



**HAL**  
open science

# Instabilité des microsatellites et cancer : mise à profit du séquençage de nouvelle génération pour l'identification de ce phénotype tumoral et l'analyse des mécanismes de résistance à l'immunothérapie

Toky Ratovomanana

## ► To cite this version:

Toky Ratovomanana. Instabilité des microsatellites et cancer : mise à profit du séquençage de nouvelle génération pour l'identification de ce phénotype tumoral et l'analyse des mécanismes de résistance à l'immunothérapie. Cancer. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS394 . tel-03691263

**HAL Id: tel-03691263**

**<https://theses.hal.science/tel-03691263>**

Submitted on 9 Jun 2022

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

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



SORBONNE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE PHYSIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE (ED394)

Centre de Recherche Saint-Antoine UMR\_S 938, INSERM

Équipe « Instabilité des Microsatellites & Cancers »

THÈSE DE DOCTORAT  
Spécialité Génétique des Tumeurs

---

# Instabilité des Microsatellites et Cancer : Mise à profit du Séquençage de Nouvelle Génération pour l'Identification de ce phénotype Tumoral et l'Analyse des Mécanismes de Résistance à l'Immunothérapie

---

PRÉSENTÉ PAR  
TOKY RATOVOMANANA

DIRIGÉ PAR LE PROFESSEUR ALEX DUVAL, PU-PH

Présentée et soutenue publiquement le 08 décembre 2021

Devant un jury composé de :

PR PIERRE AUCOUTURIER  
PR JANICK SELVES  
PR AZIZ ZAANAN  
DR PATRICIA KANNOUCHE  
DR AGUSTI ALENTORN  
DR ROMAIN COHEN  
DR VINCENT JONCHERE  
PR ALEX DUVAL

PRÉSIDENT  
RAPPORTEURE  
RAPPORTEUR  
EXAMINATRICE  
EXAMINATEUR  
ENCADRANT  
ENCADRANT  
DIRECTEUR DE THÈSE



## Résumé

L'instabilité des séquences microsatellites de l'ADN (MSI) signe un phénotype tumoral fréquent associé à de nombreux cancers chez l'homme, dont le cancer colorectal (CCR). Elle est consécutive à la déficience du système MMR dans les cellules tumorales (statut MMRd pour mismatch repair deficient), engendrant un mode original de carcinogenèse caractérisé en particulier par l'expression massive de nombreux néoantigènes à l'origine d'une immunité adaptative importante de l'hôte contre la tumeur (paradigme de tumeur chaude hypermutante et hyper immunogène). Sur un plan clinique, les cancers MSI ont ces dernières années grandement bénéficié de l'avènement des inhibiteurs de protéines du point de contrôle immunitaire (ICKi pour Immune Checkpoint Inhibiteurs), qui ont permis d'importants progrès thérapeutiques, en particulier pour le traitement des malades avec un cancer MSI métastatique. A l'ère de l'immunothérapie, la détection du phénotype MSI représente donc un enjeu majeur en oncologie clinique. Un autre défi est de détecter aujourd'hui au décours les facteurs prédictifs de sensibilité ou de résistance à ces nouvelles thérapies de précision chez les patients.

Dans une première partie de ma thèse, j'ai travaillé à la détection du phénotype MSI dans le cancer, en particulier dans le CCR, avec une méthode moderne de séquençage, à haut débit de l'ADN tumoral (séquençage NGS, Next generation Sequencing). L'analyse du génome d'une large série de tumeurs colorectales (Exome sequencing et/ou par panel ciblé) m'a permis de montrer que la méthode diagnostique, pourtant utilisée aujourd'hui comme référence aux États-Unis pour diagnostiquer le phénotype MSI par NGS (agrément FDA, Food and Drug Administration), était peu performante (manque de sensibilité, nombreux faux cas négatifs, en particulier au stade métastatique). J'ai dans ces conditions développé un algorithme alternatif, MSICare, et démontré les performances optimales de ce nouvel outil diagnostique [Sensibilité et Spécificité de 100%] ([Ratovomanana et al. Gastroenterology 2021](#) et Brevet EP21305121). Les perspectives sont aujourd'hui de démontrer les performances élevées de l'outil MSICare en pan-Cancer, afin de le hisser aux conditions où il pourrait faire autorité demain en routine clinique pour la médecine de précision des patients.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai travaillé à l'identification de marqueurs génomiques prédictifs de la réponse au ICKi chez les patients avec un CCR métastatique MSI traités par ICKi. J'ai analysé avec cet objectif l'exome et le transcriptome (RNAseq) d'une cohorte tirée d'un essai clinique mené à l'hôpital Saint-Antoine (Essai clinique NIPICOL, NCT033501260, 30 patients traités par combo-thérapie anti-PD1 et anti CTLA4). Les résultats sont encourageants et permettent d'identifier des marqueurs ADN et ARN prédictif de l'efficacité des ICKi chez ces malades. Néanmoins, il faut absolument valider ces données par l'étude d'une cohorte supplémentaire de patients (Cohorte ImmunoMSI, 39 patients traités par anti-PD1 en monothérapie et de 28 patients traités par la même combothérapie anti-PD1+anti-CTLA4). Je compléterai cette partie en fonction de l'avancée de ces analyses d'ici ma soutenance (Ratovomanana et al., en préparation).

Dans une dernière partie de ce doctorat, j'ai participé à différents travaux connexes que je présente sur le même champs thématique et qui ont fait l'objet de 3 publications annexées à mon manuscrit de thèse ([Jonchere et al.](#), CMGH 2018 ; [Cohen et al.](#), J Immunother. Cancer 2021; Renaud et al., soumis).

# Table des Matières

<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>2</b>
<b>1 Le système MMR et les conséquences de son inactivation</b>	<b>2</b>
1.1 Rôle du système MMR . . . . .	2
1.1.1 La réparation des mésappariements . . . . .	3
1.1.2 Efficacité de la réparation MMR . . . . .	5
1.2 Conséquences de l'inactivation du système MMR . . . . .	6
1.2.1 Phénotype d'Instabilité des microsatellites . . . . .	7
1.2.2 Immunogénicité et Microenvironnement tumoral . . . . .	18
<b>2 Les cancers de phénotype MSI</b>	<b>24</b>
2.1 Caractéristiques cliniques et épidémiologiques . . . . .	24
2.1.1 Prévalence des cancers MSI . . . . .	25
2.1.2 Syndrome de Lynch . . . . .	26
2.1.3 CMMRD . . . . .	28
2.2 Caractéristiques physiopathologiques et rôle pronostique . . . . .	29
2.2.1 Cancer colorectal MSI localisé . . . . .	30
2.2.2 Cancer colorectal MSI métastatique . . . . .	33
<b>3 Diagnostic des cancers MSI</b>	<b>36</b>
3.1 Méthodes standards de diagnostic du statut MSI/MMRd . . . . .	37
3.1.1 L'immunohistochimie (IHC) . . . . .	37
3.1.2 Les tests moléculaires PCR . . . . .	37
3.1.3 Discordance IHC/PCR pentaplex . . . . .	39
3.2 Méthode émergente pour le diagnostic MSI . . . . .	41
3.2.1 Panels de gènes . . . . .	41
3.2.2 Diagnostic via l'ADN tumoral Circulant . . . . .	42
3.2.3 Outils bio-informatiques pour le diagnostic MSI : . . . . .	43
3.2.4 Autres outils basés sur la charge mutationnelle . . . . .	46
3.3 Bilan et futures directions . . . . .	47
<b>4 Immunothérapie et traitements des tumeurs solides MSI</b>	<b>48</b>
4.1 L'immunologie des cancers . . . . .	49
4.1.1 L'immunité anti tumorale . . . . .	49
4.1.2 L'échappement à la surveillance immunitaire . . . . .	50
4.1.3 Echappement Immunitaire dans les cancers MSI . . . . .	56
4.2 Immunothérapies pour le traitement des cancers MSI . . . . .	58
4.2.1 Stratégie d'Inhibition de points de contrôle immunitaire (ICKi) . . . . .	58
4.2.2 Effets secondaires . . . . .	59
4.2.3 Emergence de l'immunothérapie pour les cancers MSI . . . . .	62

4.3	Biomarqueurs de la réponse à l'immunothérapie chez les patients avec un cancer MSI . . . . .	64
4.3.1	Erreurs diagnostiques . . . . .	65
4.3.2	Pseudoprogession . . . . .	65
4.3.3	La charge mutationnelle tumorale et les néo-antigènes . . . . .	65
4.3.4	Mutation de B2M . . . . .	67
4.3.5	Expression de PD-1/PD-L1 . . . . .	68
4.3.6	Le taux de lymphocytes et leucocytes . . . . .	68
4.3.7	Microenvironnement stromal et fibroblastes associés aux tumeurs . . . . .	69
4.3.8	Autres bio marqueurs de la réponse au ICKi . . . . .	70
4.3.9	Bilan et défis . . . . .	70
4.4	Immunothérapie : Futures directions . . . . .	71
4.4.1	Cibler des points de contrôle immunitaires alternatifs . . . . .	71
4.4.2	Développement de l'immunothérapie dans les stades précoces . . . . .	72
4.4.3	Développements en situation prophylactique . . . . .	73
 <b>TRAVAUX DE RECHERCHE</b>		 <b>76</b>
<b>5</b>	<b>Résultats</b>	<b>76</b>
5.1	Article 1: Diagnostic de l'instabilité des microsatellites par NGS . . . . .	76
5.2	Article 2: Mécanismes de résistance aux Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire chez les patients MMRd/MSI . . . . .	98
<b>6</b>	<b>Annexes: Articles en co-auteurs &amp; Brevet</b>	<b>99</b>
6.1	Articles en co-auteurs . . . . .	99
6.1.1	Article 3: Sélection et contre-sélection des mutations dans la tumorigenèse MSI . . . . .	101
6.1.2	Article 4: Glande surrénale, un site sanctuaire pour l'immunothérapie . . . . .	126
6.1.3	Article 5: Impact du statut HSP110 T17 chez les patients atteints d'un cancer MSI gastrique résecable . . . . .	138
6.2	Brevet: Méthode de diagnostic des cancers MSI . . . . .	142
 <b>Conclusion, Discussion et perspectives</b>		 <b>197</b>
<b>7</b>	<b>Discussion &amp; Perspectives :</b>	<b>197</b>
7.1	Développement du diagnostic MSI en NGS pan-tumoral . . . . .	197
7.2	Autres approches MSI sur des échantillons de tissus tumoraux . . . . .	199
7.3	Vers les tests MSI en biopsie liquide . . . . .	200
7.4	TMB et réponse à l'immunothérapie . . . . .	202
7.5	Importance de l'environnement tumoral dans la résistance au ICKi . . . . .	203
 <b>Bibliographie</b>		 <b>204</b>

# Liste des Figures

Figure 1:	Mécanisme d'identification et de réparation des més-appariements par le système MMR . . . . .	5
Figure 2:	Répartitions des séquences ainsi que des mutations répétées et non-répétées dans les tumeurs MMRd/MSI chez l'humain . . . . .	8
Figure 3:	Distribution et conséquences de l'instabilité des microsattellites dans le génome humain . . . . .	9
Figure 4:	Mutation d'un microsattellite codant et oncogénèse MSI	12
Figure 5:	Distribution des fréquences de mutations des microsattellites en fonction de la longueur de répétition. . . . .	17
Figure 6:	Interactions tumeur-cellule immunitaire dans le cancer MSI . . . . .	21
Figure 7:	Le microenvironnement tumoral des CCR MMRd-MSI et MMRp-MSS . . . . .	23
Figure 8:	Prévalence de l'instabilité des microsattellites (MSI) dans 39 types de cancers humains . . . . .	26
Figure 9:	Survie globale du CMMRD selon le type de tumeur .	29
Figure 10:	Détermination du statut MSI (microsattellite instability) des tumeurs. . . . .	40
Figure 11:	Mécanismes d'échappement immunitaire dans le cancer. . . . .	51
Figure 12:	Le microenvironnement immunosuppresseur . . . . .	52
Figure 13:	Les points de contrôle de l'immunité permettent un équilibre de la réponse immunitaire . . . . .	54
Figure 14:	Mécanisme d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales. . . . .	55
Figure 15:	Molécules de co-stimulation activatrices et inhibitrices au cours de l'activation des lymphocytes T (LT). . . . .	57
Figure 16:	Spectre de toxicité des agents de blocage des points de contrôle immunitaires. . . . .	61
Figure 17:	Bénéfice clinique du traitement par pembrolizumab en fonction du statut MMR . . . . .	62
Figure 18:	Effet des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire sur la survie des patients atteints de tumeurs à TMB élevée. . . . .	67

# Liste des Tables

Tableau 1: Les protéines du système MisMatch Repair et les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements chez l'humain . . . . .	3
Tableau 2 : Epidémiologie analytique du phénotype MSI dans les principales localisations tumorales . . . . .	30
Tableau 3 : Exemples d'outils bioinformatiques pour le diagnostic MSI . . .	44
Tableau 4 : Principales toxicités des inhibiteurs de point de contrôle immunitaires . . . . .	60



# Liste des abréviations

<b>5-FU</b>	5-Fluoro-Uracile
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>B2M</b>	Beta-2-Microglobulin
<b>CCR</b>	Cancer ColoRecta
<b>CMMRD</b>	Constitutional MisMatch Repair Deficiency, syndrome de déficience constitutionnelle du système de réparation des mésappariements
<b>CTL</b>	Cytotoxic T Lymphocyte, lymphocyte T cytotoxique
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
<b>EMA</b>	European Medicines Agency, Agence européenne des médicaments
<b>EXO1</b>	EXOnucléase 1
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HR</b>	Hazard ratio
<b>ICK</b>	Immune Checkpoint
<b>ICKi</b>	Immune Checkpoint Inhibiteur
<b>IHC</b>	ImmunoHistoChimie
<b>MMR</b>	MisMatch Repair, système de réparation des mésappariements
<b>MMRd</b>	MisMatch Repair déficient
<b>MMRp</b>	MisMatch Repair proficient
<b>MSI</b>	MicroSatellite Instable

<b>MSS</b>	MicroSatellite Stable
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing, séquençage de nouvelle génération
<b>NMD</b>	Nonsense-Mediated Decay (dégradation des ARN non-sens)
<b>OS</b>	Overall survival; SG survie globale
<b>PCNA</b>	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>pb</b>	Paires de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase) PD-1
<b>PD-1</b>	Programmed Death-1
<b>PD-L1</b>	Programmed Death-Ligand 1
<b>PFS</b>	Progression free survival; SSP survie sans progression
<b>RCF</b>	Replication Factor C
<b>RNA-Seq</b>	RNA sequencing, séquençage de l'ARN
<b>SSR</b>	Survie sans récurrence
<b>TGS</b>	Targeted Genome Sequencing, Séquençage ciblé du génome
<b>TIL</b>	Tumor Infiltrating Lymphocyte (lymphocyte infiltrant la tumeur)
<b>WES</b>	Whole exome sequencing, séquençage de l'exome entier
<b>WGS</b>	Whole genome sequencing, séquençage du génome

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre 1

## Le système MMR et les conséquences de son inactivation

Dans les cellules eucaryotes, la réplication de l'ADN doit absolument être fidèle pour préserver l'intégrité génomique au cours des divisions cellulaires, et la réparation de l'ADN intervient en particulier pour garantir la fidélité de cette réplication. Le système de réparation des mésappariements ou "mismatch repair" (MMR) est un système post-répliatif qui assure cette maintenance ; il reconnaît et corrige les mésappariements résultant d'erreurs commises pendant la réplication de l'ADN (Leach et al., 1993; Ionov et al., 1993; Aaltonen et al., 1993) . Il agit après une première relecture du brin nouvellement synthétisé par l'ADN polymérase elle-même. Dans certains cancers, le système MMR est déficient (cancers MMRd, MMR-déficients) et cette déficience engendre un processus général d'instabilité génomique à l'échelon nucléotidique.

