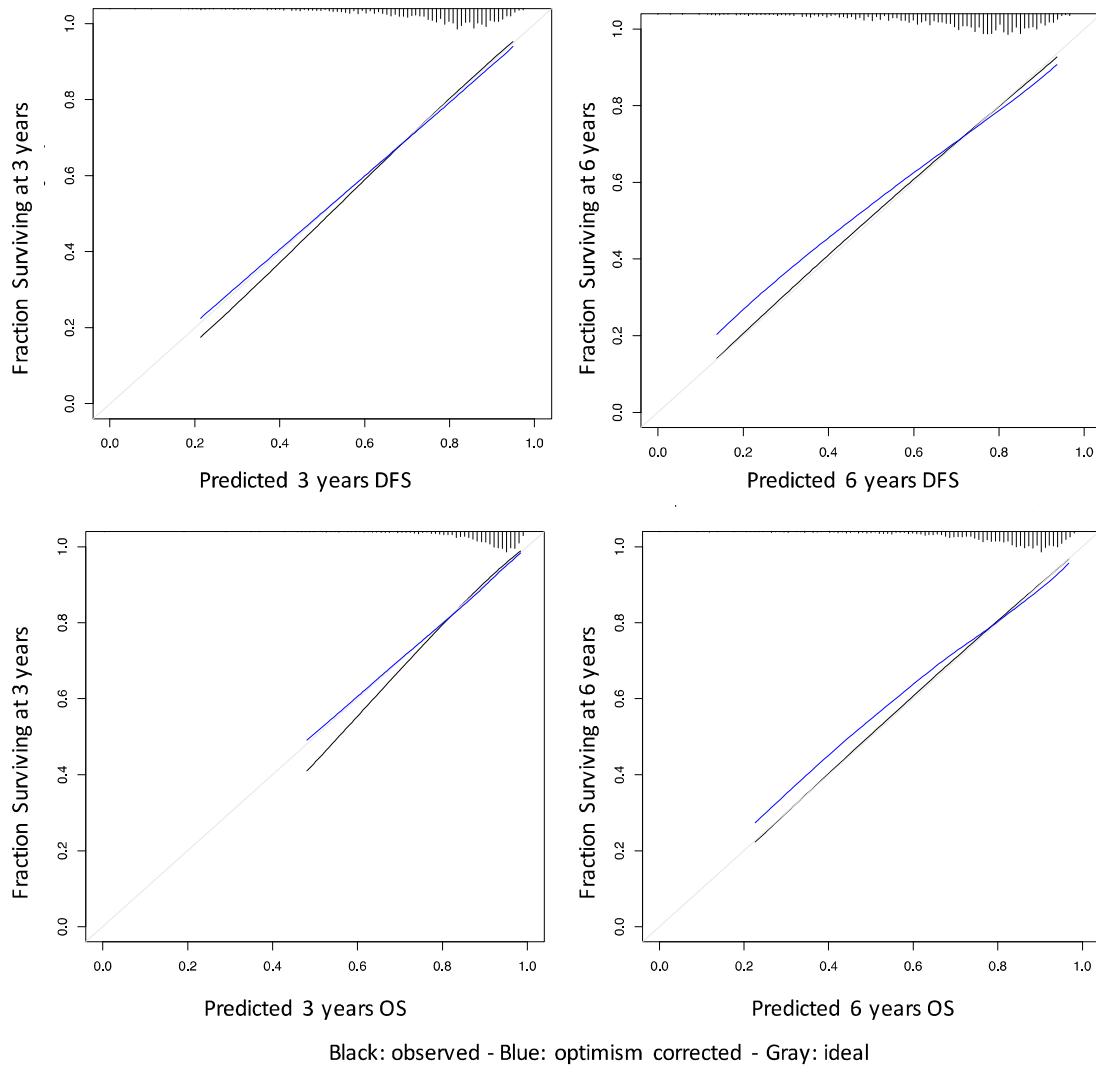


Figure 3 : graphiques de calibration à 3 et 6 ans pour la survie sans maladie et pour la survie globale.

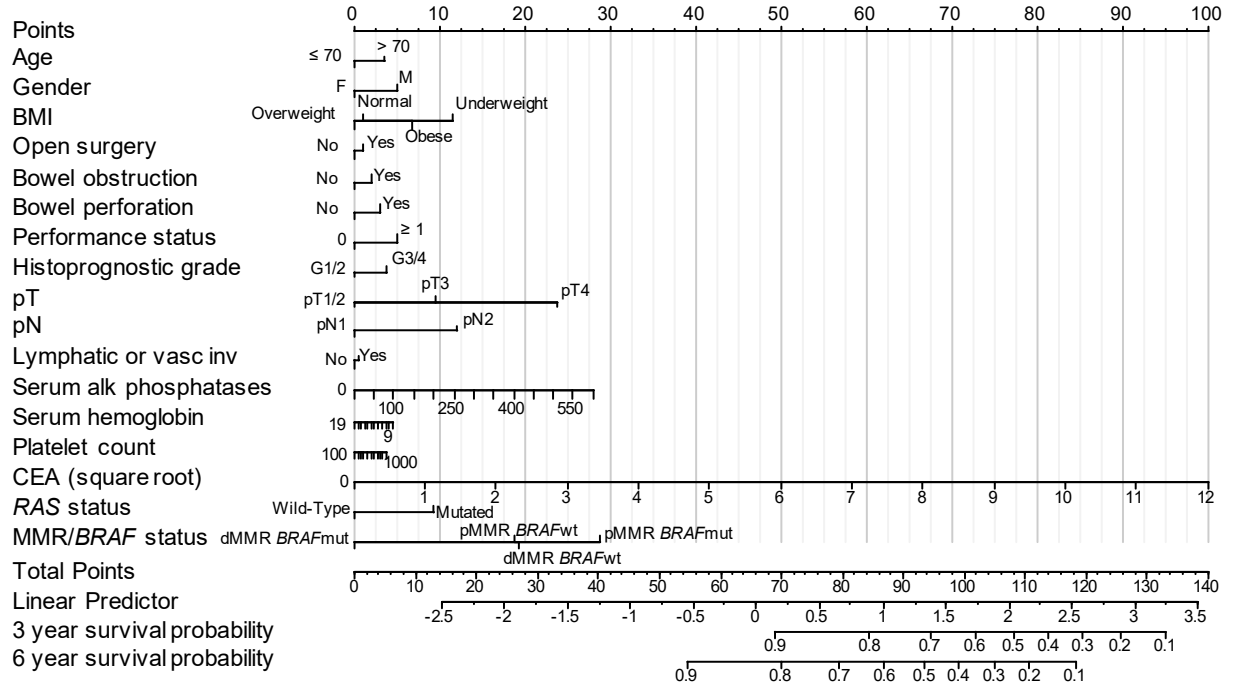
La validation interne à l'aide la procédure de *bootstrap* montrait peu de variations autour du HR, renforçant la robustesse des modèles multivariés finaux.

4.3.1.4.4 Création du nomogramme

A partir des coefficients des variables incluses dans les modèles multivariés (Clin.path.bio.mol), des nomogrammes ont été créés afin de prédire la survie d'un patient donné en fonction de ses caractéristiques.

Les nomogrammes sont montrés dans la Figure 4.

A



B

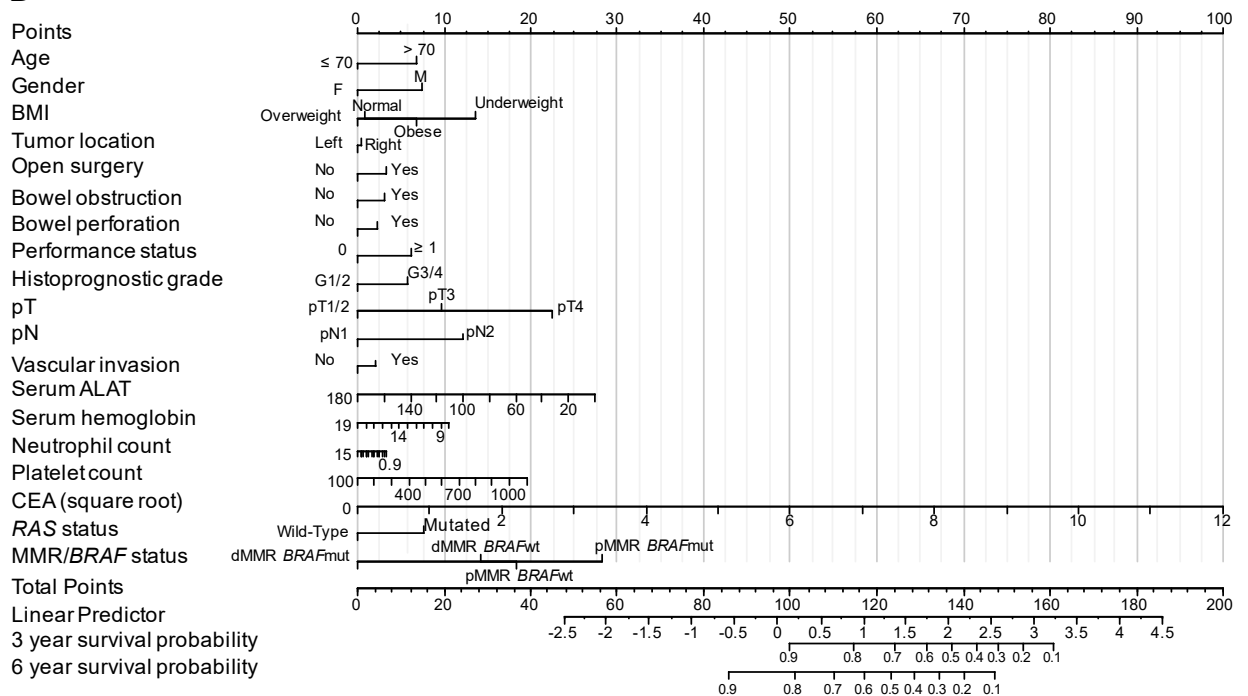


Figure 4 : nomogrammes pour la survie sans maladie (A) et la survie globale (B)

4.3.1.4.5 Création des scores pronostiques

Dans une approche populationnelle, un score a été créé pour chaque critère de jugement. Les variables incluses dans le modèle multivarié final ont été pondérées en fonction de leurs coefficients β du modèle de Cox. La distribution de la variable continue « score » était normale, avec pour la survie sans maladie une moyenne de 166,44 (ET : 14,80) et pour la survie globale une moyenne de 191,96 (ET : 15,39). Une analyse de sensibilité retrouvait pas de différence en terme de pronostic entre les patients inclus dans la construction du score et ceux dont toutes les données n'étaient pas disponibles (Figure 5).

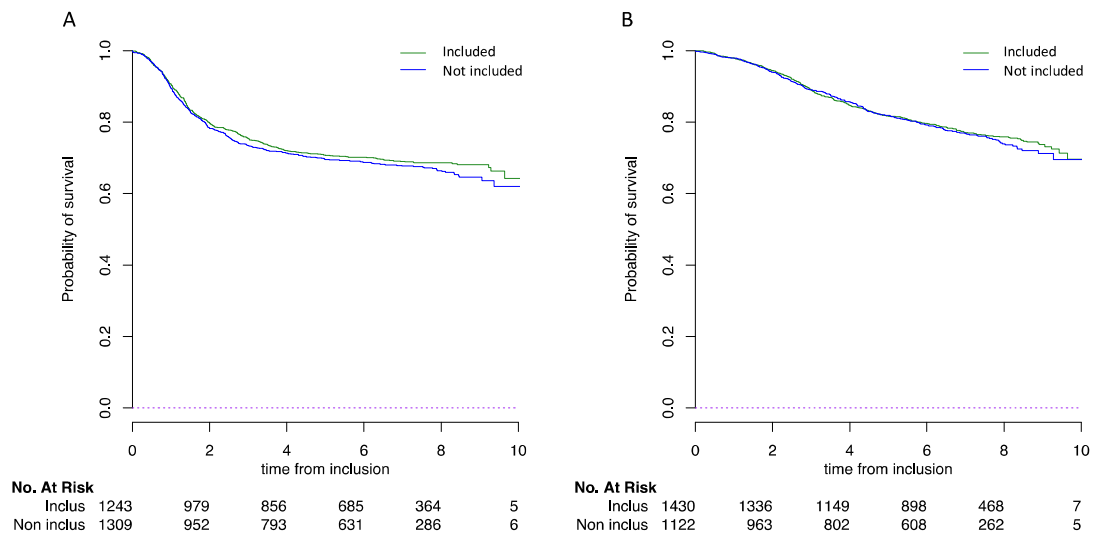


Figure 5 : courbes de Kaplan Meier comparant la survie sans maladie (A) et la survie globale (B) des patients inclus ou non dans la construction du score pronostique.

Les taux de survies sans maladie et globale à 3 et 6 ans des groupes définis par le score étaient significativement différents ($p < 0,0001$ pour les deux critères de jugement), Tableau 5. Les courbes de Kaplan Meier pour les survies sans maladie et globale selon le groupe pronostique sont montrées dans la Figure 6.

	Survie sans maladie			Survie globale		
	3 ans	5 ans	6 ans	3 ans	5 ans	6 ans
Bon	84.3 (81.6-87.2)	80.1 (77.1-83.3)	79.2 (76.-82.5)	94.3 (92.7-96.0)	89.1 (86.9-91.4)	87.5 (85.1-90.0)
Intermédiaire	70.2 (66.0-74.6)	65.0 (60.6-69.6)	64.7 (60.3-69.4)	86.5 (83.6-89.6)	76.7 (73.0-80.5)	74.6 (70.8-78.6)
Elevé	54.0 (46.7-62.3)	48.8 (41.6-57.3)	48.8 (41.6-57.3)	73.4 (67.2-80.2)	65.2 (58.5-72.7)	61.3 (54.4-69.0)

Tableau 5 : taux de survie à 3 et 6 ans pour les critères de jugement selon le groupe à risque défini à l'aide des scores pronostiques créés ($p < 0,0001$ pour les 2 critères de jugement).

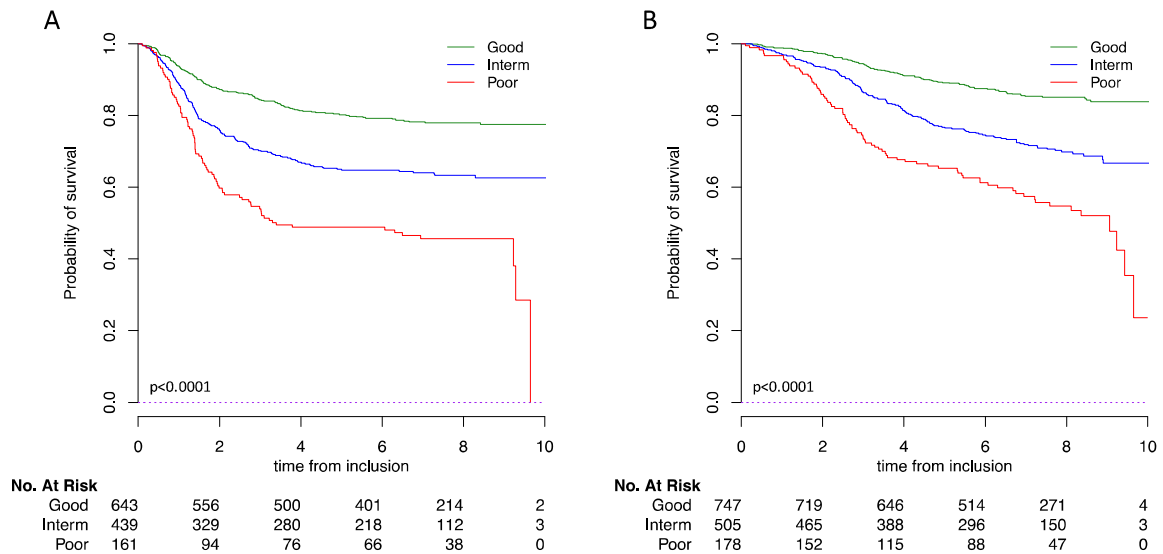


Figure 6 : courbes de Kaplan Meier pour la survie sans maladie (**A**) et la survie globale (**B**) selon le groupe de risque défini par les scores créés.

4.3.1.4.6 Valeur prédictive des scores pronostiques créés

L'ajout du cetuximab n'a bénéficié à aucun sous groupe de patient, quelle que soit la présence ou non d'une mutation *RAS* (Figure 7). Cependant, dans la population *RAS* non mutée, un bénéfice à l'ajout du cetuximab pourrait être présent chez les patients à hauts risque définis par notre score.

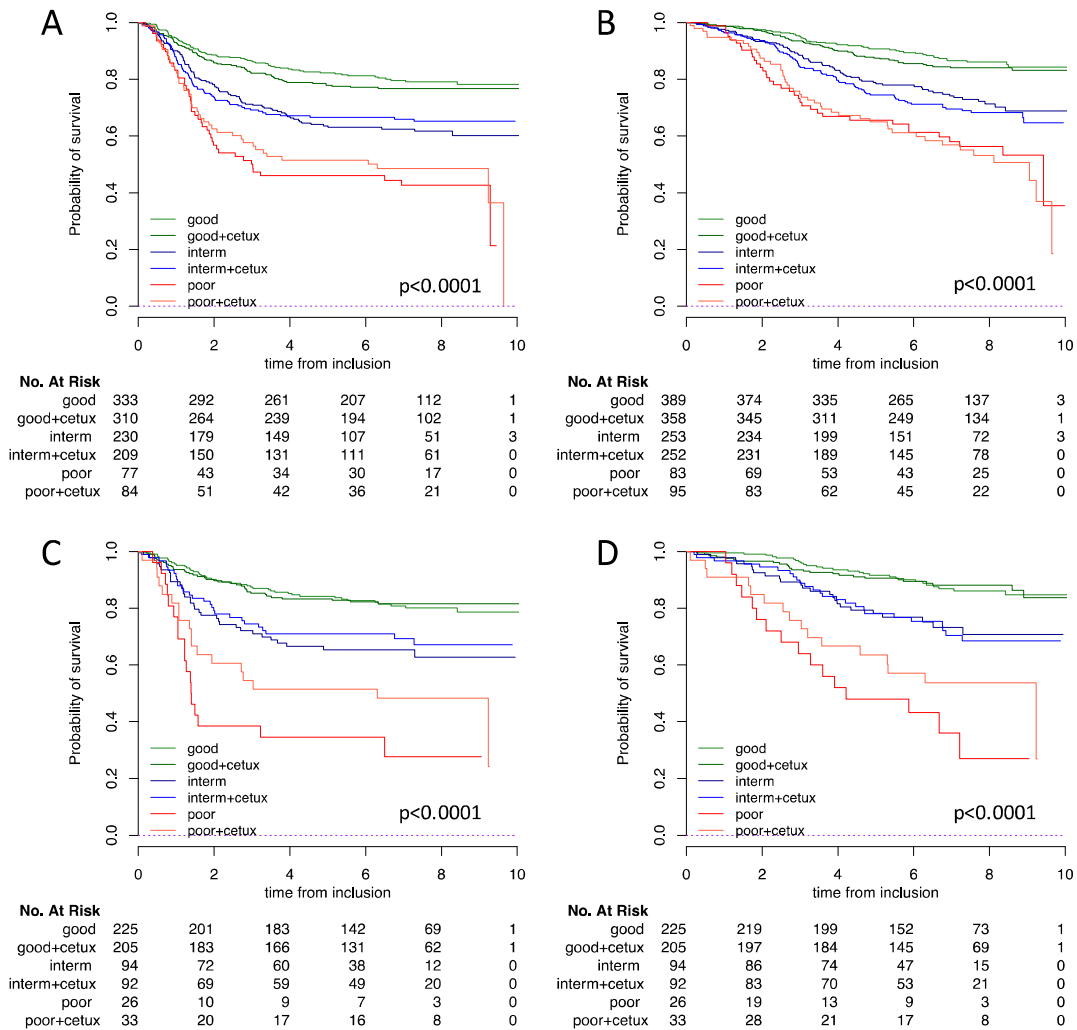


Figure 7 : courbes de Kaplan Meier montrant l'effet de l'ajout du cetuximab au FOLFOX selon groupe à risque, dans la population globale (**A** : survie sans maladie, **B** : survie globale) et dans la population *RAS* sauvage (**C** : survie sans maladie, **D** : survie globale).

4.3.1.5 Conclusions de l'étude

Dans cette étude nous avons montré que la prise en compte des paramètres biologiques et moléculaires améliorait significativement l'évaluation du pronostic des patients atteints d'un cancer du colon de stade III. Nous avons aussi créé un score pronostique ayant de bonnes performances pour prédire la rechute et/ou le décès. Ce score n'a pas de valeur prédictive sur le bénéfice de l'ajout du cetuximab au FOLFOX en adjuvant, même si nous avons noté un possible intérêt chez la population non mutée *RAS* à haut risque selon notre score.

5 DISCUSSION

5.1 Discussion des travaux de la thèse

5.1.1 Bilan des travaux de la thèse

Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en lumière une hétérogénéité considérable du pronostic des patients atteints d'un cancer du colon localisé et ainsi la nécessité de mieux l'apprécier. En effet, certains facteurs pronostiques utilisés en pratique courante ne sont pas toujours pris en compte de façon précise.

C'est le cas par exemple de l'ACE, dont la norme habituelle est de 5 ng/mL. Dans les deux premiers travaux de cette thèse, nous avons montré que la population ayant un dosage de l'ACE post opératoire considéré comme normal est en fait constituée de patients aux risques de rechute et de décès très hétérogènes. En effet, si on considère l'ACE comme une variable continue, nous avons montré que la relation entre celui-ci et les critères de jugement de survie était graduelle (fonction linéaire chez les stades II, fonction racine carrée chez les stades III) et ceci même pour les valeurs considérées comme normales (<5 ng/mL).

Ainsi, nous avons montré qu'un seuil plus bas que celui communément admis était plus pertinent pour la stratification du risque de rechute et de décès. Dans notre cohorte de patients atteints d'un cancer du colon de stade II, nous avons validé un seuil précédemment décrit par Margalit et al (105) chez des patients ayant un dosage de l'ACE pré opératoire. En ce qui concerne les patients atteints d'un cancer du colon de stade III, nous avons nous même développé et validé une valeur seuil de 1,30 ng/mL synonyme d'un risque de rechute ou décès déjà plus important.

Ensuite, nous avons pu montrer que l'analyse précise d'un facteur pronostique, aussi simple soit-il, permettait de répondre à des questions importantes en pratique courante. En effet, chez les patients ayant un cancer du colon de stade II, le traitement adjuvant est discuté et notamment l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2. Usuellement, le choix d'un traitement adjuvant par une fluoropyrimidine seule se fait sur la présence de facteurs de mauvais pronostic (tumeur T4 ou perforation/occlusion intestinale ou moins de 12 ganglions analysés ou présences d'emboles lymphatiques/vasculaires/péri nerveux). Le FOLFOX reste une option pour les patients atteints d'une tumeur pT4. Grâce à l'ACE, nous avons pu

déterminer, au sein de la population à haut risque de rechute, une sous population bénéficiant de l'ajout de l'oxaliplatine au LV5FU2. Ces données suggèrent qu'une chimiothérapie par LV5FU2 seul pourrait être proposée à de nombreux patients, les épargnant du risque de neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine séquellaire.

Enfin, le dernier travail de cette thèse avait pour objectif de créer un outil pronostique intégratif chez des patients atteints d'un cancer du colon de stade III, en suivant une méthodologie fine décrite par Vernerey et al. Grâce aux données de l'étude PETACC-8 nous avons pu construire :

1. Un modèle multivarié incluant les données cliniques, pathologiques, biologiques et moléculaires des patients.
2. Créer un nomogramme permettant de prédire les survies sans maladie et globale des patients
3. Créer un score pronostique permettant de stratifier avec de très bonnes performances les populations à risque de rechute et de décès.

Cependant, nos outils n'ont pas permis de montrer un caractère prédictif du bénéfice d'intensifier le traitement adjuvant chez les patients atteints d'un cancer du colon de stade III. En effet, aucun bénéfice du cetuximab ajouté au FOLFOX n'a été observé dans les différents groupes pronostiques.