### 1.1 Rôle du système MMR

Le système "mismatch repair" a donc un rôle capital pour le maintien de l'intégrité génomique. Lors de la phase répliatrice, l'ADN polymérase commet des erreurs en introduisant ou en ôtant par exemple un nucléotide à une séquence qu'elle recopie à partir du brin d'ADN matrice. Ces événements se produisent à raison d'une mutation toutes les  $10^5$  paires de bases générées (Kunkel and Erie, 2015; Ganai and Johansson, 2016). Cependant, l'activité exonucléase 3' de l'ADN polymérase corrige immédiatement la plupart de ces erreurs, réduisant considérablement ce taux d'erreur, autour de  $10^{-7}$ . L'intervention à la suite du système MMR permet encore d'augmenter le niveau de fidélité de la réplication à l'échelle du génome (taux d'erreur de  $10^{-10}$ ).

En outre, il convient de noter que le système MMR intervient également dans

d'autres processus impliquant l'ADN comme la recombinaison de certaines séquences pendant la méiose et/ou la mitose, la signalisation de dommages de l'ADN ou encore l'apoptose (Jiricny, 2013).

### 1.1.1 La réparation des mésappariements

La réparation des erreurs de mésappariement est un processus cellulaire hautement conservé des procaryotes aux eucaryotes. Ce processus se fait en plusieurs étapes et implique de nombreuses protéines clés, qui permettent d'identifier et de réparer les bases mal appariées, susceptibles d'avoir été créées lors de la réplication de l'ADN, ou dans d'autres contextes (recombinaison génétique, dommages chimiques ou physiques de l'ADN dans certains cas). D'abord étudié chez la bactérie *E. coli*, le système MutHLS est composé de trois protéines principales : MutS, MutL et MutH (Jiricny, 2006). Le système MMR des eucaryotes, plus complexe, comprend dix gènes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) dénommés en référence à leurs homologues bactériens. Ces gènes sont pratiquement tous conservés chez les mammifères dont le système MMR est composé de cinq homologues de MutS (MSH 2-6 pour MutS Homologues) et de quatre homologues de MutL (MLH 1 et 3 pour MutL Homologues et PMS 1 et 2 pour Post-Meiotic Segregation) (Tableau 1). La protéine MutH n'a pas d'homologue connu chez les eucaryotes (Jiricny, 2013).

**Tableau 1: Les protéines du système MisMatch Repair et les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements chez l'humain**

Les protéines impliquées dans la réparation des mésappariements et leur rôles	
<b>Protéines MMR</b>	
MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	Reconnaissance des mésappariements et des petites boucles insertions/délétions
MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	Reconnaissance des boucles insertions/délétions
MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )	Interaction avec MutS, activité endonucléase, activation de la cascade Exonucléase
<b>Protéines accessoires</b>	
EXO1	Exonucléase : élimination du fragment d'ADN contenant le mésappariement Facteur
PCNA	Facteur de processivité de la polymérase, stimule l'activité endonucléase de MutL $\alpha$
RCF	Chargement de la Protéine PCNA
RPA	Protéine de liaison de l'ADN simple brin
Polymérase $\delta$ et/ou $\epsilon$	Resynthèse de l'ADN excisé
Ligase 1	Ligature de l'ADN après resynthèse

(D'après Reyes et al., 2015)

La reconnaissance des dommages et l'initiation de leur réparation sont réalisées par le complexe MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6) et MutS $\beta$  (MSH2-MSH3). MutS $\alpha$  reconnaît les mésappariements base/base et les insertions/délétions (indels) de 1 à 2 paires de

bases (pb), tandis que MutS $\beta$  reconnaît les indels de plus de 2 pb (Genschel et al., 1998).

Après la reconnaissance des mésappariements ou des indels, un hétérodimère de MutL homologue (MLH) composé de MLH1 et de la protéine de ségrégation post-méiotique 2 (PMS2) est recruté sur MutS $\alpha$  ou MutS $\beta$  (Hombauer et al., 2011). Le complexe PCNA (Proliferating cell nuclear agent) est ensuite recruté par le facteur de réplication C (RFC), pour interagir avec MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) afin de permettre à PMS2 d'exercer son activité endonucléase (Pluciennik et al., 2010). L'excision du brin endommagé est alors médiée par EXO1. La protéine de réplication A (RPA) se lie à l'ADN simple brin généré par l'exonucléase, le protège et favorise la terminaison de l'excision (Zhang et al., 2005). Enfin, les bases excisées sont re-synthétisées par l'ADN polymérase  $\theta$  et le néo brin d'ADN correspondant est relié par l'ADN ligase (Kunkel and Erie, 2015; Ganai and Johansson, 2016; Li and Martin, 2016) (Figure 1).

Pour éviter que les mésappariements et les indels incorporés par la polymérase soient introduits dans le génome de manière pérenne, le système MMR doit corriger les erreurs avant le cycle suivant de réplication.

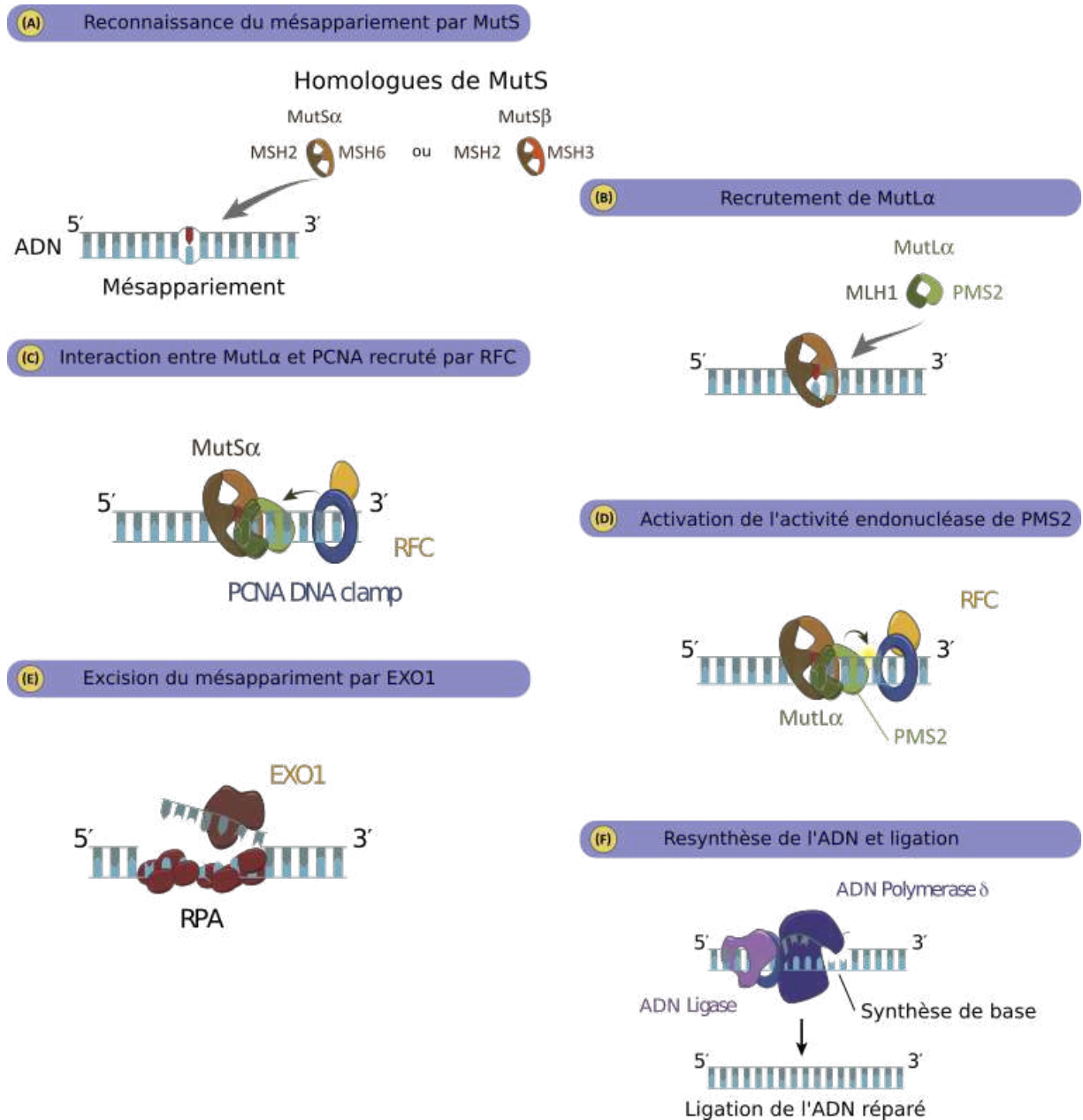


Figure 1: Mécanisme d'identification et de réparation des mésappariements par le système MMR

(A) Les mésappariements de l'ADN sont reconnus par MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ) ou MSH2/MSH3 (MutS $\beta$ ). (B) Le complexe MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) est recruté au niveau du mésappariement. (C) PCNA interagit avec MutL $\alpha$  après avoir été chargé sur l'ADN par le facteur de réplication RFC. (D) L'interaction PCNA/MutL $\alpha$  est le médiateur de l'activité endonucléase de PMS2. (E) EXO1 assure l'excision de l'ADN mésapparié et RPA se lie à l'ADN simple brin généré par l'excision pour protéger ce dernier, et permettre également la terminaison de l'excision. (F) L'ADN polymérase synthétise le nouveau brin pour régénérer les bases excisées, et le brin nouvellement synthétisé est relié par l'ADN ligase. Adapté de [Li and Martin, 2016](#).

### 1.1.2 Efficacité de la réparation MMR

Tous les mésappariements de bases ne sont pas reconnus ou réparés avec la même efficacité ([St Charles et al., 2015](#)). Parmi les huit mésappariements possibles, les

G-G, A-T, G-T et A-C sont très bien réparés, les A-G, T-T et C-T sont moins bien réparés et les C-C, les erreurs de réplication les plus rares, sont mal réparés (Dohet et al., 1985; Lahue et al., 1989; Modrich, 1991). Il existe une corrélation inverse entre l'efficacité de réparation d'un mésappariement donné et sa capacité à induire une distorsion dans la structure de l'hélice d'ADN. En effet, les mésappariements G-T induisent une faible distorsion et sont bien réparés alors que les mésappariements C-C sont les plus déstabilisants et les moins bien réparés (Hsieh and Yamane, 2008). Les complexes MutS ne reconnaissent pas le mésappariement en lui-même, ils détectent la flexibilité intrinsèque de l'ADN dans la région du mésappariement. Cela peut expliquer la grande gamme de mésappariements et de lésions qui peuvent être reconnus par les protéines MSH (Mazurek et al., 2009). Et si la capacité de réparation dépend du mésappariement en lui-même, elle varie aussi en fonction du contexte génétique (Lujan et al., 2012). En effet, l'affinité de liaison de MutS dépend du type de mésappariement mais également de la séquence nucléotidique entourant le mésappariement (Mazurek et al., 2009). Par ailleurs, les erreurs sur le brin retardé sont réparées plus efficacement que sur le brin avancé. Il est possible que la quantité plus importante d'extrémités 5' sur les fragments d'Okazaki et la plus haute densité de PCNA sur le brin retardé puisse stimuler l'activité de réparation du système MMR (Pavlov et al., 2003). Cependant, la Polymérase  $\epsilon$ , qui réplique le brin avancé, présente une fidélité plus haute que la polymérase  $\theta$ , qui réplique le brin retardé. Ainsi, les deux brins présentent une fidélité de la réplication globalement identique (Ganai and Johansson, 2016).

## 1.2 Conséquences de l'inactivation du système MMR

En raison d'une mutation ou d'une modification épigénétique des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (méthylation du promoteur du gène MLH1 en particulier), la fonction normale du système MMR peut être altérée. La perte de fonction du système MMR engendre alors une augmentation assez considérable des taux de mutations spontanées dans des organismes allant des bactéries aux humains. La déficience du système MMR est en particulier rencontrée dans certains cancers (cancers MMRd). Elle est responsable du caractère hypermutateur de ces tumeurs MMR-déficientes. Cette inactivation induit l'accumulation de mutations dans les séquences de l'ADN (Kim et al., 2013; Cortes-Ciriano et al., 2017) et signe un phénotype tumoral appelé MSI (pour MicroSatellite Instable). Ce phénotype se distingue par un caryotype normal ou sub-normal dans la majorité des cas (75% des cas, pas ou peu de remaniements chromosomiques, pas d'endo-reduplication et de passage à une aneuploïdie prononcée) mais par la présence d'une instabilité des séquences répétées microsatellites (principalement les microsatellites mono-nucléotidiques,



cf. page suivante la définition d'une séquence microsatellite). MSI affecte des milliers de séquences d'ADN microsatellites dans le génome de ces tumeurs MMRd, bien que de nombreuses altérations se produisent également, mais à une moindre fréquence, dans les séquences d'ADN non répétées au cours de la progression tumorale.

Il convient de préciser que l'inactivation du système MMR n'est pas en soi un événement transformant pour la cellule MMRd/MSI, mais est responsable d'un processus général d'instabilité génomique favorisant le développement tumoral. En effet, les clones MMR-déficients accumulent de nombreuses mutations secondaires (insertions/délétions/mésappariements de bases) susceptibles d'affecter des gènes impliqués dans des processus cellulaires divers tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la réponse aux facteurs de croissance, responsables de leur transformation en clones tumoraux (Cortes-Ciriano et al., 2017). Néanmoins, le lien fonctionnel entre l'instabilité MSI et la tumorigenèse est encore très imparfaitement élucidé et l'identification des événements clés de ce processus transformant reste encore à déterminer (Duval and Hamelin, 2002; Jonchere et al., 2018; Collura et al., 2019).

### 1.2.1 Phénotype d'Instabilité des microsatellites

Les microsatellites (MS) sont des séquences de l'ADN répétées en tandem d'un motif (de 1 à 5 nucléotides). Le motif lui-même est répété de 5 à plus de 100 fois. Les microsatellites sont répartis dans tout le génome. Chez l'humain, ils représentent environ 3% du génome (Ellegren, 2004), avec une prépondérance au niveau des régions non codantes de l'ADN (Hamelin et al., 2008). En raison de leur nature répétitive, les microsatellites sont des cibles privilégiées pour les erreurs faites par l'ADN polymérase pendant la réplication (Figure 2). Ils constituent donc des points chauds naturels pour les mutations dans les tumeurs MSI du fait de leur déficience MMR. Dans ces cancers, l'instabilité au niveau de ces séquences se traduit par des insertions ou des délétions d'une ou de plusieurs bases selon un processus cumulatif qui fait qu'elles peuvent s'ajouter au fur et à mesure des divisions cellulaires pendant la progression de la tumeur.