Finalement, nous avons cherché à illustrer l'association de chaque groupe de variables sur l'estimation du pronostic en évaluant les indices de discrimination (c-index) des modèles incluant les variables cliniques, cliniques et pathologiques, cliniques pathologiques et biologiques, et cliniques pathologiques biologiques et moléculaires. Si le c-index du modèle le plus complet était très satisfaisant (0,72 pour la survie sans maladie, 0,77 pour la survie globale), l'ajout des paramètres moléculaires ne semblait pas augmenter de façon significative les performances du modèle, probablement dû à un manque de puissance statistique.

5.1.2 ACE dans les cancers du colon de stade II

Comme précisé dans le paragraphe précédent, nous avons validé une valeur seuil déjà publiée par Margalit et al, mais dans une population légèrement différente. En effet,

initialement Margalit et al ont montré leur nouveau seuil dans une population de patients atteints de cancer du colon de stades I et II non traités par chimiothérapie (105). De plus, il s'agissait du dosage de l'ACE pré opératoire. Suite à l'étude de Konishi et al, qui montrait qu'un dosage post opératoire de l'ACE était plus pertinent que pré opératoire (106), nous avons décidé de valider en situation post opératoire cette valeur seuil de 2,35 ng/mL dans la cohorte de patients atteints d'un cancer du colon de stade II inclus dans l'étude MOSAIC. Les analyses de sensibilité étaient en accord avec la littérature puisque la valeur seuil optimale dans notre cohorte était de 2,77 ng/mL. Ces travaux montrent que la valeur seuil de 5 ng/mL habituellement utilisée n'est clairement pas optimale pour la stratification du risque de rechute et de décès.

L'amplitude de la valeur pronostique de l'ACE était très importante dans notre étude. Les patients ayant un ACE élevé en post opératoire avaient 50% de risque en plus de rechuter ou de mourir comparés à ceux ayant un ACE bas (<2,35 ng/mL) en analyse multivariée.

Dans notre étude, l'ACE avait une valeur prédictive du bénéfice de l'ajout de l'oxaliplatine à une chimiothérapie adjuvante à base LV5FU2. Les patients ayant un cancer du colon de stade II à haut risque de récurrence selon les classifications courantes avec un dosage de l'ACE post opératoire supérieur à 2,35 ng/mL étaient les seuls à bénéficier de l'oxaliplatine. Chez ces patients l'ajout de l'oxaliplatine au 5FU résultait en une augmentation de 13% du taux de survie sans maladie à 3 ans. Le seul autre outil ayant une valeur prédictive dans les cancers du colon de stade II est l'Oncotype Dx[®] (78). Yothers et al ont montré que les patients ayant un score Oncotype Dx[®] élevé bénéficiaient de l'oxaliplatine. Cependant ces résultats ont été montrés sur un plus petit nombre de patient, et leur amplitude semble similaire à celle de l'ACE. Par ailleurs, l'ACE est moins cher et réalisé en pratique courante.

Le caractère prédictif du dosage de l'ACE post opératoire a été montré chez les patients à haut risque de rechute selon la définition simplifiée de MOSAIC. Cette définition prend en compte les facteurs suivant : tumeur pT4, perforation tumorale, moins de 10 ganglions envahis. Nous avons décidé d'utiliser cette définition car elle a été publiée en 2015 par André et al dans la population de l'étude MOSAIC, et de cette façon nous avons pu limiter la perte d'informations liée aux données manquantes (8). Par ailleurs, nos analyses de sensibilité retrouvaient des résultats similaires avec la définition donnée par l'ESMO

(tumeur T4 ou perforation/occlusion intestinale ou moins de 12 ganglions analysés ou présences d'emboles lymphatiques/vasculaires/péri nerveux) (4).

D'autres analyses de sensibilité ont été effectuées parmi des sous groupes tels que les patients de moins 70 ans, ces facteurs pouvant agir sur l'ACE. Dans chaque cas, les résultats étaient concordants avec ceux de la population générale de l'étude, renforçant ainsi leur robustesse.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation post opératoire de l'ACE est en lien avec une maladie tumorale résiduelle, et que les patients présentant ces facteurs de mauvais pronostic sont ceux bénéficiant le plus de l'intensification du traitement adjuvant dans le cancer du colon de stade II.

5.1.3 ACE dans les cancers du colon de stade III

De même que pour les patients atteints d'un cancer du colon de stade II, nous avons montré que le dosage post opératoire de l'ACE avait une association pronostique majeure en terme de rechute et de mortalité. De plus, les patients ayant une valeur de l'ACE considérée comme normale (< 5ng/mL) constituaient une population très hétérogène en terme de pronostic.

La question de la valeur seuil pour la normalité du dosage de l'ACE a été largement posée dans la littérature. Plusieurs études ont montré que les patients ayant un ACE inférieur à 2,5 ou 2,7 ng/mL avaient une meilleure survie sans maladie et globale (107–109). L'étude la plus conséquente a été déjà décrite ci-dessus, et a été menée par Margalit et al. Avec plus de 45000 patients les auteurs ont montré qu'un seuil de 2,35 ng/mL était plus adapté dans une population de patients atteints de cancer du colon de stades I et II (105). Nos résultats sont en accord avec toutes ces études. Nous avons mis en lumière le fait que la population de patients ayant un dosage considéré comme normal était en fait très hétérogène en terme de pronostic. L'utilisation plus précise du dosage de l'ACE permet de construire des modèles de prédiction de la survie plus performants, et donc de participer à une meilleure appréciation globale du pronostic des patients dans le but d'adapter au mieux leurs traitements adjuvants.

Lorsqu'on modifie la valeur seuil d'un paramètre, les questions concernant la sensibilité et la spécificité du nouveau seuil se posent. Dans le cas de l'ACE, Nicholson and al

ont déjà montré qu'en baissant le seuil de l'ACE à 2,5 ng/mL, on augmentait sa sensibilité (82% versus 71% avec la valeur classique de 5 ng/mL), mais que la spécificité diminuait (80% contre 88%) (110). Dans le cadre de la surveillance post opératoire d'un cancer, le plus important est d'augmenter la sensibilité d'un test. La perte de spécificité en lien avec la diminution du seuil de l'ACE est donc plus accessoire. La deuxième question posée par la diminution du seuil de normalité d'un paramètre est celle de la reproductibilité de celle-ci pour des mesures basses. Dans notre étude, nous avons défini un seuil à 1,30 ng/mL pour les patients ayant un cancer du colon de stade III. Il est important de vérifier que les mesures des valeurs inférieures à ce seuil soient bonnes. Dans la plupart des laboratoires le dosage est fait par des automates dont les seuils de sensibilité se situent aux alentours de 0,5 ng/mL. Nous pouvons donc nous fier aux mesures de l'ACE pour des valeurs basses.

A l'instar des cancers du colon de stade II, la valeur pronostique de la rechute et du décès de l'ACE dans le cancer du colon de stade III est extrêmement forte. Récemment des scores immunologiques et moléculaires ont été développés dans le but d'expliquer le plus précisément le pronostic des patients atteints de cancer du colon localisé (48,49,77,78). L'ACE semble avoir des capacités discriminatoires identiques à ces scores. Ces observations renforcent l'intérêt à porter à l'ACE, d'autant plus qu'il s'agit d'un biomarqueur peu coûteux. Enfin l'ACE devrait s'intégrer de façon systématique aux outils pronostiques à l'avenir. Malheureusement les outils existants ne le prennent pas en compte.

5.1.4 Score pronostique

Le dernier travail de cette thèse avait pour objectif d'étudier de façon intégrative le pronostic des patients atteints de cancer du colon de stade III. En partant d'une base de données d'un essai de phase III international, nous avons pu créer deux outils pronostiques. Le premier est un nomogramme permettant une approche individuelle du risque de rechute et de décès. Le second est un score pronostique, s'inscrivant dans une approche populationnelle et donc pouvant permettre de positionner le patient dans une population à risque permettant une stratification plus précise de futurs essais adjuvants.

Ces deux outils ont été créés à partir d'un modèle de Cox multivarié. Des trois scores publiés à ce jour en situation adjuvante, le notre a les meilleures performances en terme de discrimination des patients de mauvais pronostic (82,83,111). En effet, le score publié par

Renfro et al a un c-index de 0,66 pour la survie globale, alors que le notre a un c-index de 0,73 (Harrel) ou 0,77 (Uno) pour la survie globale (82). Pour rappel, la classification TNM obtient un c-index de 0,58 pour la survie globale. Même s'il a été construit de façon rigoureuse, le nomogramme développé par Renfro et al n'est pas complété par une approche populationnelle. Ce score ne peut donc pas servir à la stratification d'essais futurs.

La principale explication aux moins bonnes performances des autres scores provient du fait que certains facteurs pronostiques majeurs n'y sont pas intégrés. Le premier d'entre eux est l'ACE. En effet, il s'agit de la variable la plus pronostique du modèle de notre score, et son effet sur la prédiction du pronostic est très important. De plus, nous avons montré que l'ajout des variables biologiques, dont l'effet est principalement dû à l'ACE, augmentait de façon significative le c-index (et donc les performances) du modèle (différence de 0,02 IC95% :0,01-0,04 pour la survie sans maladie ; et 0,03 IC95% :0,01-0,05 pour la survie globale). Les autres variables non incluses pouvant jouer dans l'augmentation de la performance de notre modèle sont les variables moléculaires (statut MSI, mutations *RAS* et *BRAF*). Cependant, nous devons souligner que l'apport de ces variables en plus des variables biologiques n'était pas significativement plus important, ceci probablement par manque de puissance. Dienstmann et al ont montré des résultats similaires concernant les données moléculaires (112). En effet, dans leur étude le c-index du modèle intégrant les données moléculaires augmentait par rapport à celui d'un modèle comprenant seulement les données du stade TNM. Cependant l'apport des données moléculaires aux facteurs pronostiques déjà connus (cliniques, pathologiques et biologiques) n'a pas été recherché, ce qui est probablement un point faible de leur étude. Les variables moléculaires paraissent cependant indispensables pour la prise en compte globale de la pathologie dans l'estimation du pronostic, ainsi que pour l'adaptation future des traitements adjuvants. C'est la définition même de l'approche intégrative.

Enfin, même si nous n'avons pas noté de valeur prédictive à notre score, les résultats semblent montrer un possible bénéfice de l'ajout du cetuximab au FOLFOX chez les patients *RAS* non mutés à haut risque de rechute et/ou décès selon notre score. Même s'ils sont à prendre avec précaution, il s'agit de la première fois qu'un outil pronostic montre un signal prédictif dans le cancer du colon de stade III. Une validation externe serait souhaitable afin de préciser ce résultat.

5.2 Forces, limitations et perspectives

5.2.1 Forces et limitations des travaux de la thèse

5.2.1.1 *Forces des travaux de la thèse*

Ce travail de thèse comporte plusieurs points forts. Le premier est en lien avec la nature des données recueillies. Tous les patients inclus dans les différents travaux de cette thèse sont issus d'essais thérapeutiques internationaux de phase III. La qualité des données qui en découle est donc très bonne avec peu de données manquantes. Par ailleurs, le recueil de données était exhaustif ce qui a permis d'intégrer à notre score de nombreuses données dans les modèles multivariés, et notamment les données de biologie moléculaire qui n'étaient pas présentes dans les autres études.

Une autre force des travaux de cette thèse est l'utilisation d'une méthodologie stricte et reproductible pour l'étude d'un facteur pronostique et la construction d'un score. En effet, nous avons montré tout au long de cette thèse que la méthodologie développée par Vernerey et al était applicable de façon courante. Nous avons pu étudier et augmenter la valeur discriminatoire d'un facteur pronostique connu de longue date et utilisé de façon sous optimale. De plus, cette méthodologie rigoureuse nous a permis de construire des outils pronostiques performants.

5.2.1.2 *Limites des travaux de la thèse*

La principale limite de ce travail est valable pour deux des études composant cette thèse : le travail sur l'ACE dans les cancers du colon de stade II et celui portant sur la construction du score pronostique. Cette limite est la validation externe des résultats. En effet, dans les cancers du colon de stade II, aucune cohorte de patients traités par LV5FU2 +/- oxaliplatine ayant dosé l'ACE en post opératoire n'existe. Il n'est donc pas possible de valider le caractère pronostique et surtout prédictif de l'ACE dans cette population. Concernant le score pronostique, il existe des populations de patients traités en adjuvant pour des cancers du colon de stade III, dont l'étude NSABP C07. Malheureusement, dans cette cohorte le dosage de l'ACE n'a pas été effectué, et donc le score ne peut être validé tel

quel. Par ailleurs, une validation sans la variable ACE serait dommageable puisqu'il s'agit d'une variable importante dans le score.

Enfin, une critique peut être apportée aux conditions de dosage de l'ACE dans les cohortes des études MOSAIC et PETACC-8. Celui-ci n'étant pas centralisé il est possible qu'il existe des variations dépendantes des laboratoires, notamment en ce qui concerne les valeurs seuil. Malgré cette limitation, nous devons souligner le fait que le dosage de l'ACE reste fortement pronostique en terme de survie sans maladie et de survie globale. Cette limitation nous place aussi en conditions de « vie réelle » et, à notre sens, renforce la robustesse des résultats.

5.2.2 Perspectives du travail

5.2.2.1 *Prédiction de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante*

Les travaux de cette thèse ont ouvert la voie à plusieurs perspectives découlant de leurs résultats mais aussi des faiblesses des différentes études. Premièrement, le caractère prédictif du dosage de l'ACE sur l'intérêt de l'intensification de la chimiothérapie adjuvante par FOLFOX dans les cancers du colon de stade II peut donner lieu à une réflexion plus générale : l'ACE pourrait-il être un facteur prédictif dans d'autres situations ? Nous avons montré dans les cancers du colon de stade III que le dosage de l'ACE n'était pas prédictif de l'efficacité du cetuximab en adjuvant. Cependant, le cancer du colon de stade III reste une situation où l'étude de l'ACE pourrait apporter une information pour guider le traitement adjuvant. Les résultats récents de l'étude IDEA ont fait changer les pratiques courantes sur la base de la classification TNM : les patients ayant un cancer du colon de stade III T3N1 reçoivent du XELOX pendant 3 mois, alors que les patients T4 et/ou N2 reçoivent du FOLFOX pendant 6 mois. L'intérêt de l'ACE serait de trouver une sous population considérée à faible risque de rechute (T3N1) qui bénéficierait d'un allongement de la durée de chimiothérapie adjuvante, et inversement une sous population considérée à haut risque (T4 et/ou N2) qui n'en tirerait pas un si grand avantage. Les données de l'ACE n'ont malheureusement pas été collectées dans IDEA France. Nous sommes actuellement en train de collecter ces données dans un maximum de centres investigateurs.

5.2.2.2 *Adaptation de la surveillance*

La force de l'association pronostique entre l'ACE et les critères de survie mène à la question de son utilisation pendant la surveillance des patients opérés de leur cancer colique. Le dosage de l'ACE est actuellement recommandé dans le suivi des patients, mais l'attitude n'est pas clairement établie en cas d'élévation, même en dessous des valeurs considérées comme normales. Effectivement, il pourrait être intéressant d'envisager une stratégie de surveillance plus intensive chez les patients dont la cinétique de l'ACE est ascendante. Une des solutions est la réalisation d'un TEP-scanner. Malheureusement la sensibilité d'un tel examen pour des valeurs de l'ACE inférieures à 10 ng/mL est faible, et donc seul un rapprochement des scanners pourrait être proposé chez ces patients.

L'essai PRODIGE 13 vise à évaluer l'intérêt d'une surveillance rapprochée dans le cancer du colon de stade III opéré (113). Les patients sont randomisés une première fois entre une surveillance standard et une surveillance renforcée, puis une seconde entre une surveillance de l'ACE et une absence de dosage de l'ACE. Les résultats de cette étude permettront possiblement d'asseoir l'ACE comme un pilier de la surveillance du cancer du colon.

5.2.2.3 *Stratégie intégrative d'évaluation du pronostic*

Le score développé dans cette thèse se veut intégratif afin d'étudier de la façon la plus globale possible le pronostic des patients et l'approche du cancer du colon de stade III. Ses performances sont les meilleures rapportées à ce jour dans la littérature. Cependant, le pronostic n'est pas corrélé à la prédiction de l'ajout du cetuximab au FOLFOX pour la chimiothérapie des cancers du colon de stade III. La cause de cela vient possiblement du fait que nous cherchons à expliquer un mécanisme complexe intégrant des facteurs liés à l'hôte, et des facteurs liés à la maladie. On a montré qu'en intégrant le maximum de paramètres disponibles, il restait environ 30% du devenir des patients qui était « inexpliqué ».

Ne perdons pas de vue que l'objectif d'être le plus précis possible dans l'estimation du pronostic des patients est d'adapter à chacun une stratégie thérapeutique adjuvante afin de ne pas sur-traiter les patients, avec les risques de séquelles que cela comporte. Les récentes avancées en recherche ont permis d'identifier des facteurs pronostiques en lien

avec la maladie qui ne sont pas intégrés dans le score, tels que les mutations/amplifications HER2 ou l'ADN tumoral circulant. De plus, le développement de l'immunothérapie et de la recherche en lien avec ces traitements a mis en lumière des facteurs pronostiques à la croisée de l'hôte et de la tumeur. Le plus connu d'entre eux est l'Immunoscore®. L'étape suivante pour l'augmentation de l'exhaustivité de notre score pronostic serait d'intégrer ces données moléculaires et immunologiques. Le but de cette démarche serait double : i) pouvoir avoir un outil pronostique le plus puissant possible, ii) étudier l'apport de ces nouveaux marqueurs dans l'estimation du pronostic des patients. En effet, ils n'ont été étudiés que séparément avec des performances intéressantes, mais, comme la biologie moléculaire, il se pourrait que leur apport ne soit pas si important que ce que l'on espérerait (par rapport aux variables biologiques et anatomopathologiques). Concernant l'ADN tumoral circulant, plusieurs études dans les tumeurs pulmonaires ont montré qu'il pourrait y avoir un intérêt à la coupler à d'autres marqueurs déjà connus comme le dosage de l'ACE. Enfin, le problème de la validation externe se posera toujours car aucune cohorte ne pourra apporter toutes les informations nécessaires pour la validation d'un tel score dans sa globalité.

5.2.2.4 Stratégie de recherche clinique

Les travaux de cette thèse amènent à un constat alarmant : il existe actuellement une hétérogénéité très importante dans les recueils de données des différents essais de phase III menés dans les cancers du colon adjuvant. Tous les facteurs pronostiques connus ne sont pas pris en compte dans les bases de données, ou alors de façon imprécise ou inadéquate.

Le premier exemple est la valeur du dosage de l'ACE. Dans les études MOSAIC et PETACC-8 le dosage post opératoire est recueilli. Ce n'est pas le cas dans l'étude NSABP C07, ou dans l'étude IDEA. Pourtant dans cette dernière étude, l'ACE < 10 ng/mL était un critère d'inclusion. Nous disposons donc de la notion « d'ACE < 10 ng/mL » mais pas de sa valeur. Le deuxième exemple est celui des embolies lymphatiques et vasculaires. Il s'agit d'un facteur pronostique débattu, mais il est recueilli de façon imprécise dans les bases de données. Dans certains cas nous pouvons disposer seulement des embolies lymphatiques ou seulement des embolies vasculaires. Enfin, le nombre de ganglions étudiés n'est pas non plus recueilli systématiquement. Ces deux derniers exemples posent la question de l'intégration en entier

des comptes rendus d'anatomopathologie dans les bases de données des études colon adjuvantes.

Afin de favoriser la recherche clinique, et d'améliorer la stratification dans les essais thérapeutiques, il nous semble indispensable de réaliser une liste des facteurs indispensables à inclure dorénavant dans les bases de données des essais à venir dans le cancer colique localisé. Cette liste, énumérée dans le tableau ci-après, sera susceptible de changer au cours des prochaines années (au fil de l'avancée de la recherche fondamentale).

	Variable à recueillir
Données cliniques	Age, sexe, indice de masse corporelle Performance status Localisation tumorale (gauche/droit), perforation ou obstruction intestinale
Données anatomopathologiques	Stade TNM Grade histopronostic Nombre de ganglions positifs et analysés Emboles vasculaires, emboles lymphatiques, engainements péri nerveux Infiltration lymphocytaire (Immunoscore®)
Données biologiques	Dosage <u>post opératoire</u> de l'ACE Bilan hépatique, NFS, créatininémie LDH, albuminémie
Données moléculaires	Mutations <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>HER2</i> Statut MMR, mutations POL-E ADN tumoral circulant post opératoire

Tableau : proposition des données à recueillir systématiquement pour les futures études adjuvantes dans le cancer du colon.

5.2.2.5 Travaux en cours

Un des objectifs de cette thèse était de valider en pratique courante une méthodologie rigoureuse pour l'étude des facteurs pronostiques et la création de score. Cet objectif étant atteint, la suite logique de ce travail est donc d'élargir cette méthodologie :

1. A d'autres stades dans le cancer colorectal : un travail est en cours sur le pronostic des patients atteints de cancers du colon métastatiques traités par chimiothérapie intra artérielle hépatique.
2. A d'autres types tumoraux : cette méthodologie a déjà été appliquée dans le cancer du poumon afin de créer un score pronostique biologique de la survie globale sous

immunothérapie (*Lung Immune Prognostic Index*, LIPI) dont le manuscrit est disponible ci-après (114).

Enfin la démarche méthodologique sera publiée dans une revue internationale afin de servir de recommandations pour la recherche pronostique en complément aux TRIPODS dont la faiblesse est de ne pas proposer d'outils méthodologiques et statistiques standardisés à chaque étape de leurs recommandations.

Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer

Laura Mezquita, MD; Edouard Auclin, MD; Roberto Ferrara, MD; Melinda Charrier, PharmD, PhD; Jordi Remon, MD; David Planchard, MD, PhD; Santiago Ponce, MD; Luis Paz Ares, MD, PhD; Laura Leroy, MD; Clarisse Audigier-Valette, MD; Enriqueta Felip, MD, PhD; Jorge Zerón-Medina, MD, PhD; Pilar Garrido, MD, PhD; Solenn Brosseau, MD; Gérard Zalcman, MD, PhD; Julien Mazieres, MD, PhD; Caroline Caramela, MD; Jihene Lahmar, MD; Julien Adam, MD, PhD; Nathalie Chaput, PharmD, PhD; Jean Charles Soria, MD, PhD; Benjamin Besse, MD, PhD

 Supplemental content

IMPORTANCE Derived neutrophils/(leukocytes minus neutrophils) ratio (dNLR) and lactate dehydrogenase (LDH) level have been correlated with immune checkpoint inhibitor (ICI) outcomes in patients with melanoma.

OBJECTIVE To determine whether pretreatment dNLR and LDH are associated with resistance to ICIs in patients with advanced non–small cell lung cancer (NSCLC).

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS Multicenter retrospective study with a test (n = 161) and a validation set (n = 305) treated with programmed death 1/programmed death ligand 1 (PD-1/PD-L1) inhibitors in 8 European centers, and a control cohort (n = 162) treated with chemotherapy only. Complete blood cell counts, LDH, and albumin levels were measured before ICI treatment. A lung immune prognostic index (LIPI) based on dNLR greater than 3 and LDH greater than upper limit of normal (ULN) was developed, characterizing 3 groups (good, 0 factors; intermediate, 1 factor; poor, 2 factors).

MAIN OUTCOMES AND MEASURES The primary end point was overall survival (OS). Secondary end points were progression-free survival (PFS) and disease control rate (DCR).

RESULTS In the pooled ICI cohort (N = 466), 301 patients (65%) were male, 422 (90%) were current or former smokers, and 401 (87%) had performance status of 1 or less; median age at diagnosis was 62 (range, 29-86) years; 270 (58%) had adenocarcinoma and 159 (34%) had squamous histologic subtype. Among 129 patients with PD-L1 data, 96 (74%) had PD-L1 of at least 1% by immunohistochemical analysis, and 33 (26%) had negative results. In the test cohort, median PFS and OS were 3 (95% CI, 2-4) and 10 (95% CI, 8-13) months, respectively. A dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN were independently associated with OS (hazard ratio [HR] 2.22; 95% CI, 1.23-4.01 and HR, 2.51; 95% CI, 1.32-4.76, respectively). Median OS for poor, intermediate, and good LIPI was 3 months (95% CI, 1 month to not reached [NR]), 10 months (95% CI, 8 months to NR), and 34 months (95% CI, 17 months to NR), respectively, and median PFS was 2.0 (95% CI, 1.7-4.0), 3.7 (95% CI, 3.0-4.8), and 6.3 (95% CI, 5.0-8.0) months (both $P < .001$). Disease control rate was also correlated with dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN. Results were reproducible in the ICI validation cohort for OS, PFS, and DCR, but were nonsignificant in the chemotherapy cohort.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Pretreatment LIPI, combining dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN, was correlated with worse outcomes for ICI, but not for chemotherapy, suggesting that LIPI can serve as a potentially useful tool when selecting ICI treatment, raising the hypothesis that the LIPI might be useful for identifying patients unlikely to benefit from treatment with an ICI.