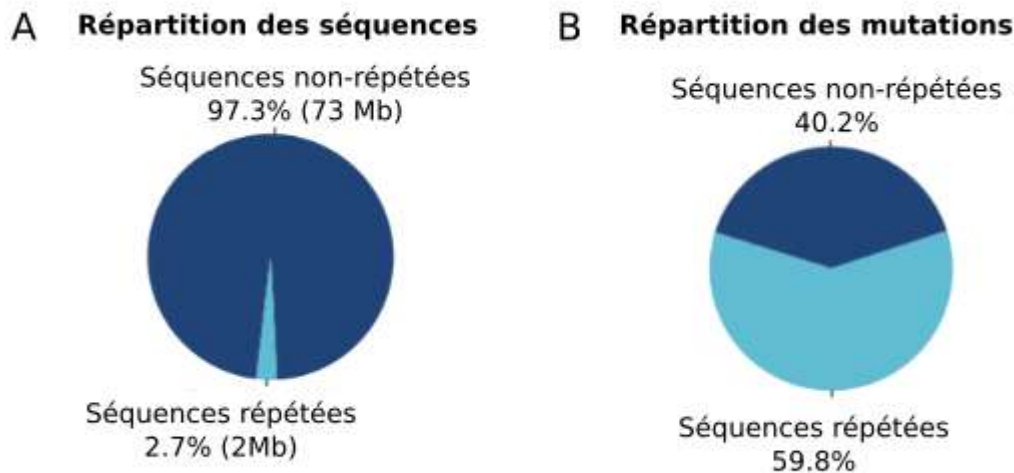


Figure 2: **Répartitions des séquences ainsi que des mutations répétées et non-répétées dans les tumeurs MMRd/MSI chez l'humain**

(A) Diagramme représentant la proportion des séquences répétées (bleu clair) et Non-Répétées (bleu foncé). (B) Diagramme représentant la proportion des mutations affectant les séquences répétées (bleu clair) et Non-Répétées (bleu foncé) dans le cancer du côlon MMRd/MSI. Adapté de ([Jonchere et al., 2018](#))

Le phénotype MSI a été initialement observé dans des tumeurs familiales, c'est à dire qui pouvaient être observées chez plusieurs individus au sein d'une même famille, et connue sous le terme de syndrome de Lynch. Il a ensuite pu être associé à des cancers de survenue sporadique, du côlon, de l'estomac, de l'endomètre et plus rarement issus d'autres localisations ([Cortes-Ciriano et al., 2017](#); [Hause et al., 2016](#); [Duval and Hamelin, 2002](#)). La problématique de l'épidémiologie de ces tumeurs MSI ainsi que la description de leur spectre clinique, à savoir, leurs incidences en fonction de la localisation primitive du cancer et de son stade, seront abordées dans le chapitre suivant.

### **Instabilité des microsatellites codants : médiateur du développement des tumeurs MMR déficientes ?**

Les microsatellites sont principalement situés dans les régions non traduites et non transcrites du génome (régions inter-géniques et introniques) (Figure 3). Les altérations de longueur affectant ces microsatellites intergéniques sont le plus souvent fonctionnellement neutres ([Sammalkorpi et al., 2007](#)). Cela est cohérent avec la nature polymorphe de la plupart de ces séquences, ce qui en fait des marqueurs appropriés pour l'identification des individus en médecine légale et historiquement des marqueurs qui ont permis d'établir les cartes génétiques du génome de nombreuses espèces, avant le séquençage de ces génomes à proprement parlé ([Thompson et al., 2012](#)). Cependant, les séquences liées aux gènes englobent également certains microsatellites, qui peuvent être situés dans les introns, les régions exoniques non

codantes ou les régions codantes pour les protéines (Figure 3). Les microsatellites situés dans ces dernières sont dénommés "cMS". Les mutations dans les régions cMS de certains gènes dont la fonction à un rôle dans le cancer sont susceptibles de déclencher la transformation maligne des cellules déficientes en MMR et la progression de ces tumeurs. Elles sont considérées généralement comme des événements clés de la carcinogenèse MSI (Boland and Goel, 2010; Woerner et al., 2006; Alhopuro et al., 2012; Duval et al., 2001).

Il convient néanmoins de noter que les gènes clés dont les mutations de cMS contribuent à la carcinogenèse restent encore à identifier. En outre, certaines conséquences de ces mutations cMS vont à l'encontre du développement tumoral et peuvent être considérées comme anti-oncogéniques (pour revue Collura et al., 2019; Svrcek et al., 2019).

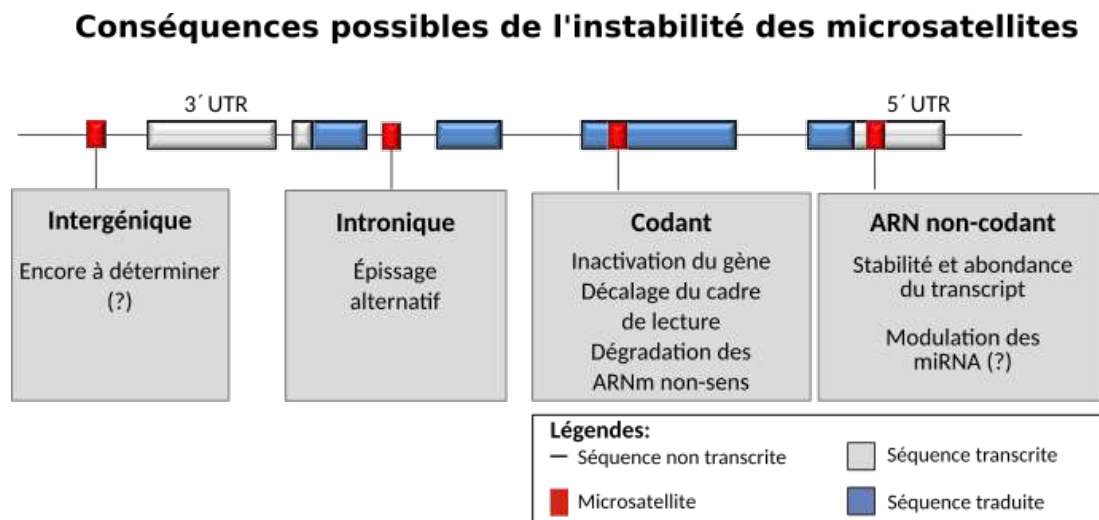


Figure 3: **Distribution et conséquences de l'instabilité des microsatellites dans le génome humain**

Les microsatellites sont des petites séquences répétées qui peuvent se trouver dans les régions intergéniques, les régions introniques, les régions transcrites non traduites ou les régions codantes pour les gènes du génome. Les conséquences fonctionnelles des mutations par insertion/délétion liées à l'instabilité des microsatellites (MSI) varient en fonction de la localisation de ces derniers dans le génome. Alors que la plupart des mutations affectant les microsatellites intergéniques sont probablement assez neutres (ce qui est cohérent avec le fait que la plupart des microsatellites intergéniques sont polymorphes), les mutations des microsatellites associés aux gènes peuvent avoir des effets directs ou indirects sur la croissance cellulaire et la progression tumorale. D'un point de vue immunologique, les mutations de type insertion/délétion affectant les microsatellites codants sont les plus importantes car elles peuvent altérer le cadre de lecture (frameshift) et, par conséquent, à la génération d'antigènes peptidiques (FSP, FrameShift Peptide). Les antigènes FSP peuvent être reconnus comme étrangers par le système immunitaire de l'hôte. Abréviations : UTR, région non traduite. Adapté de (Kloor and von Knebel Doeberitz, 2016)

Les mutations cMS n'étant pas réparées par le système MMR, vont conduire à un décalage du cadre de lecture (frame shift) et après transcription, à la formation d'un codon stop prématuré puis à la génération d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Figure 4). Ainsi, elles peuvent provoquer l'inactivation fonctionnelle de gènes qui sont impliqués dans diverses voies liées à toutes les caractéristiques cruciales du can-

cer (hallmarks of cancer, [Hanahan and Weinberg, 2011](#)), notamment en abrogeant la fonction des protéines impliquées dans la signalisation suppressive des tumeurs ([Woerner et al., 2006](#); [Kim et al., 2013](#)). Si les clones cellulaires émergents sont affectés au hasard par une mutation cMS favorisant la croissance, ils ont une plus grande probabilité de survie et d'expansion et, par conséquent, la mutation cMS respective sera observée plus fréquemment dans les cancers MSI manifestes (notion de sélection clonale dans les cancers MSI). Par exemple, le récepteur II du TGF $\beta$  (répétition TGFBR2, A10) et le gène pro-apoptotique BAX (répétition G8) sont fréquemment inactivés par des mutations frame shift des mononucléotides présents dans leurs régions codantes ([Markowitz et al., 1995](#); [Rampino et al., 1997](#)).

De manière intéressante, chaque gène MMR humain, à l'exception de MLH1, contient une répétition mononucléotidique d'au moins 7 pb ([Chang et al., 2001](#)). Ainsi, de fréquentes mutations frame shift de MSH3 (répétition A8) et MSH6 (répétition C8) ont conduit au concept de "mutateur qui mute d'autres mutateurs" ([Malkhosyan et al., 1996](#); [Perucho, 1996](#)). Les erreurs générées par l'ADN polymérase étant principalement des délétions et des insertions moins fréquentes de 1 ou 2 nucléotides ([Kim et al., 2013](#); [Jonchere et al., 2018](#)).

De plus, environ 20% des gènes humains contiennent une répétition microsatellite de taille supérieure ou égale à 7 pb dans leur région codante, ce qui fait que le nombre de cibles potentielles est considérablement élevé. Si l'on considère tous les types de mutations, les tumeurs MMRd présentent un taux de mutations élevé, avec 12 à plus de 40 mutations par mégabase (Mb) ([Cancer Genome Atlas Network and, 2012](#); [Chalmers et al., 2017](#)). Les taux de mutation étant considérés comme élevés lorsque la charge mutationnelle de la tumeur est supérieure à 12 mutations/Mb, les cancers MMRd sont généralement considérés comme des tumeurs hyper-mutées ([Cancer Genome Atlas Network and, 2012](#); [Chalmers et al., 2017](#); [Alexandrov et al., 2013](#)).

Les tumeurs MSI présentent des schémas récurrents de mutations cMS, et c'est essentiellement sur des arguments de fréquences de ces mutations dans l'ADN tumoral que l'identification de gènes d'intérêt a été proposée à l'échelle du génome ([Duvall et al., 2001](#); [Woerner et al., 2001](#)). La validité de ces prédictions a été néanmoins remise en question par des études récentes utilisant les techniques de séquençage du génome entier et de l'exome, qui fournissent également des informations précieuses sur la fréquence des événements MSI dans les microsatellites des régions codantes et non codantes en fonction de leurs tailles (notion de bruit de fond d'instabilité dans ces tumeurs) ([Kim et al., 2013](#); [Jonchere et al., 2018](#)). Ainsi, beaucoup de cMS dont les fréquences élevées laissaient penser qu'elles étaient des événements remarquables dans les cancers colorectaux (CCR) MSI ont été reconsidérés. Le séquençage de

l'exome a permis de se rendre compte de la banalité de tels évènements dans les tumeurs MSI, en particulier au niveau de cMS les plus longs, dont la taille est comprise dans le génome humain entre 8 et 10 pb (pas de contribution au niveau du génome codant de cMS de tailles supérieures du fait d'une contre-sélection de telles séquences au cours de l'évolution). Il faut donc aujourd'hui revoir la génomique de ces cancers en considérant en particulier la sélection ou contre-sélection de ces mutations cMS en fonction de leur taille ([Jonchere et al., 2018](#)).

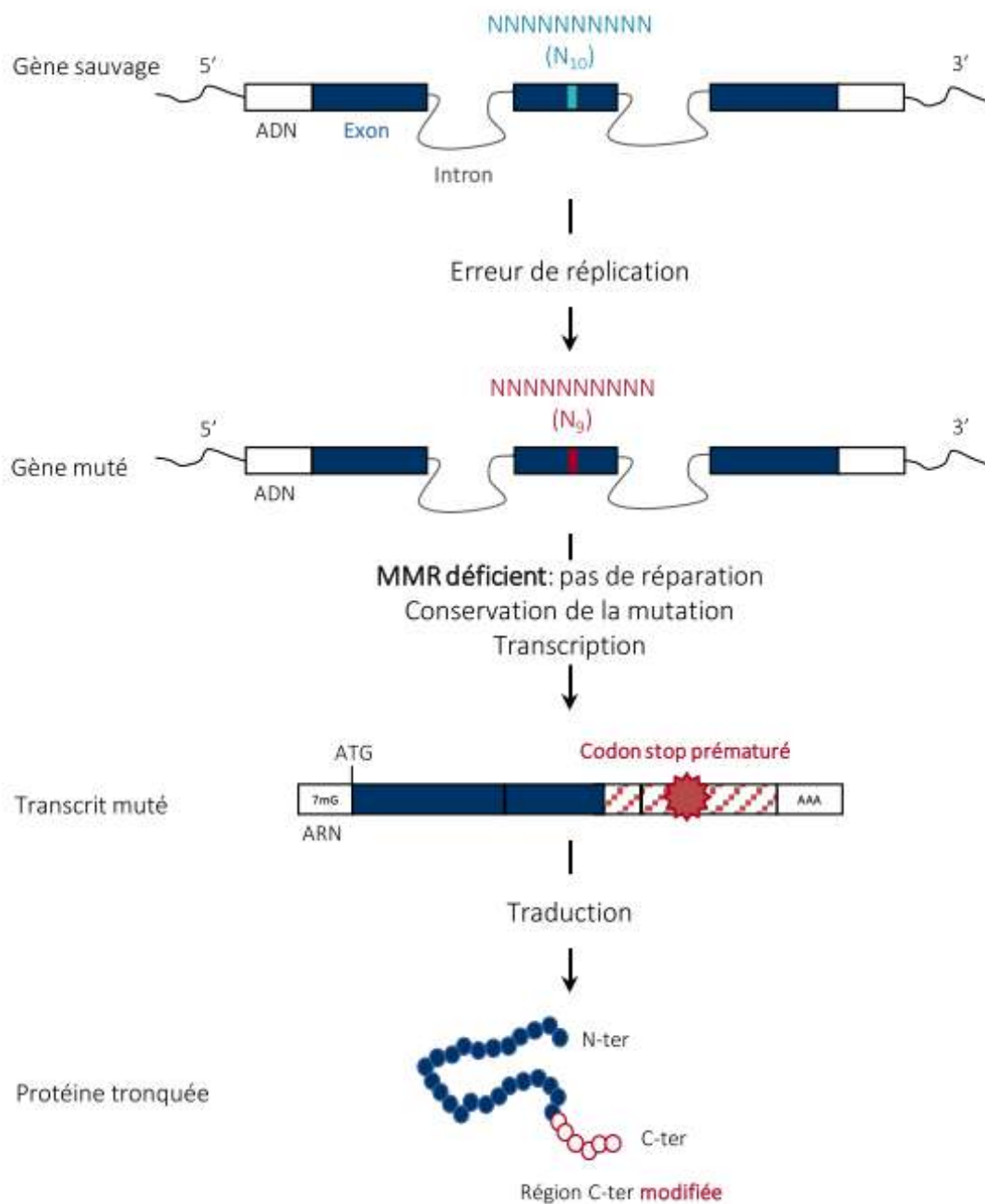


Figure 4: Mutation d'un microsatellite codant et oncogénèse MSI

La mutation d'un microsatellite codant par indel du fait de MSI cause un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré dans le transcrit muté. Ceci résulte en la synthèse d'une protéine tronquée dont le domaine C-terminal est modifié. Les répercussions fonctionnelles associées sont le plus fréquemment des pertes de fonction. 7mG : coiffe 7-méthylguanine ; AAA : queue poly-A ; N-ter : région N-terminale ; C-ter : région C-terminale. Elles peuvent néanmoins être d'autres natures (mutant dominant négatif, gain de fonction, perversion de fonction,

### Régulation par le NMD :

L'expression des mutants cMS est régulée puisqu'il existe, de manière physiologique, des mécanismes de catabolisme dans la cellule des ARN messager contenant un codon STOP prématuré, comme ceux générés en nombre dans la cellule tumorale

déficiente en MMR du fait de MSI. L'un de ces systèmes est appelé NMD (non-sense mediated-mRNA decay) (Baker and Parker, 2004; Chang et al., 2007), et il a une activité dans la cellule tumorale MSI. Néanmoins, s'il permet la diminution globale de l'expression de nombreux mutants favorisés par MSI dans la tumeur, les conséquences de son activité à la fois sur la croissance tumorale et la réponse immunitaire des patients (voir plus bas le chapitre consacré à cet item) semblent modeste (Saeterdal et al., 2001; El-Bchiri et al., 2005). Ceci est probablement dû au fait qu'un tel système est débordé dans les cellules tumorales MSI par le nombre de mutants qu'il a à dégrader et on observe d'ailleurs l'expression résiduelle de nombreux de ces mutants malgré une surexpression des facteurs principaux du NMD dans les cancers colorectaux MSI (El-Bchiri et al., 2005, 2008).

### Mutations de gènes cibles contenant un cMS et localisation tumorale :

Comme évoqué précédemment, un exemple important et identifié très tôt d'un cMS pertinent fréquemment muté dans le CCR MSI est le tractus microsatellite (A10) dans la région codante du récepteur du facteur de croissance transformant bêta 2 (TGFBR2) (Markowitz et al., 1995). Des mutations de ce microsatellite sont présentes dans plus de 90% des CCR MSI, ce qui reflète une sélection positive des clones cellulaires mutants TGFBR2 au cours de la carcinogenèse colorectale MSI. Il est intéressant de noter que les mutations de TGFBR2 sont rarement trouvées dans les cancers de l'endomètre MSI, ce qui suggère que l'inactivation mutationnelle de TGFBR2 pourrait ne pas favoriser le développement des cancers MSI dérivés de l'endomètre. En fait, les cancers de l'endomètre MSI présentent généralement des profils de mutation cMS distincts de ceux des cancers du côlon (Kim et al., 2013; Ferreira et al., 2014), ce qui suggère une tissu-spécificité du processus de carcinogenèse MSI. Aujourd'hui, il faut revisiter la problématique de ces mutations cibles liées à MSI dans le génome tumoral, ce qui est en cours grâce à la compilation et l'analyse de données de séquences de ces tumeurs, publiques ou privées, en provenance de localisations primitives très diverses.

L'ensemble du spectre des mutations dans les gènes cibles MSI est susceptible d'affecter la biologie du cancer, les réponses thérapeutiques et le pronostic des patients. Cependant, bien que la plupart des gènes cibles de cette instabilité aient été proposés sur la base des fréquences de mutations élevées dans leurs régions codantes, des gènes contenant des microsatellites situés dans des régions régulatrices non codantes, telles que des introns, des promoteurs et des UTR 5' et 3', peuvent également muter dans les cancers MSI. En conséquence, il a été suggéré que certaines mutations répétées introniques dans des gènes tels que ATM, MYB (Hugo et al., 2006), MRE11 (Giannini et al., 2004) et HSP110 (Dorard et al., 2011) jouent

un rôle dans la cancérogenèse MSI, et des mutations proches des sites d'épissage peuvent altérer les niveaux de transcrits et les schémas d'épissage des gènes cibles.

### **Mutations microsatellites non-codantes et dérégulation de l'épissage**

Les altérations des microsatellites s'accumulent également et principalement dans les régions non codantes de l'ADN des cellules tumorales MSI ([Jonchere et al., 2018](#); [Kim et al., 2013](#)), mais les conséquences fonctionnelles de ces mutations n'ont pas encore été étudiées en profondeur. Les gènes humains sont généralement composés de plusieurs exons (codants), entrecoupés d'introns (non codants) qui subissent un épissage pour générer des ARN messagers (ARNm) matures, puis des protéines (pour une revue, voir [Baralle and Giudice, 2017](#)). La transcription est un processus complexe qui englobe à la fois la transcription constitutive (élimination des introns et ligature de la majorité des exons dans l'ordre de la transcription) et l'épissage alternatif (inclusion ou exclusion de certains exons d'un gène dans l'ARNm final) ([Baralle and Giudice, 2017](#)). L'épissage alternatif des ARN est physiologiquement régulé pour plus de 95% des 20 000 à 25 000 gènes humains transcrits ([Baralle and Giudice, 2017](#)). Ce processus permet la production de milliers d'ARNm alternatifs codants pour les nombreuses isoformes de protéines générées spécifiquement dans un tissu au cours de la différenciation cellulaire ([Baralle and Giudice, 2017](#); [Fiszbein and Kornblihtt, 2017](#)).

L'altération des microsatellites dans les régions intra-géniques (régions 5' et 3'-UTR, promoteurs, introns) peut également avoir des conséquences délétères sur l'expression correcte des gènes en influençant leur transcription ([Lewandowska, 2013](#)) et leur traduction ([Chatterjee and Pal, 2009](#)). D'une part, ces séquences répétées peuvent jouer un rôle dans la régulation de la transcription et l'épissage du transcrit, d'autre part, dans la régulation de la traduction, la localisation subcellulaire, la stabilité du transcrit ou encore la reconnaissance du site d'initiation de la traduction. De plus en plus de preuves suggèrent que les exons alternatifs et constitutifs sont épissés de manière aberrante au cours du développement du cancer ([Chen and Weiss, 2015](#)). Il a été signalé que les mutations somatiques résultant de l'instabilité du génome provoquent des perturbations de l'épissage, entraînant le développement de tumeurs ([Chen and Weiss, 2015](#)). Il est intéressant de noter que dans le génome des cancers MSI, de nombreux microsatellites qui pourraient être très instables sont introniques et situés près de la jonction intron/exon dans le tractus polypyrimidique ([Dorard et al., 2011](#); [Giannini et al., 2004](#)). En conséquence, l'impact fonctionnel de la charge mutationnelle élevée résultant du phénotype mutateur pourrait perturber le métabolisme pré-ARN en raison d'un déferlement de mutations somatiques qui déstabilisent et affectent les séquences microsatellites cis-régulatrices dans le génome



tumoral.

De manière remarquable, la taille de ces microsatellites introniques associés à la fonctionnalité de l'épissage est souvent importante, ce qui rend presque obligatoire leur instabilité dans les cellules tumorales MSI ([Jonchere et al., 2018](#)). Il a été démontré de fait que certaines de ces mutations pouvaient être observées, parfois même à haute fréquence dans ces tumeurs, alors qu'elles étaient clairement toxiques pour les clones dans lesquels elles survenaient. C'est l'exemple de la mutation du microsatellite T17 d'HSP110, dont la mutation déstabilise l'épissage de l'exon 9 du gène (saut d'exon) ([Dorard et al., 2011](#)). Or, cette chaperonne est un oncogène puissant qui sous-tend la résistance des cellules tumorales MSI à la chimiothérapie ([Collura et al., 2014](#)). Mon laboratoire d'accueil a montré que l'inactivation d'HSP110 par ce biais rendaient les cellules tumorales coliques hypersensibles à la chimiothérapie, et des travaux que je présente dans ce document et auxquels j'ai contribué attestent que la mutation d'HSP110 a un impact clinique encore plus spectaculaire dans les cancers gastriques MSI (Renaud et al. Soumis, article n° 5 annexes).

### **Les mutations de séquences non répétées**

Bien que la majorité des mutations identifiées soit présente au niveau de séquences répétées microsatellitaires, certaines mutations récurrentes au niveau de séquences non répétées ont été rapportées dans les cancers MSI. Ces mutations ponctuelles ont été recherchées de manière systématique et incluent celles impliquées dans les principales voies de signalisation associées à la transformation maligne des cellules épithéliales coliques. Plusieurs oncogènes, tels que BRAF, KRAS, PIK3CA et CTNNB1, présentent des points chauds de mutation spécifique dans les CCR. Les mutations de BRAF, PIK3CA et CTNNB1 sont détectées plus fréquemment dans les CCR MSI que dans les CCR non-MSI (ou MSS pour MicroSatellite Stable).

#### **La mutation BRAF**

Le gène BRAF code pour une sérine/thréonine kinase de la voie RAS/RAF. Les mutations de BRAF jouent un rôle important dans diverses tumeurs malignes humaines ([Dhomen and Marais, 2007](#)). La mutation en transversion T>A au niveau du nucléotidique 1799 du gène BRAF provoque un changement de la valine en acide glutamique à la position 600 de la protéine (V600E). Cette mutation a des implications génétiques, pronostiques et thérapeutiques importantes. Elle est retrouvée dans environ 60% des CCR MSI sporadiques alors que sa fréquence n'est que de 5% dans les CCR sporadiques MSS ([Parsons et al., 2012](#)). Elle est mutuellement exclusive de la mutation du gène KRAS, et des schémas distincts de mutations de KRAS ont été signalés dans les CCR en fonction des défauts de MMR de l'ADN ger-

minal et du statut de méthylation de MLH1 (Oliveira et al., 2004). Cette mutation oncogénique est détectée dans les CCR sporadiques MSI, mais pas dans les CCR liés au syndrome de Lynch (Deng et al., 2004; Domingo et al., 2004a,b). Par conséquent, la présence de la mutation BRAF V600E peut constituer un critère d'exclusion pour le test génétique du syndrome de Lynch. En situation métastatique, elle conférerait à la tumeur un mauvais pronostic et n'est pas prédictive d'inefficacité des anti EGFRs (Bokemeyer et al., 2012). La survie globale de ses patients est de l'ordre de 10 mois avec une bi-chimiothérapie (folfox ou folfiri) associé à une biothérapie (anti EGFRs ou bevacizumab).

### **Sélection et contre-sélection de mutations somatiques dans les microsatellites dans les tumeurs MSI**

Comme nous avons vu précédemment, l'instabilité des microsatellites codants dans les gènes liés au cancer entraîne un décalage du cadre de lecture et une inactivation fonctionnelle des protéines affectées (Woerner et al., 2006). Chez l'humain la longueur et la composition en acides aminés de ces répétitions d'ADN (A/T vs. C/G) déterminent leur fréquence de mutation telle que rapportée récemment (Kondelin et al., 2017; Jonchere et al., 2018) (Figure 5).

La diversité génotypique et phénotypique des clones cellulaires au sein de la tumeur MSI et leur émergence et prolifération pendant le développement tumoral est soumis à un processus de sélection darwinienne (Greaves and Maley, 2012). Étant donné que les microsatellites constituent des points chauds pour les mutations dans les tumeurs MSI, indépendamment de leur emplacement dans les gènes et de la fonction de ces gènes, ces mutations peuvent survenir même si elles sont neutres ou voire même nuisibles à la tumorigenèse (Duval et al., 2002; Woerner et al., 2010). Cela conduit à l'apparition de génotypes mutants qui confèrent des avantages ou des désavantages aux cellules dans lesquelles ils apparaissent, permettant ainsi aux cellules d'en tirer parti (sélection positive) ou au contraire d'involuer (sélection négative) au sein de la masse tumorale.

Les progrès récents en matière de séquençage à haut débit ont permis d'identifier toutes les modifications génétiques dans les exons des gènes et leurs séquences bordantes (bornes introniques, régions UTR) au niveau des cancers MSI humains. Kim et ses collègues ont rapporté une vue d'ensemble de 27 tumeurs du côlon et de 30 tumeurs de l'endomètre présentant le phénotype MSI (Kim et al., 2013). Récemment, nous avons mis en perspective les données d'exome de ces tumeurs en analysant les mutations microsatellitaires et leurs fréquences de survenue en tenant compte de la taille des répétitions génomiques. Cette approche nous a per-

mis d'évaluer le bruit de fond de l'instabilité microsatellitaire dans ces tumeurs, et d'identifier de fait des événements mutants remarquables qui semblent sélectionnés positivement (fréquence mutationnelle plus importante qu'attendue) ou négativement (c'est-à-dire des mutations détectables à des fréquences plus faibles que celles prédites par les taux de base stochastiques) dans les séquences microsatellites (Jonchere et al., 2018). Il semble d'après ces données que la sélection négative de nombreuses mutations est une des caractéristiques du modèle de tumorigenèse MSI, ce qui est un trait original de ces tumeurs sur un plan physiopathologique.

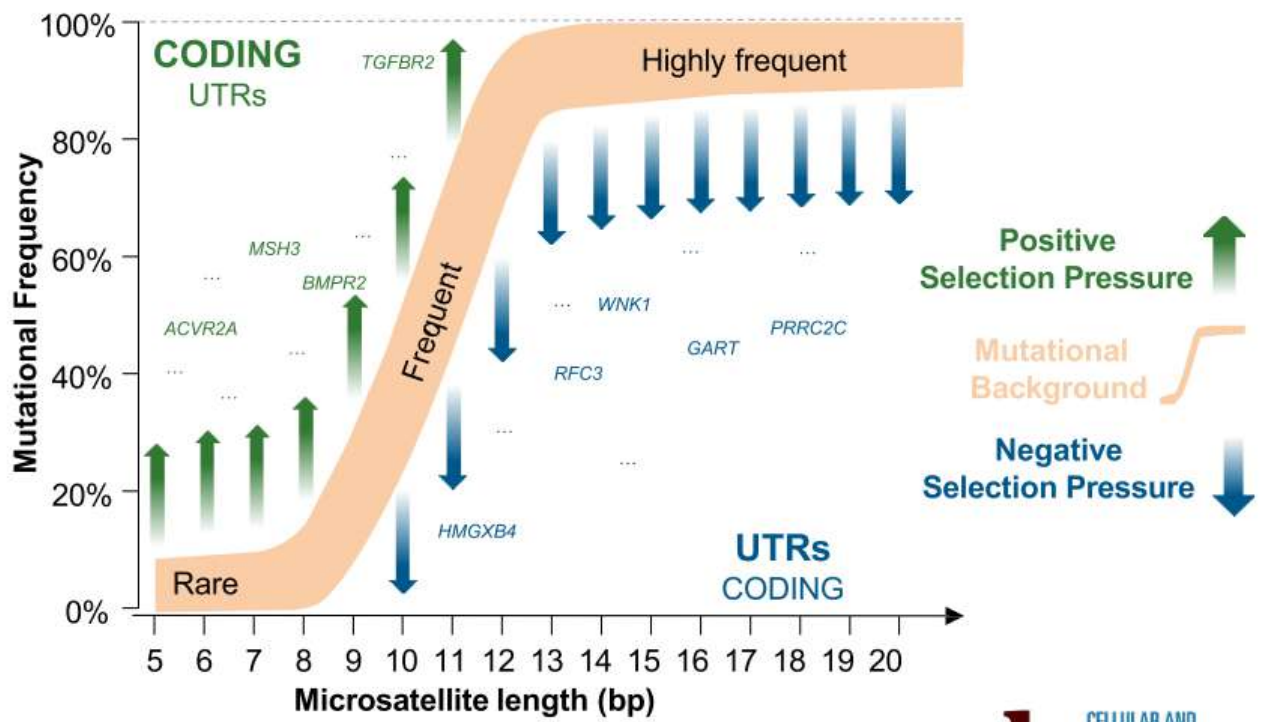


Figure 5: Distribution des fréquences de mutations des microsatellites en fonction de la longueur de répétition.