JAMA Oncol. doi:10.1001/jamaoncol.2017.4771
Published online January 11, 2018.

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

Corresponding Author: Benjamin Besse, MD, PhD, Thoracic Oncology Group, Gustave Roussy, 114, rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France (benjamin.besse@gustaveroussy.fr).

Immunotherapy, principally represented by programmed death 1/programmed death ligand 1 (PD-1/PD-L1) inhibitors, has been approved worldwide as treatment for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and has been hailed as an important addition to the treatment armamentarium for this population. In an unselected previously treated NSCLC population, response rates with single-agent immune checkpoint inhibitors (ICIs) range between 14% and 20%, with median overall survival (OS) of 10 to 12 months.¹⁻⁵ However, when this population is stratified by specific biomarkers, notably positive PD-L1 expression by immunohistochemical analysis, these outcomes improved, reaching up to 30% response with a median OS of 20 months,^{3,5} in contrast to patients with negative or weak PD-L1 expression (1%-49% positive tumor cells, accounting for approximately 67% of the population) for whom response rates between 8% and 19% have been reported with median OS slightly below 10 months.⁶ However, even within the PD-L1-positive stratum, the benefit with immunotherapy is not seen for the entire population, making the identification of biomarkers for patients likely to respond to ICI therapy a critical step in selecting the candidate population.

The inflammation process has been proposed as a mechanism of immunoresistance in patients with cancer, promoting cancer growth and dissemination, and activating oncogenic signaling pathways.⁷ Furthermore, a peripheral pro-inflammatory status has been associated with worse outcomes in patients with cancer.⁸⁻¹⁰ Numerous routine blood parameters have been investigated as potential inflammatory biomarkers in patients with cancer, such as elevated concentration of circulating white blood cells, absolute neutrophil count, absolute platelet count, and lactate dehydrogenase (LDH) level, which are associated with poor outcomes in several cancer types.¹⁰⁻¹³ Novel potential biomarkers such as the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and derived neutrophil to lymphocyte ratio (dNLR; absolute neutrophil count/[white blood cell concentration – absolute neutrophil count]) have been investigated to measure inflammatory status in various cancers, including NSCLC. These ratios are simple, easy-to-calculate instruments, combining at least 2 blood cell subpopulations, and are accessible from routine complete blood cell counts.

However, with the exception of melanoma, the prognostic and predictive value of circulating inflammatory biomarkers for ICIs is unknown in most tumor types (eTable 1 in the Supplement). The 2 largest published retrospective analyses in advanced melanoma cohorts, one in 720 patients treated with ipilimumab¹⁴ and the other in 512 patients treated with pembrolizumab,¹⁵ reported the independent prognostic value of the dNLR (dNLR ≥ 3 , hazard ratio [HR], 4.10; 95% CI, 3.08-5.46; $P < .001$) and LDH of at least 2.5 times upper limit of normal (ULN; HR, 2.8; 95% CI, 2.0-3.9; $P = .001$). Both studies reflected that a pro-inflammatory status was correlated with poor outcomes in patients with melanoma treated with ICIs. We hypothesized that the combination of baseline dNLR and LDH could be correlated with resistance to ICI therapy in patients with advanced NSCLC and could be used to develop a lung immune prognostic index (LIPI).

Key Points

Question Are pretreatment derived neutrophils/(leukocytes minus neutrophils) ratio (dNLR) and lactate dehydrogenase (LDH) level associated with resistance to immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)?

Findings In this cohort study evaluating 466 patients with advanced NSCLC, the Lung Immune Prognostic Index (LIPI), combining baseline dNLR and LDH, was associated with the outcomes of immunotherapy but not chemotherapy.

Meaning Poor baseline LIPI, combining dNLR greater than 3 and LDH greater than upper limit of normal, was correlated with worse outcomes for immune checkpoint inhibitor treatment in patients with NSCLC, but not with chemotherapy.

Methods

Patients

We conducted a multicentric retrospective study of a cohort of 466 patients with advanced NSCLC receiving treatment with PD-1/PD-L1 inhibitors in a variety of settings covering routine clinical care, expanded access, and compassionate-use programs, as well as clinical trials (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab, and durvalumab-ipilimumab). Initially, patients from Gustave Roussy treated with PD-1/PD-L1 inhibitors between November 2012 and July 2016 were included in a monocentric test set ($n = 161$) to establish the potential of the score. The hypothesis was then validated in a larger multicentric validation set ($n = 305$) that included patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors between November 2012 and January 2017 from 8 European academic centers (including patients from Gustave Roussy from July 2016 to January 2017) (eFigure 1 in the Supplement). To determine whether the LIPI is ICI specific, a control cohort of 162 patients with advanced NSCLC exclusively treated with chemotherapy, composed of 128 patients from Gustave Roussy treated between December 2011 and September 2015, and 34 from the Hospital 12 de Octubre treated between November 2012 and July 2016 were also evaluated for LIPI.

Complete blood cell counts, LDH, and albumin levels at baseline before ICI treatment (within 30 days before the first treatment) were extracted from electronic medical records. Demographic, clinical, pathological, and molecular data were also collected.

Data for PD-L1 expression were analyzed on tumor cells by immunohistochemistry, according to standard practice for each center. Expression of at least 1% was considered positive.

Radiological assessments were performed every 8 weeks per RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) v1.1 in the test set and per the investigator's discretion in the validation set and the chemotherapy cohort. Radiological atypical response patterns per the investigator were collected including mixed or dissociated response (progressive disease in one location with objective response at another site).

This study was approved by the Institutional Review Board of Gustave Roussy (Commission Scientifique des Essais Thérapeutiques) and informed consent was not required because of the retrospective character of the study.

The LIPI was developed on the basis of dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN, characterizing 3 groups (good, 0 factors; intermediate, 1 factor; poor, 2 factors). The cutoff for dNLR was greater than 3 (according to the cutoff from the largest published study with ICIs in patients with cancer¹⁴), and the ULN for LDH was defined according to the limit of each center.

Statistical Analysis

Disease control rate (DCR) was defined as complete plus partial response plus stable disease, and overall response rate as complete plus partial response. Overall survival was calculated from the date of first immunotherapy administration until death due to any cause. Progression-free survival (PFS) was calculated from the date of first immunotherapy administration until disease progression or death due to any cause. Comparisons between patient characteristics were performed using χ^2 or Fisher exact test for discrete variables and the unpaired *t* test, Wilcoxon sign-rank test, or analysis of variance for continuous variables. Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. All *P* values inferior to .05 were considered statistically significant.

A Cox proportional hazards regression model was used to evaluate factors independently associated with OS and PFS. Variables included in the final multivariate model were selected according to their clinical relevance and statistical significance in a univariate analysis (cutoff, *P* = .10). The proportional hazard hypothesis was verified with the Schoenfeld residual method. Factors associated with disease control were tested with logistic regression in univariate and multivariate analyses. The α level was 5%. Internal validation of the final multivariate model for OS was performed on the overall LIPI population with a bootstrap sample procedure (*n* = 1000 samples). Statistical analyses were performed with R (free software environment for statistical computing and graphics).

Results

Test Set

dNLR and LDH

Baseline characteristics of the 161 test set patients are summarized in eTable 2 in the [Supplement](#). Median follow-up was 12 months (95% CI, 11-14 months). Median OS was 10 months (95% CI, 8-13 months) and median PFS was 3 months (95% CI, 2-4 months). A dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN were associated with shorter OS (HR, 1.98; 95% CI, 1.27-3.10; *P* = .002 and HR, 2.44; 95% CI, 1.47-4.04; *P* < .001, respectively, log-rank test) and shorter PFS (HR, 1.61; 95% CI, 1.1-2.34 and HR, 1.77; 95% CI, 1.16-2.69; both *P* = .01, log-rank test). A dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN were also associated with progressive disease (non-DCR) (OR, 2.12; 95% CI, 1.07-4.21; *P* = .03 and OR, 3.14; 95% CI, 1.47-6.71; *P* = .003, respectively, Cox regression).

In a multivariate analysis, LDH greater than ULN (HR, 2.51; 95% CI, 1.32-4.76) and dNLR greater than 3 (HR, 2.22; 95% CI, 1.23-4.01) were independently associated with OS, while performance status of 2 or greater (HR; 2.21, 95% CI,

1.04-4.67) and dNLR greater than 3 (HR, 1.83; 95% CI, 1.12-2.98) were independently associated with PFS (eTable 3 in the [Supplement](#)).

Lung Immune Prognostic Index (LIPI)

Baseline dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN, both independently associated with OS in the Cox proportional hazard model, were combined for the LIPI calculation. Thirty-seven patients without baseline LDH or dNLR were excluded from the LIPI analysis. Among the 126 evaluable patients, 45 (36%) had good LIPI, 62 (49%) had intermediate LIPI, and 19 (15%) had poor LIPI.

Median OS was 3 months (95% CI, 1 month to not reached [NR]) vs 10 months (95% CI, 8 months to NR) vs 34 months (95% CI, 17 months to NR) for the poor, intermediate, and good LIPI groups, respectively (*P* < .001) (eFigure 2A in the [Supplement](#)). Median PFS was 1 month (95% CI, 2 to 4 months) vs 3 months (95% CI, 2 to 5 months) vs 6 months (95% CI, 4 months to NR) for the poor, intermediate, and good LIPI groups, respectively (*P* = .001) (eFigure 2B in the [Supplement](#)). Disease control rate was also significantly correlated with the LIPI groups (*P* = .004) (eTable 4 in the [Supplement](#)). Intermediate and poor LIPI groups were associated with progressive disease as the best response to ICI (non-DCR), with an odds ratio (OR) of 3.21 (95% CI, 1.12-9.18; *P* = .03) and 8.03 (95% CI, 1.82-35.36; *P* = .006), respectively. Performance status of at least 2 at baseline was also associated with non-DCR, with an OR of 7.89 (95% CI, 1.46-42.50).

Validation Set

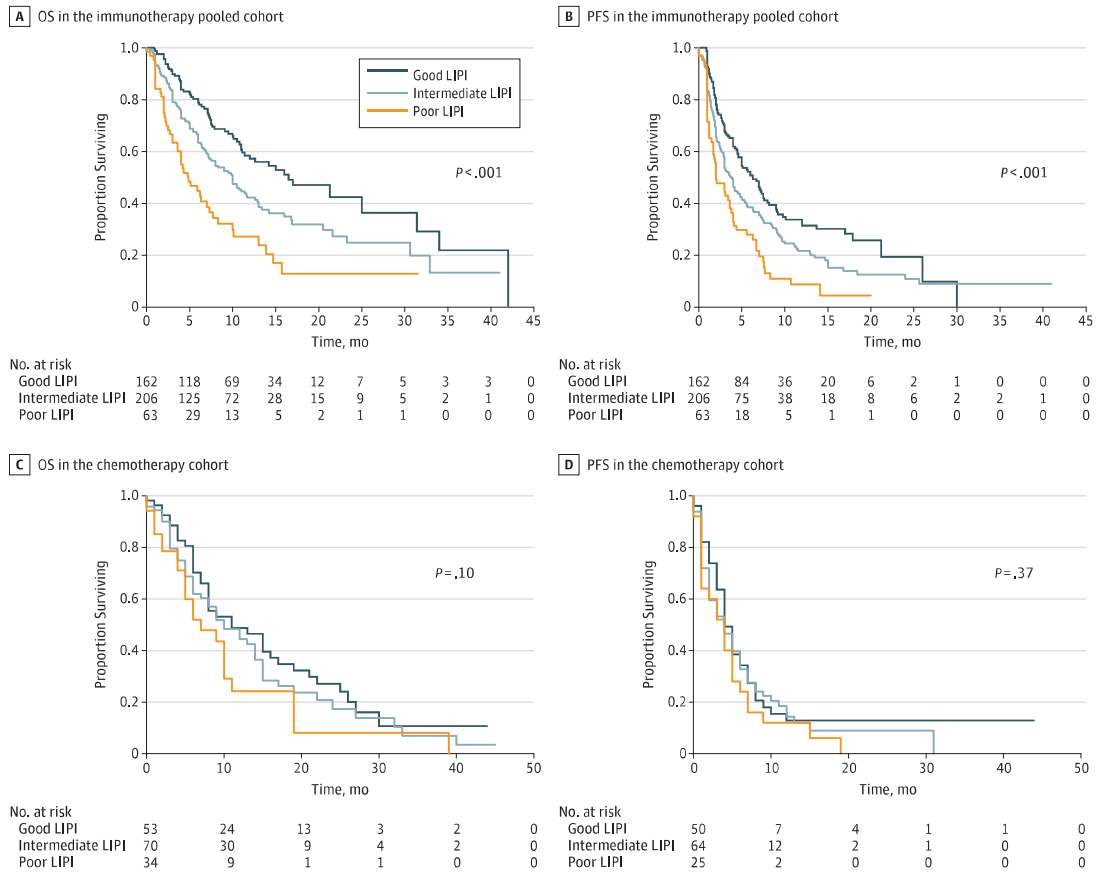
Baseline characteristics in the 305 patients in the validation set were comparable to those of the test set (eTable 1 in the [Supplement](#)). Median follow-up was 12.8 months (95% CI, 11.9-14.4 months), median OS was 10.5 months (95% CI, 8.3-12.6 months), and median PFS was 4.6 months (95% CI, 4.0-6.3 months).