Les zones vertes et les zones bleues contiennent respectivement les mutations aberrantes sélectionnées positivement et négativement dans des microsatellites dans les tumeurs MSI (modèle, cancer colorectal). (Jonchere et al., 2018)

## Fusion de gène

L'avènement des outils de biologie moléculaire à haut débit a conduit au développement de thérapies ciblées chez les patients atteints de cancer. Le récepteur TRK (Tropomyosin Receptor Kinase) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase jouant un rôle dans la prolifération cellulaire et la physiologie du système nerveux. Des fusions touchant le gène NTRK, codant pour ce récepteur, ont été retrouvées dans diverses tumeurs solides et conduisent à son activation constitutionnelle. Une étude a montré que sur 2 314 carcinomes colorectaux, 21 présentaient des fusions de cette kinase (Cocco et al., 2019). Dans l'ensemble, 57% (12/21) des

fusions de carcinomes colorectaux étaient observées dans des CCR MMRd/MSI. La perte de MLH1 et l'hyper-méthylation du promoteur d'MLH1 ont été confirmées dans les 12 et les 10 cas avec du matériel disponible, respectivement. Des fusions étaient présentes dans 5% des carcinomes colorectaux MMRd/MSI, contre 0,4% des carcinomes colorectaux MMRp/MSS ( $P < 0,001$ ) et 15% des carcinomes colorectaux MMRd/MSI avec RAS/BRAF de type sauvage. Sur un total de 24 carcinomes colorectaux déficitaires en MLH1 avec hyper méthylation et RAS/BRAF de type sauvage, 10 (42%) présentaient des fusions de kinases. Les fusions de kinases dans les carcinomes colorectaux MMRd/MSI étaient donc associées à un cancer sporadique avec l'hyper méthylation du promoteur de MLH1 plutôt qu'au syndrome de Lynch, et ses patients peuvent être éligibles pour les inhibiteurs de kinases, en particulier après une résistance à d'autres thérapies. Ces résultats identifient donc un sous-ensemble moléculaire très rare de carcinome colorectal avec des fusions de kinases qui pourraient répondre aux inhibiteurs de kinases.

### **1.2.2 Immunogénicité et Microenvironnement tumoral**

Du fait de l'accumulation d'un nombre élevé de mutants somatiques via l'instabilité des microsatellites, les tumeurs MSI sont caractérisées par un profil immunogène (Lothe et al., 1993). Cette autre conséquence de l'instabilité microsatellitaire est majeure. Elle explique en grande partie le fait que les tumeurs MSI sont généralement associées à une infiltration lymphocytaire dense et à des réponses locales prononcées du système immunitaire adaptatif au niveau du site tumoral (Shia et al., 2013; Dolcetti et al., 1999; Buckowitz et al., 2005; Mlecnik et al., 2016; Galon et al., 2006). Ce lien entre immunité tumorale adaptative et instabilité des microsatellites souligne que ce mode d'instabilité du génome a un rôle équivoque pendant le développement tumoral. Nous venons de voir qu'il pouvait être pro-tumorigénique en favorisant les mutations de certains gènes cibles. Il est clairement aussi anti-tumorigénique via un processus qui stimule l'immunité anti-tumorale, au détriment du développement du cancer dans certains cas.

#### **Immunité adaptative et infiltrat immun dans les cancers**

La reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire adaptatif résulte de la présentation d'antigènes tumoraux. Ces derniers peuvent découler de deux processus différents :

D'une part, un premier processus génère des néoantigènes, spécifiques des tumeurs (TSA, tumor-specific antigens). Les néoantigènes sont des peptides qui proviennent de gènes mutés, sont transcrits et traduits, et sont présentés sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui servent à la reconnaissance des

marqueurs du soi. On distingue les CMH de classe I et de classe II, et chez l'être humain, on parle d'antigène HLA. Le récepteur des lymphocytes T (TCR) interagit à la fois avec le peptide présenté et des acides aminés de la molécule du CMH. Et ainsi, les lymphocytes peuvent discriminer les antigènes de l'organisme (soi) des antigènes étrangers (non-soi) et les éliminer. Les antigènes présentés par le HLA de classe I peuvent être des cibles des lymphocytes T CD8+, tandis que les antigènes présentés par le HLA de classe II sont plutôt reconnus par les lymphocytes T CD4+ (Figure 6).

De plus en plus d'études visent à prédire les néoantigènes à partir de données d'exome et/ou de transcriptome. Pour ce faire, les mutations sont appelées en comparant les exomes tumoraux et normaux, et les allèles HLA sont analysés. Ensuite, des outils permettent de prédire la liaison de ces nouveaux peptides aux molécules du CMH, si elles sont exprimées. Il est à noter que toutes les mutations n'entraînent pas de réponses immunitaires similaires et que certains néoantigènes, notamment ceux dérivés de l'insertion et de la délétion de nucléotides au niveau de cMS, sont des inducteurs plus ou moins puissants des réactions immunitaires.

D'autre part, un deuxième type de processus correspond aux antigènes associés aux tumeurs (TAA, tumor-associated Antigens) provenant d'auto-antigènes à expression aberrante. Ils sont présents sur certaines cellules tumorales et également sur certaines cellules normales. Certains d'entre eux sont liés à des gènes liés à la différenciation : des gènes qui ne sont pas normalement exprimés dans les tissus environnants et qui sont exprimés sur les cellules tumorales. D'autres proviennent de la surexpression d'auto-antigènes normalement présentés, qui peuvent déclencher des réponses immunitaires adaptatives au-delà d'un certain seuil.

### **"Peptide frameshift" antigénique associé au phénotype MSI**

Dans les tumeurs MSI, les mutations cMS favorisent parfois la tumorigenèse en abrogeant la fonction des protéines cibles qu'elles affectent et qui sont impliquées dans la signalisation suppressive des tumeurs. Elles peuvent également induire la génération de nouveaux antigènes peptidiques en nombre à la suite de déplacements du cadre de lecture sur ces mêmes gènes cibles et d'autres (frame shifts) (Figure 6).

Ces antigènes sont, d'un point de vue conceptuel, de véritables antigènes spécifiques des tumeurs (TSA), car ils ne sont générés que dans les clones de cellules cancéreuses émergentes. Ils ressemblent donc à des antigènes viraux, étant totalement inconnus et nouveaux pour le système immunitaire de l'hôte. Cela en fait des cibles idéales pour la réponse immunitaire spécifique dont le rôle est de reconnaître et d'éradiquer les cellules exprimant ces TSA afin d'empêcher leur croissance. Par

conséquent, les antigènes peptidiques issus du décalage de cadre (FSP, Frameshift Peptides) ont été décrits très tôt comme une source potentielle d'antigènes immunologiquement pertinents dans le cancer (Townsend et al., 1994).

Contrairement aux néo-antigènes résultant d'un seul échange de nucléotides et d'acides aminés, les néo-antigènes issus d'un décalage du cadre de lecture (FSP), bien que résultant de l'insertion ou de la délétion d'un seul nucléotide, englobent de longs tronçons d'acides aminés antigéniques, qui peuvent contenir plusieurs néo-épitopes pertinents sur le plan immunologique (von Knebel Doeberitz and Kloor, 2013).

Étant donné que l'absence d'activité du MMR est associée à une inflation de mutations d'insertion et/ou de délétion au niveau des cMS, les cancers déficients en MMR expriment de nombreux néoantigènes FSP qui sont autant de cibles potentielles pour la vaccination anti-tumorale (Saeterdal et al., 2001; Linnebacher et al., 2001). Les protéines mutantes ainsi traduites possèdent en conséquence des extrémités C-terminales aberrantes néo-antigéniques qui sont reconnues comme telles par le système immunitaire du patient (Figure 4 et 6). L'abondance et la nature "étrangère" de ces néoantigènes FSP expliquent probablement la forte infiltration locale de cellules immunitaires typique des cancers déficients en MMR (Duval and Hamelin, 2002; El-Bchiri et al., 2005; Buckowitz et al., 2005; Shia et al., 2013; Dolcetti et al., 1999; Maby et al., 2015) et la forte activation locale des cellules immunitaires (Rooney et al., 2015; Lal et al., 2015).

### **Microenvironnement tumoral MSI**

Les cellules malignes ne sont pas les seules constituantes des tumeurs. Ces dernières contiennent à la fois des cellules tumorales et des cellules non tumorales qui font partie d'un ensemble complexe appelé microenvironnement tumoral (TME, tumor microenvironment). Il est maintenant établi que les cellules du TME peuvent avoir un effet majeur sur l'évolution de la maladie cancéreuse sur un plan physiopathologique. Récemment, le ciblage de ce TME en particulier, avec l'avènement de nouvelles drogues, comme par exemple les Inhibiteurs du Checkpoint Immunitaire (ICKi pour Immune Checkpoint inhibitors), est venu constituer une révolution thérapeutique sans précédent, en particulier pour les cancers MSI (cf. infra).

Pour qu'une réponse immunitaire anti-tumorale soit effective, il faut qu'un cancer possède des antigènes reconnus comme du non-soi lors de la surveillance immunitaire. Dans le cancer colorectal MSI, l'accumulation d'erreurs dans les microsatellites, qui résident dans les exons des gènes, conduit à la génération d'un grand nombre de pep-

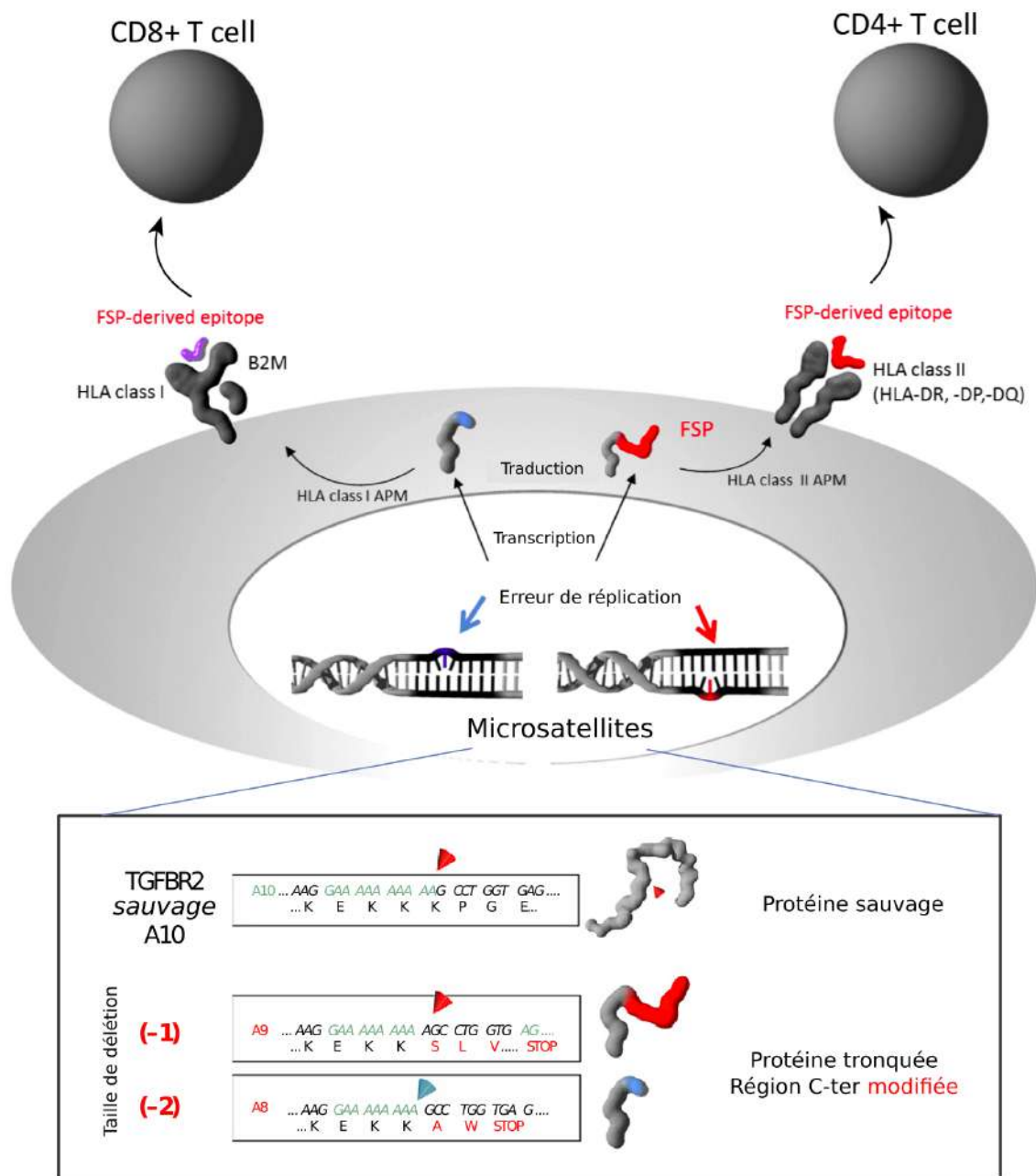


Figure 6: Interactions tumeur-cellule immunitaire dans le cancer MSI

Les antigènes FSP peuvent être reconnus par le système immunitaire comme étrangers. Les cellules cancéreuses MSI produisent des antigènes FSP à la suite de mutations d'insertion/délétion au niveau des séquences cMS (flèches). Les gènes mutants, qui sont traduits, peuvent donner naissance à des protéines non fonctionnelles. Ces protéines englobent une séquence d'acides aminés de type sauvage N-terminale (gris) et une séquence de néopeptide ou de peptide issu du décalage du cadre de lecture, avec une extrémité C-terminal aberrante (rouge, bleu). Grâce au traitement et à la prise en charge des antigènes par le HLA classe I et HLA classe II, des épitopes dérivés des antigènes FSP peuvent être présentés à la surface des cellules cancéreuses MSI. Les antigènes présentés par le HLA de classe I peuvent être des cibles d'attaque des cellules T CD8 positives (fonction cytotoxique), tandis que les antigènes présentés par le HLA de classe II peuvent être reconnus par les cellules T CD4 positives. FPS : frame shift peptide ; B2M :  $\beta$ 2-microglobulin Kloor and von Knebel Doeberitz (2016)

tides anormaux dus à des mutations frameshift. Cet ensemble de peptides anormaux représente un ensemble d'antigènes tumoraux qui rend souvent les tumeurs MSI intrinsèquement plus détectables par le système immunitaire de l'hôte que d'autres types tumoraux, MMR-proficients, pour une localisation tumorale donnée.

Ainsi, le statut MSI peut modifier le microenvironnement tumoral des patients sous de multiples aspects. Les mutations spécifiques requises pour la transformation maligne au cours de l'évolution des tumeurs MSI sont aussi responsables de leur immunogénicité prononcée. Les tumeurs MSI sont de fait à leur tour fortement infiltrées par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des cellules Th1 activés, créant ainsi un microenvironnement antitumoral hostile (Figure 7). Outre les lymphocytes T, les cellules immunitaires innées, telles que les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les cellules dendritiques et les cellules NK (natural killer) infiltrent également le microenvironnement des tumeurs du cancer colorectal et d'autres tumeurs MSI primitives (MMRd/MSI).

Une forte infiltration lymphocytaire (TILs), typique des tumeurs MSI, est un facteur de bon pronostic dans les tumeurs colorectales ([Pagès et al., 2005](#)). Dans le domaine de la médecine personnalisée de ces tumeurs, des travaux édifiants ont récemment tiré parti des caractéristiques immuno-phénotypiques des cancers MSI, en permettant la mise en œuvre de nouvelles stratégies thérapeutiques (Immunothérapie) ([Llosa et al., 2015](#)). Cette thématique sera détaillée dans le chapitre IV. La reconnaissance immunitaire des cellules tumorales MSI n'est pas seulement responsable d'une évolution clinique favorable, mais de façon intéressante, les tumeurs MSI au stade métastatique répondent très bien aux immunothérapies conçues pour activer la réponse immunitaire des patients en débloquent l'activité des lymphocytes T (thérapies basées sur les ICKi).



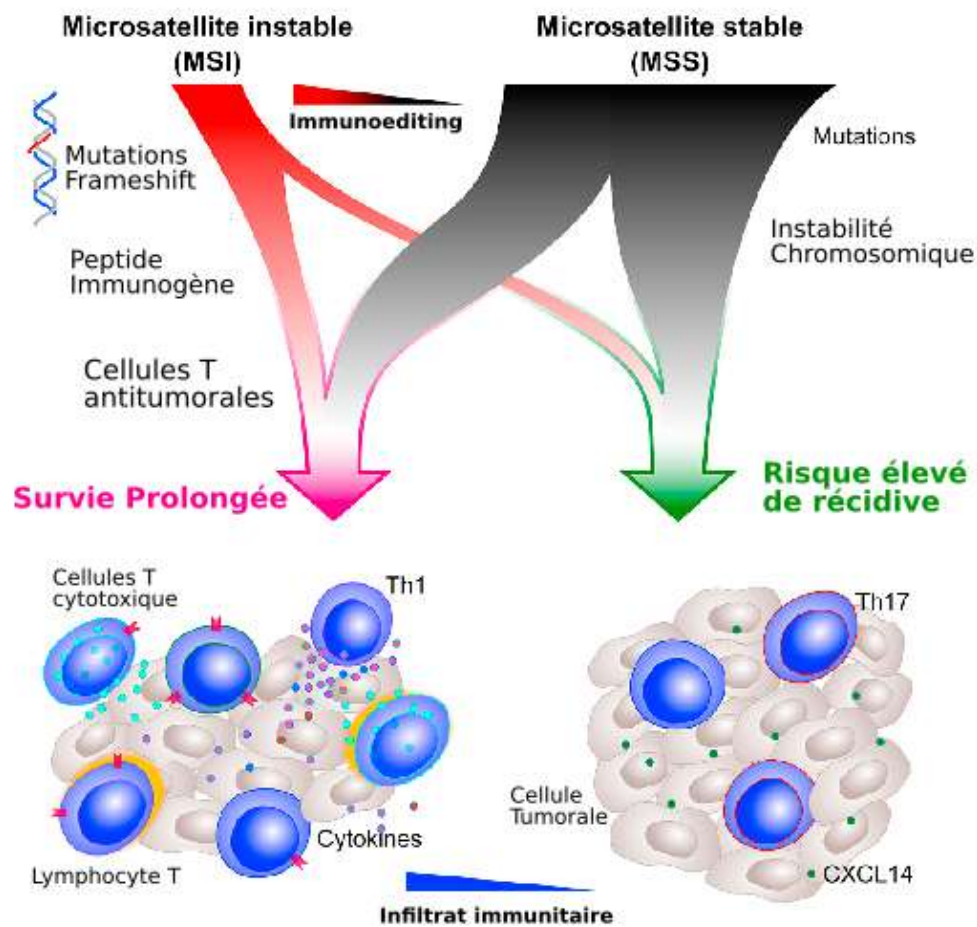


Figure 7: Le microenvironnement tumoral des CCR MMRd-MSI et MMRp-MSS

Les tumeurs MSI présentent une augmentation significative des lymphocytes infiltrant la tumeur, y compris les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) activés, les cellules Th1 et les cellules T CD4+, ainsi que les cellules NK et les macrophages. (D'après Mlecnik et al., 2016)

# Chapitre 2

## Les cancers de phénotype MSI

Les cancers MSI sont fréquents chez l'humain, ils concernent plus de 4% des cancers, soit 15 000 cas par an en France et 750 000 dans le monde environ. Ces tumeurs présentent des caractéristiques cliniques, physiopathologiques et moléculaires qui les distinguent des cancers non-MSI (MSS) pour une même localisation du cancer, indépendamment de leurs origines héréditaires ou sporadiques. Ainsi, MSI est à la base d'une voie de tumorigenèse distincte, engendrée en rapport avec l'existence d'un spectre original de mutations associées au phénotype hyper-mutateur de ces cancers, caractérisés par leur déficience MMR. Dans ce chapitre nous allons nous pencher plus avant sur l'épidémiologie et certaines caractéristiques de ces cancers.

### 2.1 Caractéristiques cliniques et épidémiologiques

Deux révolutions, méthodologique et technologique, ont modifié notre connaissance du spectre clinique des cancers MSI. En effet, le séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'accès aux métadonnées ont apporté une dimension pan-tumorale aux études du phénotype MSI en génomique du cancer, permettant de mieux en appréhender son épidémiologie (Le et al., 2015; Cohen et al., 2015; Cortes-Ciriano et al., 2017; Hause et al., 2016; Bonneville et al., 2017; Le et al., 2017; Nebot-Bral et al., 2017; Colle and Cohen, 2019). Le spectre connu des cancers MSI aujourd'hui (et des tumeurs associées au syndrome de Lynch) est étendu (Latham Schwark et al., 2018). Les analyses génomiques à haut débit, au niveau pan-tumoral, ont permis de préciser ce spectre tumoral MSI de manière assez précise, même si un certain flou sur ces limites exactes persiste encore, en particulier à cause des méthodes utilisées en bioinformatique pour l'identifier, comme nous le montrons dans un des travaux de recherche associé à ce rapport de doctorat (Ratovomanana et al., 2021).

### 2.1.1 Prévalence des cancers MSI

Un large spectre de tumeurs présente un phénotype MSI (Hause et al., 2016; Bonneville et al., 2017) (Figure 8). La plus forte proportion de cas se trouve associée à trois localisations : l'endomètre (~20-30%), le côlon (~15-20%) et l'estomac (~10-15%). Une fréquence plus faible mais décelable a été signalée dans 24 autres types de cancer, mais il est difficile bien sûr d'être vraiment exhaustif. Sur 27 types de cancer avec phénotype MSI, seulement 12 d'entre eux ont été trouvés pour avoir plus d'une seule tumeur MSI décrite et une prévalence de MSI supérieure à 1%. Il est bien entendu que plus la fréquence de ce phénotype MSI est rare, plus il est difficile de le détecter, à partir du criblage de séries de cas nécessairement très importants, ce qui est parfois très délicat (notamment lorsqu'il s'agit de cancers rares). En outre, l'expression de MSI n'est pas la même dans toutes les tumeurs MMRd et si une instabilité microsatellitaire massive est généralement observée dans les cancers colorectaux et de l'estomac, elle devient plus discrète voire à la limite de la détection avec les méthodes actuelles dans d'autres localisations, e.g. dans le cerveau (cf. infra chapitre sur les méthodes diagnostiques de MSI). La forme sporadique des cancers MSI (méthylation MLH1 le plus souvent) et le syndrome de lynch (mutations monoaléliques et constitutionnelles d'un des gènes du MMR) présentent un spectre clinique très recouvrant. Ces tumeurs diffèrent plutôt par l'âge auquel elles se développent, 70 et autour de 50 ans en moyenne respectivement. Si les caractéristiques cliniques associées au phénotype moléculaire MSI sont bien décrites dans les cancers fréquemment associés au syndrome de Lynch (cancer colorectal, cancer de l'endomètre), elles le sont nettement moins dans les autres localisations tumorales.

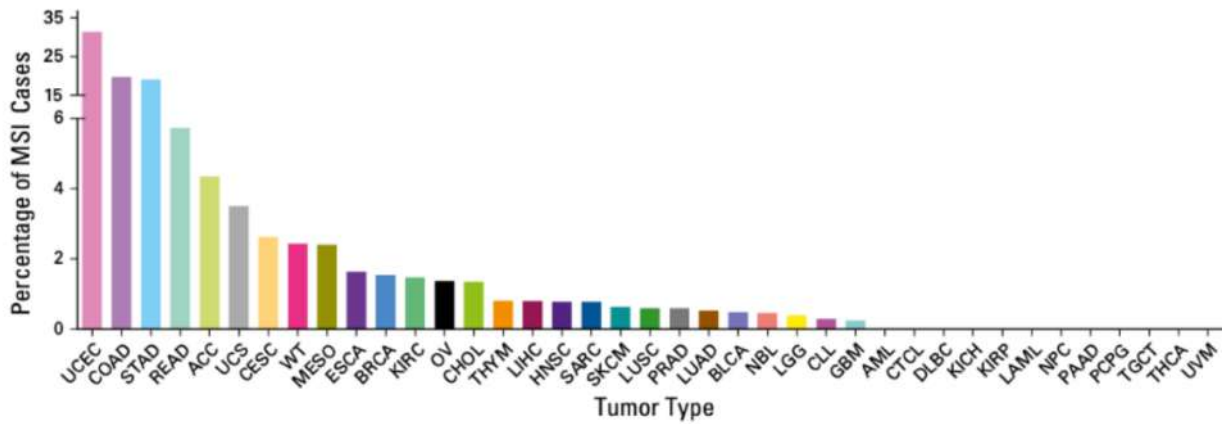


Figure 8: **Prévalence de l'instabilité des microsatellites (MSI) dans 39 types de cancers humains**

Pourcentage de cas de MSI dans 39 types de cancers humains provenant de 11 139 paires de tumeurs normales de The Cancer Genome Atlas (TCGA) et Therapeutically Applicable Research (TARGET). ACC, carcinome corticosurrénalien ; AML, leucémie myéloïde aiguë pédiatrique (TARGET) ; BLCA, carcinome de la vessie ; BRCA, carcinome du sein ; CESC, carcinome épidermoïde cervical et adénocarcinome endocervical ; CHOL, cholangiocarcinome ; COAD, adénocarcinome du côlon ; CTCL, lymphome cutané à cellules T ; DLBC, lymphome diffus à grandes cellules B ; ESCA, carcinome de l'œsophage ; GBM, glioblastome multiforme ; HNSC, carcinome épidermoïde de la tête et du cou ; KICH, chromophobe du rein ; KIRC, carcinome rénal à cellules claires ; KIRP, carcinome papillaire du rein ; LAML, leucémie myéloïde aiguë (TCGA) ; LGG, gliome de bas grade ; LIHC, carcinome hépatocellulaire du foie ; LUAD, adénocarcinome pulmonaire ; LUSC, carcinome épidermoïde pulmonaire ; MESO, mésothéliome ; NBL, neuroblastome pédiatrique ; NPC, carcinome nasopharyngé ; OV, cystadénocarcinome séreux ovarien ; PAAD, adénocarcinome pancréatique ; PCPG, phéochromocytome et paragangliome ; PRAD, adénocarcinome de la prostate ; READ, adénocarcinome rectal ; SARC, sarcome ; SKCM, mélanome cutané ; STAD, adénocarcinome de l'estomac ; TCGT, tumeur testiculaires germinale ; THCA, carcinome de la thyroïde ; THYM, thymome ; UCEC, carcinome de l'endomètre du corps utérin ; UCS, carcinosarcome utérin ; UVM, mélanome de l'uvée ; WT, tumeur de Wilms. (Bonneville et al., 2017)

Dans plus de deux tiers des cas, les tumeurs MSI peuvent se développer de façon sporadique, c'est à dire, sans notion de prédisposition familiale à leur survenue, principalement par hyperméthylation du promoteur des deux allèles du gène MLH1, ce qui réduit au silence l'expression de MLH1 et conduit à la déficience MMR. Par ailleurs, l'inactivation constitutionnelle mono- ou bi-allélique d'un gène MMR constitue un contexte génétique de prédisposition au développement de tumeurs MSI dans le cadre de deux syndromes, le syndrome de Lynch (LS) et le syndrome de Déficience Constitutionnelle des gènes MMR (CMMRD), respectivement. Ces tumeurs constituent l'une des premières causes de cancers héréditaires chez l'humain.

### 2.1.2 Syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch, du nom du cancérologue américain Henry Lynch, est une maladie génétique qui représente une des prédispositions au cancer les plus fréquentes chez l'humain. Dans ce syndrome, les patients sont prédisposés au développement de différents types de tumeurs (côlon, estomac, endomètre, voies biliaires, rein, uretères, pancréas, lymphomes, leucémies, etc.), le plus souvent à un âge jeune (avant

60 ans), mais la pénétrance de la maladie et son expressivité clinique sont très variables. Il est important d'en faire le diagnostic dans une famille afin de préciser les risques de cancer et les modalités de prise en charge à proposer aux différents apparentés.

Le syndrome de Lynch est dû à des mutations germinales monoalléliques dans les gènes MMR ([Peltomäki, 2016](#)). Les mutations MMR identifiées dans ce syndrome affectent principalement MLH1 (environ 40%) ou MSH2 (environ 35%), et moins fréquemment MSH6 (environ 10%), et rarement à PMS2 (1-8%) ([Senter et al., 2008](#); [Nebot-Bral et al., 2017](#)), avec toutes les cellules somatiques contenant un allèle MMR muté et un allèle sauvage. Au cours de la formation de la tumeur, une inactivation du second allèle fonctionnel restant se produit par mutation, délétion ou très rarement par méthylation du promoteur (dans le cas du gène MLH1), ce qui entraîne une déficience en MMR et potentiellement la formation d'un cancer MSI (modèle de Knudson) ([Nordling, 1953](#); [Knudson, 1971](#)).

Contrairement à d'autres syndromes de cancers héréditaires, tels que la polypose adénomateuse familiale (PAF) ou le syndrome de Li-Fraumeni, seul un sous-ensemble de porteurs de mutations MMR germinales développent des cancers, en particulier dans le côlon et l'endomètre, au cours de leur vie. Le risque général de développer un cancer au cours de la vie dans le cas du syndrome de Lynch est difficile à estimer (30 à 80%), ce qui implique que beaucoup des porteurs de mutations dans un gène MMR ne développent pas de cancer au cours de leur vie ([Aarnio et al., 1999](#)). Il a été proposé par exemple que ce risque réduit de cancer soit dû à une réponse immunitaire renforcée contre les tumeurs MSI, avec la mise en évidence d'un infiltrat accru de cellules immunitaires dans la masse tumorale par rapport aux cancers MSS. Néanmoins, il existe d'autres explications, avec en particulier la notion d'inégalité des variants MMR par rapport à la prédisposition clinique qu'ils engendrent (notion de variants MMR pathogènes ou neutres avec des intermédiaires possibles). Les porteurs de mutations MLH1 et MSH2 ont un risque plus élevé de développer un CCR MSI globalement que les porteurs de mutations MSH6 ou PMS2 ([Moreira et al., 2012](#); [Yurgelun et al., 2017](#)).