Lung Immune Prognostic Index was inversely correlated with OS and PFS. For the poor (high LIPI), intermediate, and good (low LIPI) LIPI groups, median OS was 6.2 months (95% CI, 4.3 to 13.9 months) vs 10.0 months (95% CI, 7.2 to 12.9 months) vs 14.2 months (95% CI, 10.8 months to NR), respectively (*P* = .004) (eFigure 2C in the [Supplement](#)). For the poor, intermediate, and good LIPI groups, median PFS was 3.6 months (95% CI, 2.1-6.7 months) vs 4.2 months (95% CI, 3.1-6.3 months) vs 6.7 months (95% CI, 4.5-8.0 months) (*P* = .005) (eFigure 2D in the [Supplement](#)). The response rate (according to the investigator) and the DCR were also correlated with the LIPI groups (*P* < .001 and *P* = .01, respectively) (eFigure 3 and eTable 4 in the [Supplement](#)).

Pooled LIPI Population

Baseline characteristics are summarized in eTable 2 in the [Supplement](#), and in eTable 5 in the [Supplement](#) according to LIPI group. Median follow-up was 12.8 months (95% CI, 11.9-13.5 months). Median dNLR was 2.42 (interquartile range, 1.73-3.61) and was greater than 3 in 163 patients (35%). Median LDH was 248.5 U/L (interquartile range, 189-350 U/L; to convert to microkatal per liter, multiply by 0.0167), and greater than ULN in 179 patients (41%). For the overall population, LDH and dNLR

Figure. Overall Survival (OS) and Progression-Free Survival (PFS) According to Lung Immune Prognostic Index (LIPI) Groups, in the Immunotherapy Pooled Cohort and in the Chemotherapy Cohort



data were missing for 7% and 3% of the population, respectively. Overall, PD-L1 status was positive in 96 patients (21%), negative in 33 (7%) and not available in 337 patients (72%). The high rate of missing PD-L1 status was due to the fact that it was not mandatory for ICI prescription. The median number of prior lines of therapy administered before ICI therapy was 1 (range, 0-11). The overall response rate with ICI was 27% (n = 126 patients), and 32 patients (7%) had additional atypical or dissociated response patterns.

The LIPI was evaluable for 431 patients, giving 63 patients (15%) in the poor group, 206 (48%) in the intermediate group, and 162 (38%) in the good LIPI group. Median OS was 10.1 months (95% CI, 9.0-11.7 months) and median PFS was 4.0 months (95% CI, 3.4-5.0 months).

Median OS was 4.8 (95% CI, 3.6-7.7) vs 10.0 (95% CI, 7.3-12.6) vs 16.5 (95% CI, 11.4-34.0) months for the poor, intermediate, and good LIPI groups, respectively (Figure, A), and median PFS was 2.0 (95% CI, 1.7-4.0) vs 3.7 (95% CI, 3.0-4.8) vs 6.3 (95% CI, 5.0-8.0) months (both $P < .001$) (Figure, B).

The role of dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN were further validated with a resampling bootstrap procedure (1000 replications) in which all statistical analyses were replicated on each bootstrapped sample (Table 1), with this internal validation procedure reflecting the robustness of the final model. A dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN were associated with significantly shorter OS (HR, 1.70; 95% CI, 1.27-2.28; $P < .001$ and HR, 1.36; 95% CI, 1.02-1.83; $P = .04$, respectively). No differences were observed in our cohort according to PD-L1 expression (positive/negative/unknown) in terms of PFS and OS.

The LIPI was also correlated with response rate ($P < .001$). In a multivariate analysis, the intermediate and poor groups were associated with progressive disease, with an OR of 2.20 (95% CI, 1.26-3.84; $P = .005$) and 3.04 (95% CI, 1.46-6.36; $P = .003$), respectively (Table 2).

Analysis of OS according to population subgroups revealed significant correlations with the LIPI group, regardless of histologic subtype (eFigure 4 in the Supplement) and age (eFigure 5 in the Supplement). In the smoker population,

Table 1. Multivariate Analysis for Overall Survival in the Immunotherapy Pooled Cohort (Bootstrap Internal Validation)

Variable	HR (95% CI)	P Value	Internal Validation BCA HR (95% CI)
Age, y			
<70	1 [Reference]	.10	
≥70	1.35 (0.94-1.93)		0.93-1.96
Smoking history			
Nonsmoker	1 [Reference]	.89	
Smoker	0.96 (0.58-1.60)		0.60-1.66
Histologic subtype			
Nonsquamous	1 [Reference]	.10	
Squamous	1.30 (0.95-1.79)		0.94-1.87
No. of metastatic sites			
<2	1 [Reference]	.004	
≥2	1.56 (1.15-2.12)		1.11-2.22
Lines of immunotherapy			
<2	1 [Reference]	.56	
≥2	0.91 (0.67-1.24)		0.65-1.25
Performance status before immunotherapy			
0 or 1	1 [Reference]	<.001	
≥2	2.08 (1.38-3.13)		1.27-3.70
Lactate dehydrogenase (ULN)			
Low or normal	1 [Reference]	.04	
High	1.36 (1.02-1.83)		0.98-1.92
Derived neutrophil/lymphocyte ratio			
≤3	1 [Reference]	<.001	
>3	1.70 (1.27-2.28)		1.29-2.41
Albumin level, g/dL			
≥3.5	1 [Reference]	.001	
<3.5	1.69 (1.23-2.34)		1.17-2.48

Abbreviations: BCA, bias-corrected and accelerated bootstrap interval; ULN, upper limit of normal. SI conversion factors: To convert lactate dehydrogenase to microkatal per liter, multiply by 0.0167.

LIPI was correlated with OS (HR for intermediate-risk group, 1.68; 95% CI, 1.21-2.32; HR for poor-risk group, 2.82; 95% CI, 1.88-4.24; $P < .001$) (eFigure 6 in the Supplement). In the performance status 0 to 1 population, LIPI was correlated with OS (HR for intermediate-risk group, 1.70; 95% CI, 1.22-2.37; HR for poor-risk group, 3.30; 95% CI, 2.18-4.99; $P < .001$) (eFigure 7 in the Supplement). In addition, LIPI was correlated with OS for PD-L1 positive patients (HR for intermediate-risk group, 1.87; 95% CI, 0.90-3.85; HR for poor-risk group, 4.49; 95% CI, 1.97-10.24; $P = .001$) ($n = 96$ [74%]) (eFigure 8 in the Supplement). In the population without available PD-L1 status, LIPI was also associated with OS and PFS (HR for intermediate-risk group, 1.51; 95% CI, 1.07-2.14; HR for poor-risk group, 2.58; 95% CI, 1.65-4.04; $P < .001$ and HR for intermediate-risk group, 1.39; 95% CI, 1.04-1.84; HR for poor-risk group, 1.98; 95% CI, 1.34-2.92; $P = .001$, respectively; $n = 337$).

Chemotherapy-Only Cohort

In the chemotherapy cohort, the 162 patients with advanced NSCLC had a median follow-up of 25.0 months (95% CI, 21.0 months to NR). Baseline characteristics are summarized in eTable 2 in the Supplement. Patients received a median of 1 chemotherapy line (range, 1-3), which was first-line for 91 (56%) of them. Median PFS and OS were 4.0 (95% CI, 3.0-5.0) and 9.0 (95% CI, 8.0-13.0) months, respectively. Median dNLR

and LDH were 3.02 (range, 0.78-43.11) and 218 U/L (range, 109-3408 U/L), respectively. No correlation was observed in the control cohort between dNLR or LDH and OS or PFS.

Among the 157 patients evaluable for LIPI, 53 patients (34%) had a good LIPI score, 70 (45%) intermediate, and 34 (22%) poor (eTable 6 in the Supplement). No differences were observed in terms of survival according to LIPI group. Median OS was 7 (95% CI, 5-19) vs 10 (95% CI, 7-15) vs 11 (95% CI, 8-19) months for the poor, intermediate, and good groups, respectively ($P = .10$, log-rank test) (Figure, C). Median PFS was 4 months (95% CI, 1-6 months) for poor vs 4 months (95% CI, 2-6 months) for intermediate vs 4 months (95% CI, 4-7 months) for good ($P = .37$, log-rank test) (Figure, D). No correlation was observed between LIPI and response rate or DCR.

Discussion

The LIPI, based on dNLR and LDH, was used to stratify our NSCLC population into 3 groups, good, intermediate, and poor. In our overall population of 431 patients treated with ICI, median OS and PFS were 10.1 and 4.0 months, respectively, consistent with prior reports in patients with NSCLC treated with PD-1 inhibitors in second or later lines.^{1,2,5} The 15% of the population with a poor (high) LIPI were more likely to have progres-

Table 2. Logistic Regression of Clinical Benefit (Disease Control Rate) in the Immunotherapy Pooled Cohort

Variable	OR (95% CI)	P Value
Age, y		
<70		
≥70	1.06 (0.58-1.96)	.84
Smoking history		
Nonsmoker	1 [Reference]	
Smoker	0.57 (0.24-1.37)	.21
Histologic subtype		
Nonsquamous	1 [Reference]	
Squamous	1.06 (0.62-1.81)	.82
No. of metastatic sites		
≤2	1 [Reference]	
>2	1.49 (0.90-2.46)	.12
Lines of immunotherapy		
≤2	1 [Reference]	
>2	1.34 (0.81-2.22)	.25
Performance status		
0 or 1	1 [Reference]	
≥2	2.10 (1.06-4.16)	.03
LIPI groups		
Good	1 [Reference]	
Intermediate	2.20 (1.26-3.84)	.005
Poor	3.04 (1.46-6.36)	.003

Abbreviations: LIPI, lung immune prognostic index; OR, odds ratio.

sive disease as their best response to immunotherapy (OR, 3.04; $P = .003$, and had both shorter PFS (median, 2.0 months) and OS (median, 4.8 months) than those with an intermediate or good (low) LIPI ($P < .001$). On the other hand, LIPI was not associated with outcome in patients treated with chemotherapy only, providing support that it might be a predictor of benefit from ICI, a hypothesis that requires prospective validation.

In lung cancer, systemic inflammatory status has been closely correlated with worse prognosis, but mainly in early disease stages.^{12,16,17} In advanced disease, a negative impact has been observed in patients treated with platinum-based chemotherapy and targeted therapies^{16,18,19}; however, the effect of inflammatory status on immunotherapy benefit is not well known. Numerous routine blood parameters have been investigated as potential inflammatory biomarkers, including elevated neutrophils, platelets, LDH, and hypoalbuminemia, all of which are associated with poor outcomes in cancer.¹⁰⁻¹³ More recently, novel parameters, such as dNLR, have been investigated. The NLR is a well-known prognostic factor in patients with NSCLC.^{12,20} In a monocentric retrospective cohort of 175 patients treated with nivolumab, NLR of 5 or greater was associated with poor prognosis.²¹ The dNLR may be more relevant than NLR because it includes monocytes and other granulocyte subpopulations. High dNLR has been associated with shorter survival in patients with several tumor types, including melanoma, pancreas, bladder, and renal cancer.^{14,22-24} In melanoma, Ferruci et al¹⁴ reported that dNLR of 3 or greater had an independent negative effect on survival (HR, 4.10; $P < .001$) in 720 patients with melanoma treated with ipilimumab. To our knowledge, our study is the first to explore this parameter in NSCLC. Elevated

dNLR was found in 35% of the patients with NSCLC, slightly higher than the 22.5% reported by Ferruci et al¹⁴ in melanoma.