Plus récemment, des foyers de cryptes déficientes MMR ont été décrits dans la muqueuse intestinale non néoplasique de patients atteints de syndrome de Lynch ([Kloor et al., 2012](#)). Il s'agit de cryptes morphologiquement normales, qui présentent une perte de la protéine MMR, et qui peuvent constituer un événement pré-néoplasique. Dans certains cas de CCR MSI à début précoce, le diagnostic du syndrome de Lynch est incertain car aucune mutation germinale n'est identifiée ;

ces cas sont considérés comme "Lynch-like" et le repérage de ces cryptes pourrait avoir un intérêt diagnostique de fait.

### **Diagnostic du syndrome de Lynch et importance du criblage MSI tumoral dans ce contexte**

L'objectif des tests d'instabilité des microsatellites dans le cadre du diagnostic du syndrome de Lynch est l'identification de patients porteurs d'une tumeur du spectre clinique MSI. Il s'agit souvent d'une étape importante dans la démarche diagnostique qui conduit à identifier les patients porteurs du syndrome de Lynch. La preuve ultime qui confirme le diagnostic de ce syndrome chez un individu est l'identification d'une mutation germinale pathogène dans un gène MMR, et le diagnostic en amont d'un cancer MSI chez lui ou ses apparentés permet de repérer les patients à risque d'être porteur d'un tel syndrome, surtout lorsque le diagnostic tumoral MSI est porté chez un sujet jeune avant l'âge de 50 ans. Si une mutation germinale pathogène a été identifiée chez un patient, les membres de la famille peuvent être testés de manière prédictive pour la présence de cette mutation spécifique. Si la mutation pathogène n'est pas trouvée chez un parent, son risque de cancer peut être considéré comme égal à celui de la population générale. Les parents porteurs de la mutation germinale spécifique doivent être considérés à haut risque de cancer colorectal et de tumeurs extra-coliques et doivent donc adhérer à des programmes de surveillance intensifiés.

### **2.1.3 CMMRD**

Une proportion minime des patients atteints de syndrome de Lynch sont porteurs d'une forme extrêmement grave de cette maladie qui est dénommée syndrome de déficience constitutionnelle en réparation des mésappariements de l'ADN (CMMRD pour Constitutive MMR-deficiency syndrome en anglais) ([Wimmer and Kratz, 2010](#); [Lavoine et al., 2015](#)). Le syndrome CMMRD est une prédisposition majeure à la survenue de tumeurs MSI à des âges pédiatriques, c'est-à-dire avant l'âge de 15 ans. Il est lié à une inactivation fonctionnelle complète du système MMR chez les porteurs, du fait de mutations bialléliques et germinales d'un gène majeur du MMR. La majorité des patients CMMRD portent une mutation biallélique sur PMS2 (60%) tandis que 40% des patients ont une mutation biallélique sur d'autres gènes MMR (20-30% dans MSH6, 10-20% dans MLH1 ou MSH2). Il s'agit donc d'une prédisposition génétique hyper-majeure aux cancers MSI dès l'enfance.

Les localisations tumorales du CMMRD sont diverses et comprennent principalement des hémopathies malignes (lymphome ou leucémie, 31%), des tumeurs

cérébrales (54% des patients) et d'autres tumeurs malignes associées au syndrome de Lynch (tumeurs digestives en particulier, colon en première ligne). En outre, une variété d'autres tumeurs malignes n'ont été observées que chez quelques patients CMMRD ou individuellement et des macules café au lait sont très souvent rapportées chez les malades (Urganci et al., 2015).

Les tumeurs apparaissent dès la petite enfance avec un âge moyen de 6 ans pour les hémopathies malignes, 9 ans pour les tumeurs cérébrales et 16 ans pour les tumeurs digestives et la plupart des enfants n'atteignent pas l'âge adulte. Le pronostic de la maladie est donc beaucoup plus sombre que celui des patients atteints du syndrome de Lynch en raison des types de cancers et du risque élevé de développer des tumeurs malignes primaires multiples (Vasen et al., 2014) (Figure 9). Les raisons pour lesquelles le spectre clinique du CMMRD diffère radicalement de celui du syndrome de Lynch sont encore imparfaitement élucidées.

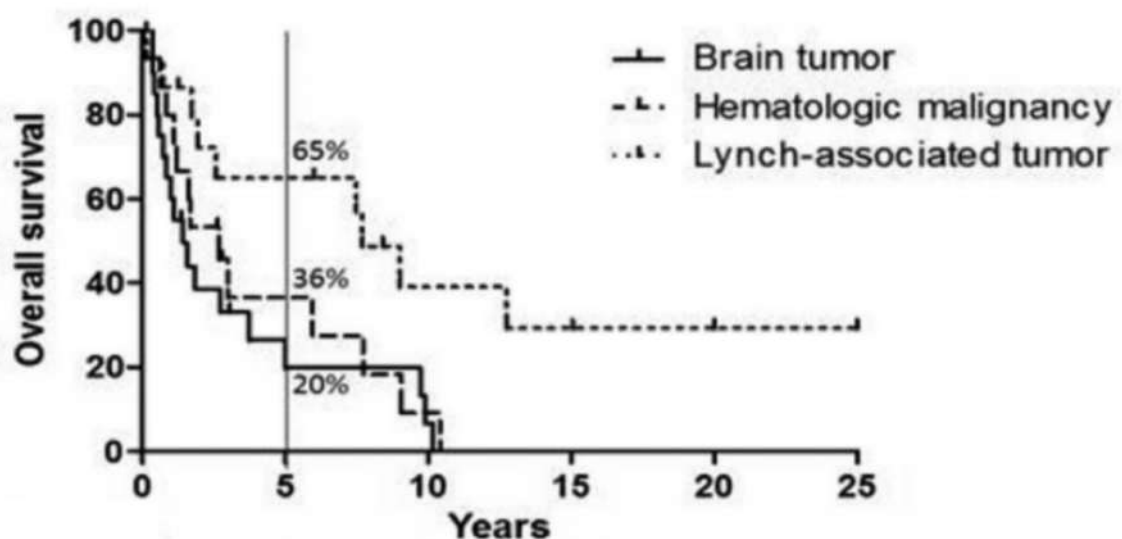


Figure 9: Survie globale du CMMRD selon le type de tumeur

Le spectre tumoral du syndrome CMMRD comprend les tumeurs cérébrales, les tumeurs malignes hématologiques et certaines tumeurs associées au syndrome de Lynch. Les taux de survie globale (OS, Overall Survival) à 5 ans sont de 20%, 36% et 65%, respectivement pour les tumeurs cérébrales, hématologiques et les tumeurs associées au syndrome de Lynch. (Lavoine et al., 2015)

## 2.2 Caractéristiques physiopathologiques et rôle pronostique

Dans les cancers, la fréquence du phénotype MSI varie selon le stade de la tumeur (Tableau 2). Il est en effet plus fréquent aux stades localisés qu'en situation métas-

tatique dans la grande majorité des localisations tumorales (Le et al., 2017). Ainsi le statut MSI est observé dans 15 à 20% des cancers colorectaux localisés et seulement 3-12% des cancers colorectaux métastatiques (CCRm). La faible prévalence des CCRm MMRd comparativement aux stades II et III souligne la faible capacité de ce type tumoral à développer des métastases. De manière intéressante, dans les CCR localisés de stade I et II, le statut MSI est un facteur de bon pronostic, et de pronostic intermédiaire pour les stades III. En revanche, c'est un facteur de mauvais pronostic pour les stades métastatiques, les chimiothérapies conventionnelles étant moins efficaces (pas de prise en compte ici des données plus récentes concernant la réponse de ces tumeurs MSI métastatiques du côlon à l'immunothérapie).

**Tableau 2 : Epidémiologie analytique du phénotype MSI dans les principales localisations tumorales**

Localisation tumorale	Fréquence du phénotype MSI			Mécanisme de la déficience MMR	
	Population générale	Stades localisés	Stades avancés	Syndrome de Lynch	Cancer sporadique
Endomètre	17-33%	38%	28%	26%	74%
Colorectal	3 -20%	15-20%	3-12%	37%	63%
Gastrique	8-22%	8-24%	8-10%	3%	97%
Œsophage	2-7%	NC	NC	NC	NC
Ovaire	2-10%	NC	NC	5-20%	80-95%

NC : Non connu ; (D'après Colle and Cohen, 2019)

### 2.2.1 Cancer colorectal MSI localisé

En règle générale, les cancers colorectaux MSI sont situés dans le côlon proximal, où ils se développent souvent comme de grosses tumeurs. Généralement ces tumeurs sont peu différenciées avec des caractéristiques histologiques mucineuses et avec une densité élevée de lymphocytes infiltrant la tumeur. Ces cancers s'accompagnent souvent par la présence abondante de cellules T infiltrant la tumeur et la réaction dite de Crohn avec des agrégats lymphoïdes proéminents à la périphérie de la tumeur (Pino and Chung, 2011; Shia et al., 2013).

#### Valeur pronostique globale de l'instabilité des microsatellites

MSI a été associé à un pronostic favorable chez les patients atteints de cancers colorectaux (en comparaison des tumeurs non-MSI). En effet, dans une revue incluant 32 études éligibles (Popat et al., 2005), les auteurs ont stratifié la survie des patients atteints de CCR en fonction du statut MSI/MSS et ont confirmé la relation entre le statut MSI et un meilleur taux de survie, avec un hazard ratio (HR) combiné pour



la survie globale (OS) de 0,65 (95% CI 0,59-0,71). Les améliorations de la survie peuvent refléter l'infiltration marquée de lymphocytes T observée dans les cancers MSI, qui est liée à des réponses immunitaires spécifiques induites par des antigènes (Phillips et al., 2004).

Ainsi, les cancers colorectaux MSI ont un pronostic plus favorable que les cancers colorectaux MSS. Cependant, au sein du sous-groupe de patients atteints de cancer colorectal MSI, il existe une hétérogénéité de la maladie sur un plan clinique et en particulier en fonction des conditions de traitement de la tumeur. MSI a une valeur pronostique indépendante dans plusieurs tumeurs primaires et il a été associé à une réponse alternative à la chimiothérapie dans différents contextes. De ce fait, plusieurs situations et/ou marqueurs ont été évalués comme potentiels contributeurs à une évolution plus ou moins favorable de la maladie chez les patients avec une tumeur MSI.

### **Statut MMR et chimiothérapie adjuvante**

Les protocoles de traitement des CCR incluent d'une part la chirurgie et d'autre part les traitements médicamenteux (sans parler de la radiothérapie qui a un rôle important dans le traitement des cancers du rectum). Ces deux grands types de traitements peuvent être utilisés seuls ou en combinaison, en fonction du stade de la tumeur. Pour les tumeurs de stades précoces et localisés (I et II), la chirurgie seule est le principal traitement. La chirurgie est combinée à la chimiothérapie pour les tumeurs de stade II de haut grade et de stade III : on parle alors de chimiothérapie adjuvante, c'est-à-dire une chimiothérapie administrée à l'issue d'une chirurgie, pour prévenir le risque de rechute en détruisant les cellules cancéreuses qui n'auraient pas été retirées lors de l'intervention.

La déficience du système MMR est un marqueur prédictif du manque d'efficacité du traitement adjuvant à base de 5-fluorouracile (5FU) dans le cancer colorectal (Sargent et al., 2010). Pour les patients atteints d'un cancer colorectal de stade III avec un statut MMRd/MSI, une indication pour une chimiothérapie adjuvante avec une combinaison d'oxaliplatine et de fluorouracile est recommandée (FOLFOX) (André et al., 2015; Zaanani and Taieb, 2019).

### **Bio marqueur d'intérêt**

**Sporadique vs héréditaire** Les CCR MMRd/MSI localisés sporadiques et ceux liés au syndrome de Lynch semblent ne pas avoir la même sensibilité à la chimiothérapie. Sinicrope et collègues ont en effet montré que les patients avec une muta-

tion germinale d'un gène MMR avait un bénéfice statistiquement significatif de la chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracile (HR = 0.31, P = 0.006), tandis que les patients avec une inactivation somatique du système MMR ne présentaient pas d'amélioration de la survie sans récurrence (SSR) avec le 5-fluorouracile (HR = 1.50, P = 0.182) (Sinicrope et al., 2011). Il est donc possible que l'effet potentiellement délétère des fluoropyrimidines pour les tumeurs MMRd de stade II soit réel pour les patients avec un CCR sporadique, mais pas pour les patients avec un syndrome de Lynch.

**HSP110** Une forme dominante-négative de la protéine de choc thermique (HSP)110 (HSP110DE9) exprimée par les cellules cancéreuses MSI, résultant d'un saut d'exon causé par des délétions somatiques d'un microsatellite T17 de l'intron, sensibilise les cellules au 5-fluorouracile et à l'oxaliplatine *in vitro* (Collura et al., 2014). Environ 25% des patients atteints de tumeurs colorectales de stade II-III MSI ont une excellente réponse à la chimiothérapie due à une large délétion bi-allélique du microsatellite T17 dans l'intron de l'ADN tumoral de HSP110. De plus, le statut de la mutation T17 de HSP110 semble aussi permettre la prédiction du pronostic et de l'efficacité de la réponse au traitement chez les patients atteints d'un cancer gastrique opérable avec instabilité des microsatellites (Renaud et al. Soumis, voir annexes). De manière remarquable, l'effet clinique de la mutation d'HSP110 (délétion large et saut d'exon en conséquence sur le transcrite) est encore plus drastique dans le cancer de l'estomac. Sa présence dans la tumeur améliore en effet considérablement l'efficacité de la chirurgie seule ou du protocole thérapeutique aujourd'hui en vigueur qui associe la chirurgie à une chimiothérapie périopératoire (avant et après la chirurgie), le plus souvent à base de FLOT (5-Fluorouracile, Oxaliplatine et Docetaxel). Ces résultats sont soumis pour publications et ils sont présentés en annexe puisque j'ai participé à ce travail dans le cadre de mon doctorat.

**Infiltrat inflammatoire** L'infiltrat inflammatoire des tumeurs MMRd/MSI permet de distinguer des profils pronostiques différents au sein même du groupe des CCR MMRd (Sinicrope et al., 2016). Ainsi il a été rapporté que les signes de réponse immunitaire intra-tumorale étaient associés à une amélioration de la SSR et de la survie globale (Pagès et al., 2005). La présence de lymphocytes T régulateurs intra-tumoraux serait ainsi de bon pronostic dans les CCR MMRd (Suzuki et al., 2010; Tougeron et al., 2013). Par ailleurs, il a récemment été démontré qu'un score immunitaire ("immunoscore"), basé sur la quantification des lymphocytes T cytotoxiques et mémoire aux niveaux intra-tumoraux et des fronts d'invasion, permettait d'identifier les patients à haut risque de récurrence au sein même du groupe MMRd (Galon et al., 2014; Mlecnik et al., 2016). Cependant, la contribution de

l'immunoscore n'est pas cliniquement validée dans le CCR MSI à tous les stades du cancer et d'autres séries de patients doivent être évaluées pour pouvoir conclure. De plus, l'expression de métagènes Immunoscore-like était associée de manière statistiquement significative à une amélioration du pronostic dans les tumeurs non-MSI présentant de faibles niveaux de cellules T infiltrant la tumeur et de points de contrôle immunitaire (hazard ratio [HR] = 0,63, intervalle de confiance à 95% [IC] = 0,43 à 0,92, P = . 02 ; et HR = 0,55, IC à 95% = 0,34 à 0,90, P = 0,02, respectivement), mais n'avait clairement aucune pertinence pronostique dans les CCR présentant des niveaux plus élevés de cellule T infiltrant la tumeur et d'ICK (HR = 0,46, IC à 95% = 0,10 à 2,10, P = 0,32 ; et HR = 1,13, IC à 95% = 0,79 à 1,63, P = 0,50, respectivement), y compris les tumeurs MSI. Ainsi, l'expression des ICK pourrait annuler la pertinence pronostique des cellules T infiltrant la tumeur dans les tumeurs coliques hautement immunogènes et être associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR MSI ([Marisa et al., 2018](#)).