Lactate dehydrogenase level is a classic inflammatory marker in patients with cancer, widely studied in lung cancer treated with chemotherapy or targeted therapies, as well as in patients with *EGFR*-mutant NSCLC; LDH has been found to be associated with shorter survival when increased from 1 to 2.5 times ULN.^{11,25,26} In melanoma, it has a potentially predictive effect on patients treated with PD-1 and CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) inhibitors.^{15,27,28} Interestingly, Diem et al²⁷ reported that in 66 patients with melanoma treated with PD-1 inhibitors, a greater than 10% increase in LDH was significantly associated with shorter OS, reflecting the potential value of the monitoring these markers.

Recently Kargl et al²⁹ showed that neutrophils dominate the NSCLC immune landscape, being responsible for treatment failure under ICIs. In the tumor microenvironment, neutrophils can be manipulated, including early in their differentiation process, to develop different phenotypic and functional polarization states inducing antitumor or protumor effects.³⁰ In a pro-inflammatory status, this induces an “emergency granulopoiesis” that rapidly increases neutrophil generation, releasing immature or poorly differentiated neutrophils, which has been associated with tumor progression.³¹ Derived NLR may reflect this negative inflammation.

Limitations

The retrospective nature of this study implies various limitations, including missing clinical and pathological data (albeit for a low proportion of patients); a high rate of patients had unknown PD-L1 status, and when data were available, the percentage of positive expression was often not provided. It should be noted that much of the population was treated in a second- or third-line setting, in which PD-L1 status was not mandatory for prescribing the therapy in Europe. Furthermore, for patients with known status, as this was not centrally performed, methodology was heterogeneous (eg, antibodies, measurements). Another limitation is that in the validation set and chemotherapy cohort, radiological assessment was performed locally, lowering the strength of the DCR and PFS results. Finally, some patients from the poor LIPI group achieved clinical benefit—possibly because automated neutrophil counts do not discriminate between the different subpopulations of neutrophils that could have protumor or antitumor functions.^{29,30}

Conclusions

Poor baseline LIPI, combining dNLR greater than 3 and LDH greater than ULN, was correlated with poor outcomes with immunotherapy, but not chemotherapy, raising the hypothesis that LIPI might be useful for identifying patients unlikely to benefit from treatment.

The assessment of LIPI in association with PD-L1 expression should be explored in future prospective clinical trials and will contribute to defining the prognostic and/or predictive value of LIPI. Moreover, LIPI could also be used to stratify patients in randomized studies.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: October 11, 2017.

Published Online: January 11, 2018.
doi:10.1001/jamaoncol.2017.4771

Author Affiliations: Medical Oncology Department, Gustave Roussy, Villejuif, France (Mezquita, Ferrara, Remon, Planchar, Lahmar, Besse); Medical and Gastrointestinal Oncology Department, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France (Auclin); Laboratory of Immunomonitoring in Oncology, UMS 3655 CNRS/US 23 INSERM, Gustave Roussy, Villejuif, France (Charrier, Chaput); Medical Oncology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain (Ponce, Ares); Medical Oncology Department, Institut Bergonié, Bordeaux, France (Leroy); Pneumology Department, Centre Hospitalier Toulon Sainte-Musse, Toulon, France (Audigier-Valette); Medical Oncology Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain (Felip, Zerón-Medina); Medical Oncology Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain (Garrido); Thoracic Oncology Department, CICI425/CLIP2 Paris-Nord, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France (Brosseau, Zalzman); Medical Oncology Department, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France (Mazieres); Radiology Department, Gustave Roussy, Villejuif, France (Caramela); Pathology Department, Gustave Roussy, Villejuif, France (Adam); Faculty of Pharmacy, University Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, France (Chaput); Drug Development Department, Gustave Roussy, Villejuif, France (Sorria); Faculty of Medicine, University Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France (Sorria, Besse).

Author Contributions: Drs Mezquita and Auclin had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Mezquita, Auclin, Paz-Ares, Brosseau, Zalzman, Chaput, Sorria, Besse.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Mezquita, Auclin, Ferrara, Charrier, Remon, Planchar, Ponce, Leroy, Audigier-Valette, Felip, Zerón-Medina, Garrido, Mazieres, Caramella, Lahmar, Adam, Besse.

Drafting of the manuscript: Mezquita, Auclin, Charrier, Lahmar, Chaput.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Mezquita, Auclin, Ferrara, Remon, Planchar, Ponce, Paz-Ares, Leroy, Audigier-Valette, Felip, Zerón-Medina, Garrido, Brosseau, Zalzman, Mazieres, Caramella, Adam, Chaput, Sorria, Besse.

Statistical analysis: Mezquita, Auclin, Planchar. **Administrative, technical, or material support:** Mezquita, Charrier, Audigier-Valette, Felip, Zerón-Medina, Caramella, Chaput, Sorria.

Study supervision: Mezquita, Planchar, Ponce, Paz-Ares, Garrido, Brosseau, Zalzman, Mazieres, Caramella, Besse.

Conflict of Interest Disclosures: None reported.

Additional Contributions: Sarah MacKenzie, PhD, provided medical writing services funded by Gustave Roussy.

REFERENCES

- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
- Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-135.
- Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833.
- Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al; OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-265.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-2028.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- Zhu L, Li X, Shen Y, et al. A new prognostic score based on the systemic inflammatory response in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Oncol Targets Ther*. 2016;9:4879-4886.
- Laird BJA, Fallon M, Hjermstad MJ, et al. Quality of life in patients with advanced cancer: differential association with performance status and systemic inflammatory response. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2769-2775.
- McMillan DC. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(5):534-540.
- Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, et al. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol*. 2015;54(7):961-970.
- Paramanathan A, Saxena A, Morris DL. A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surg Oncol*. 2014;23(1):31-39.
- Templeton AJ, Ace O, McNamara MG, et al. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(7):1204-1212.
- Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol*. 2016;27(4):732-738.
- Weide B, Martens A, Hassel JC, et al. Baseline biomarkers for outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res*. 2016;22(22):5487-5496.
- Song Y-J, Wang L-X, Hong Y-Q, et al. Lymphocyte to monocyte ratio is associated with response to first-line platinum-based chemotherapy and prognosis of early-stage non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol*. 2016;37(4):5285-5293.
- Cannon NA, Meyer J, Iyengar P, et al. Neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios as prognostic factors after stereotactic radiation therapy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(2):280-285.
- Chen Y-M, Lai C-H, Chang H-C, et al. Baseline and trend of lymphocyte-to-monocyte ratio as prognostic factors in epidermal growth factor receptor mutant non-small cell lung cancer patients treated with first-line epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136252.
- Han Y, Wang J, Hong L, et al. Platelet-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*. 2017;13(1):51-61.
- Gu X-B, Tian T, Tian X-J, Zhang X-J. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:12493.
- Bagley SJ, Kothari S, Aggarwal C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;106:1-7.
- Suzuki R, Takagi T, Hikichi T, et al. Derived neutrophil/lymphocyte ratio predicts gemcitabine therapy outcome in unresectable pancreatic cancer. *Oncol Lett*. 2016;11(5):3441-3445.
- van Kessel KEM, de Haan LM, Fransen van de Putte EE, et al. Elevated derived neutrophil-to-lymphocyte ratio corresponds with poor outcome in patients undergoing pre-operative chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Bladder Cancer*. 2016;2(3):351-360.
- Amato RJ, Flaherty A, Zhang Y, Ouyang F, Mohlere V. Clinical prognostic factors associated with outcome in patients with renal cell cancer with prior tyrosine kinase inhibitors or immunotherapy treated with everolimus. *Urol Oncol*. 2014;32(3):345-354.
- Fiala O, Pesek M, Finek J, et al. Change in serum lactate dehydrogenase is associated with outcome of patients with advanced-stage NSCLC treated with erlotinib. *Anticancer Res*. 2016;36(5):2459-2465.
- Inomata M, Hayashi R, Tanaka H, et al. Elevated levels of plasma lactate dehydrogenase is an unfavorable prognostic factor in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer, receiving treatment with gefitinib or erlotinib. *Mol Clin Oncol*. 2016;4(5):774-778.
- Diem S, Kasenda B, Spain L, et al. Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2016;114(3):256-261.
- Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(5):449-458.
- Kargl J, Busch SE, Yang GHY, et al. Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nat Commun*. 2017;8:14381.
- Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2015;8(3):125-158.
- Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(7):431-446.

REFERENCES DE LA THESE

1. Institut National du Cancer. Les cancers en France en 2015, l'essentiel des faits et chiffres [Internet]. 2016. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2015-L-essentiel-des-faits-et-chiffres>
2. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System Tumours. 5th ed. (WHO Classification of Tumours; vol. 1).
3. Lecomte T, André T, Panis Y, Laurent-Puig P, Bibeau F, Taieb J. Cancer du Colon. In: Thésaurus National de Cancérologie Digestive [Internet]. 2016. Available from: <http://www.tncd.org>
4. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi64–72.
5. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264–71.
6. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 Dec 15;370(9604):2020–9.
7. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet Lond Engl*. 1995 Apr 15;345(8955):939–44.
8. André T, de Gramont 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Dec 10;33(35):4176–87.
9. 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 Jun 3;350(23):2343–51.
10. Zaniboni A, Labianca R, Marsoni S, Torri V, Mosconi P, Grilli R, et al. GIVIO-SITAC 01: A randomized trial of adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid administered to patients with colon carcinoma—long term results and evaluation of the indicators of health-related quality of life. *Gruppo Italiano Valutazione Interventi in Oncologia. Studio Italiano Terapia Adiuvante Colon. Cancer*. 1998 Jun 1;82(11):2135–44.
11. André T, Quinaux E, Louvet C, Colin P, Gamelin E, Bouche O, et al. Phase III study comparing a semimonthly with a monthly regimen of fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for stage II and III colon cancer patients: final results of GERCOR C96.1. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3732–8.
12. Köhne C-H, Bedenne L, Carrato A, Bouché O, Popov I, Gaspà L, et al. A randomised phase III intergroup trial comparing high-dose infusional 5-fluorouracil with or without folinic acid with standard bolus 5-fluorouracil/folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer:

- the Pan-European Trial in Adjuvant Colon Cancer 2 study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2013 May;49(8):1868–75.
13. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jun 30;352(26):2696–704.
 14. Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S, Borner M, Burns WI, Burris HA, et al. Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2003 Dec;14(12):1735–43.
 15. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3768–74.
 16. Schmoll H-J, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Nov 10;33(32):3733–40.
 17. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1465–71.
 18. Ychou M, Raoul J-L, Douillard J-Y, Gourgou-Bourgade S, Bugat R, Mineur L, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2009 Apr;20(4):674–80.
 19. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3456–61.
 20. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3117–25.
 21. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):11–6.
 22. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):359–64.
 23. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll H-J, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 Dec;13(12):1225–33.
 24. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, et al. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2012 Apr 4;307(13):1383–93.

25. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem J-L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):862–73.
26. Des Guetz G, Nicolas P, Perret G-Y, Morere J-F, Uzzan B. Does delaying adjuvant chemotherapy after curative surgery for colorectal cancer impair survival? A meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2010 Apr;46(6):1049–55.
27. Gao P, Huang X-Z, Song Y-X, Sun J-X, Chen X-W, Sun Y, et al. Impact of timing of adjuvant chemotherapy on survival in stage III colon cancer: a population-based study. *BMC Cancer.* 2018 01;18(1):234.
28. Kim YW, Choi EH, Kim BR, Ko W-A, Do Y-M, Kim IY. The impact of delayed commencement of adjuvant chemotherapy (eight or more weeks) on survival in stage II and III colon cancer: a national population-based cohort study. *Oncotarget.* 2017 Oct 3;8(45):80061–72.
29. Turner MC, Farrow NE, Rhodin KE, Sun Z, Adam MA, Mantyh CR, et al. Delay in Adjuvant Chemotherapy and Survival Advantage in Stage III Colon Cancer. *J Am Coll Surg.* 2018 Apr;226(4):670–8.
30. Sadahiro S, Tsuchiya T, Sasaki K, Kondo K, Katsumata K, Nishimura G, et al. Randomized phase III trial of treatment duration for oral uracil and tegafur plus leucovorin as adjuvant chemotherapy for patients with stage IIB/III colon cancer: final results of JFMC33-0502. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 Nov;26(11):2274–80.
31. O’Connell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ, Erlichman C, Shepherd L, et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1998 Jan;16(1):295–300.
32. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O’Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8671–8.
33. Chau I, Norman AR, Cunningham D, Iveson T, Hill M, Hickish T, et al. Longitudinal quality of life and quality adjusted survival in a randomised controlled trial comparing six months of bolus fluorouracil/leucovorin vs. twelve weeks of protracted venous infusion fluorouracil as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2005 Jul;41(11):1551–9.
34. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2018 29;378(13):1177–88.
35. Sobrero A, Lonardi S, Rosati G, Di Bartolomeo M, Ronzoni M, Pella N, et al. FOLFOX or CAPOX in Stage II to III Colon Cancer: Efficacy Results of the Italian Three or Six Colon Adjuvant Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 Apr 5;JCO2017762187.
36. André T, Vernerey D, Mineur L, Bennouna J, Desrame J, Faroux R, et al. Three Versus 6 Months of Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy for Patients With Stage III Colon Cancer: Disease-Free Survival Results From a Randomized, Open-Label, International Duration Evaluation of Adjuvant (IDEA) France, Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 May 20;36(15):1469–77.

37. Kotaka M, Yamanaka T, Yoshino T, Manaka D, Eto T, Hasegawa J, et al. Safety data from the phase III Japanese ACHIEVE trial: part of an international, prospective, planned pooled analysis of six phase III trials comparing 3 versus 6 months of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *ESMO Open*. 2018;3(3):e000354.
38. Iveson TJ, Kerr RS, Saunders MP, Cassidy J, Hollander NH, Tabernero J, et al. 3 versus 6 months of adjuvant oxaliplatin-fluoropyrimidine combination therapy for colorectal cancer (SCOT): an international, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2018 Apr;19(4):562–78.
39. Lonardi S, Sobrero A, Rosati G, Di Bartolomeo M, Ronzoni M, Aprile G, et al. Phase III trial comparing 3-6 months of adjuvant FOLFOX4/XELOX in stage II-III colon cancer: safety and compliance in the TOSCA trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(11):2074–81.
40. Snaebjornsson P, Coupe VMH, Jonasson L, Meijer GA, van Grieken NC, Jonasson JG. pT4 stage II and III colon cancers carry the worst prognosis in a nationwide survival analysis. Shepherd's local peritoneal involvement revisited. *Int J Cancer*. 2014 Jul 15;135(2):467–78.
41. Huh JW, Lee JH, Kim HR, Kim YJ. Prognostic significance of lymphovascular or perineural invasion in patients with locally advanced colorectal cancer. *Am J Surg*. 2013 Nov;206(5):758–63.
42. Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN. Lymph node ratio: role in the staging of node-positive colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jun;15(6):1600–8.
43. Zare Mirzaei A, Abdorrazaghi F, Lotfi M, Kazemi Nejad B, Shayanfar N. Prognostic Value of Lymph Node Ratio in Comparison to Lymph Node Metastases in Stage III Colon Cancer. *Iran J Pathol*. 2015;10(2):127–35.
44. Sabbagh C, Mauvais F, Cosse C, Rebibo L, Joly J-P, Dromer D, et al. A lymph node ratio of 10% is predictive of survival in stage III colon cancer: a French regional study. *Int Surg*. 2014 Aug;99(4):344–53.
45. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2654–66.
46. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5944–51.
47. 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 Jan;232(2):199–209.
48. Galon J, Mlecnik B, Marliot F, Ou F-S, Bifulco CB, Lugli A, et al. Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *J Clin Oncol [Internet]*. 2016 [cited 2016 Dec 14];34(suppl; abstr 3500). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/168666-176>
49. Emile J-F, Malicot KL, Tabernero J, Mini E, Folprecht G, Laethem J-LV, et al. Validation of the prognostic impact of lymphocyte infiltration (LI) in patients (pts) with stage III colon cancer (CC) treated with adjuvant FOLFOX+/- cetuximab: A PETACC8 translational study. *J Clin Oncol*

- [Internet]. 2016 [cited 2016 Dec 14];34(suppl 4S; abstr 553). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/158705-173>
50. Allard M-A, Bachet JB, Beauchet A, Julie C, Malafosse R, Penna C, et al. Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: a reproducible method, developed with colorectal cancer tissues, for assessing a highly variable prognostic factor. *Diagn Pathol*. 2012;7:156.
 51. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2015 Dec;6(6):676–84.
 52. 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 Jun 8;103(11):863–75.
 53. 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* [Internet]. 2014 [cited 2016 Dec 14];32:5s(suppl; abstr 3507). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/134364-144>
 54. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1261–70.
 55. Zaanan A, Fléjou J-F, Emile J-F, Des GG, Cuilliere-Dartigues P, Malka D, et al. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7470–8.
 56. Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R, et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Nov 7;104(21):1635–46.
 57. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Oct 10;31(29):3664–72.
 58. Zaanan A, Shi Q, Taieb J, Alberts SR, Smyrk TC, Julie C, et al. Analysis of DNA mismatch repair (MMR) and clinical outcome in stage III colon cancers from patients (pts) treated with adjuvant FOLFOX +/- cetuximab in the PETACC8 and NCCTG N0147 adjuvant trials. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2016 Dec 14];33(suppl; abstr 3506). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/146390-156>
 59. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*. 2011 May 1;117(9):1847–54.
 60. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Aug 1;9(8):2898–903.

61. Shiovitz S, Bertagnolli MM, Renfro LA, Nam E, Foster NR, Dzieciatkowski S, et al. CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan-based therapy for stage III colon cancer. *Gastroenterology*. 2014 Sep;147(3):637–45.
62. Gallois C, Taieb J, Le Corre D, Le Malicot K, Tabernero J, Mulot C, et al. Prognostic Value of Methylator Phenotype in Stage III Colon Cancer Treated with Oxaliplatin-based Adjuvant Chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Oct 1;24(19):4745–53.
63. 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 Oct 15;117(20):4623–32.
64. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):466–74.
65. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Aug 7;105(15):1151–6.
66. 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 Jan 14;1–11.
67. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):88–99.
68. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Feb 1;18(3):890–900.
69. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, Penault-Llorca F, Bouché O, Tabernero J, et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(5).
70. Mireia GR, Gallach S, Jantus-Lewintre E, Safont MJ, Luisa GMM, Garde-Noguera J, et al. Molecular subtyping of colon cancer (CC) based on mutational status of RAS, BRAF, and DNA mismatch repair (MMR) proteins. Prognostic value. *J Clin Oncol [Internet]*. 2016 [cited 2016 Dec 14];34(suppl; abstr e15094). Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/169385-176>
71. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res*. 2014 Jun 15;74(12):3238–47.
72. Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, Dahlin AM, Jonsson B-A, Öberg Å, et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013 May 28;108(10):2153–63.

73. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julié C, Zaanan A, Tabernero J, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2014 Dec;25(12):2378–85.
74. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the “RASCAL II” study. *Br J Cancer*. 2001 Sep 1;85(5):692–6.
75. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Jun 1;20(11):3033–43.
76. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 19;487(7407):330–7.
77. 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 Nov;21(11):1350–6.
78. Yothers G, O’Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Dec 20;31(36):4512–9.
79. Jiang Y, Casey G, Lavery IC, Zhang Y, Talantov D, Martin-McGreevy M, et al. Development of a clinically feasible molecular assay to predict recurrence of stage II colon cancer. *J Mol Diagn JMD*. 2008 Jul;10(4):346–54.
80. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):17–24.
81. Di Narzo AF, Tejpar S, Rossi S, Yan P, Popovici V, Wirapati P, et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Oct;106(10).
82. Renfro LA, Grothey A, Xue Y, Saltz LB, André T, Twelves C, et al. ACCENT-based web calculators to predict recurrence and overall survival in stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Dec;106(12).
83. Colorectal Cancer Nomograms [Internet]. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. [cited 2016 Jun 22]. Available from: <https://www.mskcc.org/nomograms/colorectal>
84. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1797–806.
85. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JPA, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2015 Jan 6;162(1):W1–73.
86. de Gramont A, Hubbard J, Shi Q, O’Connell MJ, Buyse M, Benedetti J, et al. Association between disease-free survival and overall survival when survival is prolonged after recurrence

- in patients receiving cytotoxic adjuvant therapy for colon cancer: simulations based on the 20,800 patient ACCENT data set. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):460–5.
87. Vernerey D. Méthodologie statistique pour la prédiction du risque et la construction de score pronostique en oncologie et transplantation rénale: une pierre angulaire de la médecine de précision.
 88. Royston P, Altman DG. Regression using fractional polynomials of continuous covariates: Parsimonious parametric modelling. *Appl Stat*. 1994;43(3):429.
 89. Greenland S. Previous research on power loss associated with categorization in dose-response and trend analysis. *Epidemiol Camb Mass*. 1995 Nov;6(6):641–2.
 90. Altman DG, Royston P. The cost of dichotomising continuous variables. *BMJ*. 2006 May 6;332(7549):1080.
 91. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using “optimal” cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Jun 1;86(11):829–35.
 92. Connor R. Grouping for testing trends in categorical data. *J Am Stat Assoc*. 1972;
 93. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal*. 2003;
 94. Kaplan E, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53:282, 457-481. 1958;
 95. Rich JT, Neely JG, Paniello RC, Voelker CCJ, Nussenbaum B, Wang EW. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2010 Sep;143(3):331–6.
 96. Peto R, Peto J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *J R Stat Soc Ser Gen*. 1972 Mar 1;135(2):185–98.
 97. Kay R. Goodness of fit methods for the proportional hazards regression model: a review. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1984;32(3-4):185–98.
 98. Iasonos A, Schrag D, Raj GV, Panageas KS. How to build and interpret a nomogram for cancer prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1364–70.
 99. Jr FEH. *Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic and Ordinal Regression, and Survival Analysis*. Springer; 2015. 598 p.
 100. Senter HF. Applied Linear Statistical Models,. *Journal of the American Statistical Association*, 103:482, 880, DOI: 10.1198/016214508000000300. 2008;
 101. Harrell FE, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med*. 1996 Feb 28;15(4):361–87.

102. Uno H, Cai T, Pencina MJ, D'Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med*. 2011 May 10;30(10):1105–17.
103. Efron B, Tibshirani RJ. *An Introduction to the Bootstrap*. CRC Press; 1994. 456 p.
104. Cox D. Note on grouping. *J Am Stat Assoc* 52: 543-547. 1957;
105. Margalit O, Mamtani R, Yang Y-X, Reiss KA, Golan T, Halpern N, et al. Assessing the prognostic value of carcinoembryonic antigen levels in stage I and II colon cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2018 Mar 1;94:1–5.
106. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):309–15.
107. Moreno García V, Cejas P, Blanco Codesido M, Feliu Batlle J, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C, et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Jul;24(7):741–8.
108. Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic factors in 2230 Korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg*. 1999 Jul;23(7):721–6.
109. Giessen-Jung C, Nagel D, Glas M, Spelsberg F, Lau-Werner U, Modest DP, et al. Preoperative serum markers for individual patient prognosis in stage I-III colon cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Sep;36(10):7897–906.
110. Nicholson BD, Shinkins B, Mant D. Blood Measurement of Carcinoembryonic Antigen Level for Detecting Recurrence of Colorectal Cancer. *JAMA*. 2016 Sep 27;316(12):1310–1.
111. Weiser MR, Gönen M, Chou JF, Kattan MW, Schrag D. Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Dec 20;29(36):4796–802.
112. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, Phipps AI, Tejpar S, Nesbakken A, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 01;28(5):1023–31.
113. Lepage C, Phelip J-M, Cany L, Faroux R, Manfredi S, Ain J-F, et al. Effect of 5 years of imaging and CEA follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: The FFCD PRODIGE 13 randomised phase III trial. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2015 Jul;47(7):529–31.
114. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D, et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):351–7.