## 2.2.2 Cancer colorectal MSI métastatique

### Valeur Pronostique

Les tumeurs de stade IV (CCRm) bénéficient de la chirurgie et de la chimiothérapie adjuvante, voir néo-adjuvante, c'est-à-dire une chimiothérapie administrée préalablement à une intervention chirurgicale afin de réduire la taille de la tumeur. Peu de données sont disponibles concernant le pronostic des patients avec un CCRm MMRd, principalement en raison de la faible prévalence de MSI au stade IV. Les CCRm MMRd/MSI sont associés à un schéma métastatique spécifique, reflété par des taux élevés de carcinose péritonéale et de métastases ganglionnaires à distance. Jusqu'à récemment, les études ayant évalué l'impact pronostique du statut MMR dans cette situation avaient portés sur de faibles nombres échantillons, rendant les résultats difficilement interprétables.

Dans une analyse groupée de 4 études de phase III dans le traitement de première ligne de la maladie métastatique (CAIRO, CAIRO2, COIN, FOCUS), chez 153 patients présentant une instabilité micro-satellitaire élevée (MSI-H) , les médianes de la survie sans progression (PFS, Progression free survival) et de la survie globale étaient significativement plus mauvaises que chez les patients MMR proficients (PFS 6.2 vs 7.6 mois, HR 1.33; 95% CI 1.121.57, p = 0.001 et OS 13.6 vs 16.8 mois, HR 1.35; 95% CI 1.131.61, p = 0.001) ([Tran et al., 2011](#); [Venderbosch et al., 2014](#)).

Dans une autre analyse rétrospective, 55 patients atteints d'un CCR métasta-

tique MMRd ont été évalués et ne semblaient pas avoir de meilleurs survies (OS 15,4 mois, IC 95% 10,61-17,74) même après une métastasectomie R0/R1 (OS 33,8 mois, IC 95% 14,5-76,5) par rapport aux contrôles historiques pMMR. Et dans une méta-analyse publiée par Des Guetz et ses collègues, parmi 964 patients, dont 91 avaient des tumeurs MSI, aucun bénéfice de la chimiothérapie, en termes de taux de réponse pour les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS n'a été retrouvé au stade métastatique (Des Guetz et al., 2009).

Par conséquent, sur la base des données cliniques susmentionnées dans le contexte métastatique, il semble que MSI puisse avoir un rôle pronostique péjoratif. Il est aujourd'hui essentiel d'identifier les mécanismes qui sous-tendent la progression de la tumeur MSI jusqu'à l'invasion à distance. Ces processus se produisent en particulier via l'acquisition par les cellules MMR-déficientes de nombreuses altérations somatiques, notamment au niveau des séquences répétées (microsatellites de l'ADN). Aucune étude n'a encore permis d'analyser la génomique de tumeurs MSI métastatiques, compte tenu de leur rareté.

### **MSI un bio marqueur prédictif de réponse positive à l'immunothérapie**

Au stade métastatique, et de manière rapidement évolutive aux stades localisés (non métastatiques), les cancers MSI font l'objet de traitements de précision par la prescription d'immunothérapies dédiées qui ont amélioré de manière spectaculaire le pronostic de la maladie (molécules ciblant les checkpoints immunitaires, e.g. PD1, PD-L1, CTLA-4, ...).

Grâce au développement récent des immunothérapies et de la médecine de précision, de nouvelles perspectives de guérison se présentent pour les malades. En effet, un changement de paradigme a bouleversé le traitement des cancers, avec l'arrivée de nouveaux médicaments qui ciblent le système immunitaire pour combattre la tolérance de l'hôte à la présence d'un cancer et stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale. L'utilisation d'anticorps inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité (ICKi) est devenue aujourd'hui une des approches les plus efficaces pour traiter les patients atteints de cancer, avec des bénéfices de survie impressionnante, mais également des effets indésirables qui restent néanmoins limités (moins de 1% des patients).

Pour les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, le statut MMRd/MSI constitue un biomarqueur maintenant obligatoire pour être inclus dans les essais cliniques d'immunothérapie (anti-PD1, anti PD-L1 ± anti-CTLA-4), en raison de la valeur prédictive positive de ce statut pour l'efficacité de ces traitements (Le et al.,

2015; Overman et al., 2018; André et al., 2020).

Une évaluation plus poussée de l'efficacité du blocage PD-1 chez des patients atteints de cancers avancés déficients en MMR dans 12 types de tumeurs différents a suggéré que le statut MSI puisse être un marqueur actionnable pour une thérapie de blocage des immune checkpoints (ICK), indépendamment du tissu d'origine du cancer (Le et al., 2017). Pour ces raisons, en 2017, la Food and Drug Administration (FDA), l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments, a accordé une autorisation accélérée pour le nivolumab et le pembrolizumab, ce dernier pour les tumeurs MMRd et/ou MSI métastatiques, quel que soit la localisation tumorale (Marcus et al., 2019).

L'efficacité de cette thérapie est caractérisée par une activité clinique durable mais restreinte à un sous-groupe de patients. Discerner ce groupe de patients minoritaires et bons répondeurs est un défi majeur pour l'onco-immunologie dans les années à venir. C'est un des aspects relatifs à la recherche que j'ai menée au cours de ma thèse. Nous aborderons cette thématique plus en détail dans le chapitre IV.

## Chapitre 3

# Diagnostic des cancers MSI

Le phénotype MSI est actuellement très fréquemment recherché chez les patients présentant un cancer colorectal et de plus en plus fréquemment pour d'autres localisations tumorales. La détermination du statut MMRd/MSI a trois implications majeures. Premièrement, la présence d'un phénotype tumoral MSI permet d'identifier ou de contribuer à identifier les patients à risque pour le syndrome de Lynch ou le CMMRD. Ensuite l'établissement du phénotype MSI a une valeur pronostique et thérapeutique dans plusieurs localisations tumorales. Dans les stades précoces de la maladie, les patients atteints d'un cancer MSI ont un meilleur pronostic que les individus atteints d'un cancer MSS et ce dans plusieurs localisations tumorales primaires (Popat et al., 2005; Nakata et al., 2002; Zhu et al., 2015). Dans le cancer colorectal, il est conseillé aux patients atteints d'un cancer MMRd/MSI de stade II de ne pas recevoir de chimiothérapie adjuvante. Pour les patients atteints d'un cancer colorectal de stade III avec un statut MMRd/MSI, une indication de chimiothérapie adjuvante avec une combinaison d'oxaliplatine et de fluoropyrimidines est donnée. Les patients atteints de cancer colorectal MMRd/MSI métastatique sont désormais éligibles à un traitement par immunothérapie anti-ICK (blocage des points de contrôle immunitaire), en raison de la valeur prédictive positive de ce statut pour l'efficacité de ces traitements (Le et al., 2015, 2017; Overman et al., 2017) contrairement aux patients MMRp/MSS.

Ces observations ont conduit de nombreuses organisations médicales à recommander un dépistage universel du statut MMRd/MSI pour tous les cancers colorectaux nouvellement diagnostiqués (Pai and Pai, 2016; Van Cutsem et al., 2016; Luchini et al., 2019). De plus, comme la FDA a accordé l'approbation d'ICKi, pour toutes les tumeurs MMRd et/ou MSI, indépendamment de la localisation tumorale, le dépistage du statut MMRd/MSI est de plus en plus souvent intégré dans les soins oncologiques de routine des patients atteints de tumeurs solides dans un large éventail de cancers. Cependant, les contraintes de la pratique quotidienne, clinique ou

de laboratoire, imposent de rationaliser la démarche diagnostique et d'effectuer ces analyses en cohérence avec l'épidémiologie du phénotype MSI dans chaque localisation tumorale.

Le diagnostic du statut MSI des patients repose à ce jour, sur deux méthodes complémentaires: l'ImmunoHistoChimie (IHC) et la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR). Ces méthodes sont relativement équivalentes en terme de performances dans le dépistage du statut MMRd/MSI dans le cancer colorectal. C'est moins le cas pour les autres localisations primaires de ces cancers, en particulier pour les tumeurs non digestives.

## **3.1 Méthodes standards de diagnostic du statut MSI/MMRd**

### **3.1.1 L'immunohistochimie (IHC)**

L'immunohistochimie permet l'étude de l'expression des protéines MMR sur des coupes histologiques. Physiologiquement, ces protéines sont ubiquitaires et sont localisées dans le noyau. Elles sont particulièrement exprimées dans les cellules du tiers inférieur des cryptes coliques, et dans les cellules stromales tels que les cellules inflammatoires et/ou les cellules endothéliales. Les mutations des gènes MMR (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6) entraînent la perte d'expression de la protéine correspondante dans la grande majorité des cas et peuvent être détectées par IHC (2-7% de faux négatifs néanmoins selon les études) en utilisant des anticorps ciblant sur les 4 protéines (Figure 10). Les pertes de MLH1 et de MSH2 sont responsables d'une perte des protéines PMS2 et MSH6, respectivement, les secondes étant dégradées en l'absence de leur protéine partenaire. La perte de PMS2 ou de MSH6 n'est à l'inverse pas associée à une perte de MLH1 ou MSH2, mais ces cas sont plus rares (Colas et al., 2012; Shia, 2008).

### **3.1.2 Les tests moléculaires PCR**

L'instabilité génomique induite par la perte d'expression des protéines MMR peut être également détectée par PCR. En 1997, un panel de 5 marqueurs, appelé panel de Bethesda, a été proposé pour l'analyse de MSI (Boland et al., 1998). Il comprend 2 répétitions mono-nucléotides (BAT-25 et BAT-26) et 3 répétitions dinucléotides (D5S346, D2S123 et D17S250) (Rodriguez-Bigas et al., 1997). Une PCR est réalisée sur ces 5 marqueurs et l'étude des produits d'amplification est réalisée par migration en électrophorèse capillaire sur un séquenceur. A partir des séquences obtenues, un

examen détermine la taille de chacune des séquences microsatellitaires testées en les comparant entre le tissu tumoral et le tissu normal. Les tumeurs présentant une instabilité de 2 ou plus de ces marqueurs sont définies comme étant MSI-H (MSI-high), tandis que celles présentant une instabilité de 1 répétition ou ne montrant aucune instabilité sont définies comme des tumeurs à faible instabilité microsatellitaires (MSI-low, MSI-L) ou stables (MSS), respectivement. Le panel de Bethesda est toujours l'un des panels de microsatellites les plus utilisés au monde et plus particulièrement aux États-Unis. Ce panel de Bethesda présentait cependant certaines limites notamment liées à la difficulté d'interprétation de l'amplification des microsatellites dinucléotidiques. Ainsi, la révision des recommandations Bethesda a proposé ultérieurement l'utilisation de marqueurs mononucléotidiques uniquement (Umar et al., 2004). Un test PCR alternatif, dit PCR Pentaplex, a été développé en intégrant 5 microsatellites mononucléotidiques quasi-monomorphiques (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27), le caractère MSI étant défini par l'instabilité d'au moins 3 microsatellites (Buhard et al., 2004). Les tumeurs présentant trois marqueurs instables ou plus sont appelées MSI-H, et les tumeurs présentant un ou aucun marqueur instable sont appelées MSS. La PCR Pentaplex est aussi sensible et spécifique que le panel de Bethesda et présente l'avantage de ne pas avoir besoin d'une comparaison avec l'ADN non tumoral (Buhard et al., 2006). Ce test repose sur un brevet Inserm Transfert directement issu des travaux de mon laboratoire de recherche (références [WO03072822 \(A2\)](#)).

Par ailleurs, il a été récemment montré que l'analyse unique du microsatellite T17 du gène codant pour la protéine chaperonne HSP110 (HT17) permet de détecter simplement et de manière également fiable les tumeurs coliques MSI (Buhard et al., 2016). Bien que la forte sensibilité du HT17 ait été confirmée dans une autre étude (Berardinelli et al., 2018), ce marqueur doit encore être évalué plus avant, notamment dans des cancers autres que le cancer colorectal. De manière remarquable, ce marqueur a en outre un intérêt pronostique et son statut permet de prédire l'efficacité de la réponse au traitement dans les tumeurs MSI colorectales (Dorard et al., 2011; Collura et al., 2014) et de l'estomac (Renaud Soumis, cf. infra article joint à ma thèse auquel j'ai contribué). Il pourrait devenir, de fait, aussi intéressant à cribler en routine chez les patients, en particulier chez les patients avec un cancer gastrique MSI chez lesquels il pourrait devenir un marqueur théranostique très intéressant (Renaud, soumis).



### 3.1.3 Discordance IHC/PCR pentaplex

L'immunohistochimie est une technique peu coûteuse et peu gourmande en temps. Elle est couramment utilisée dans les services de pathologie. C'est une technique sensible, est utilisable même avec très peu de matériel tumoral. Sur les trois études majeures du domaine incluant 1144, 1066 et 1119 patients atteints de cancers colorectaux, la sensibilité de la détection des tumeurs MSI par immunohistochimie était respectivement de 92%, 93% et 94% ([Hampel et al., 2005](#); [Lindor et al., 2002](#); [Engel et al., 2006](#)). De plus, contrairement au test PCR, l'immunohistochimie peut aider à identifier le gène affecté, ce qui permet d'orienter l'analyse des mutations germinales vers un seul gène et d'éviter l'analyse d'autres gènes MMR ([Hampel et al., 2005](#)). L'immunohistochimie est fiable dans le dépistage des mutations qui entraînent une troncature ou une dégradation de la protéine. Cependant, des faux positifs restent possibles en cas de mutations faux-sens qui entraînent des protéines mutantes catalytiquement inactives, mais antigéniquement intactes ([Peltomäki and Vasen, 2004](#)). L'immunohistochimie souffre également d'un manque de standardisation des procédures (qualité de l'échantillon, anticorps choisi, choix de l'automate et du système de révélation utilisés,) ([Overbeek et al., 2008](#)). Contrairement à la PCR, elle semble fiable pour détecter le phénotype MMRd pour l'ensemble des tumeurs du spectre MSI. Les discordances sont particulièrement importantes pour certaines localisations tumorales, comme le cerveau par exemple.

Lorsque les quatre protéines MMR sont testées, la corrélation entre la perte d'expression des protéines MMR et le test PCR-MSI est excellente dans le CCR (0.4% sur 3228 patients) ([Guyot D'Asnières De Salins et al., 2021](#)). Par conséquent, si la disponibilité des ressources et de l'expertise le permet, une co-détection par PCR et IHC s'avère une stratégie intéressante et permet d'atteindre un niveau de sensibilité très élevé (99,6%) ([Guyot D'Asnières De Salins et al., 2021](#)). Un panel IHC de quatre anticorps doit être préféré à des panels de deux anticorps pour éviter de manquer des cas MMRd, même si ce point a été très débattu. Les cas discordants doivent être relus afin de détecter les erreurs "courantes", dues par exemple à la mauvaise qualité de l'échantillonnage des tissus et/ou de la qualité de la fixation et de la coloration des tissus. Si la discordance reste inexplicée, les tests doivent être répétés et analysés par une équipe d'experts. La discordance est un problème majeur dans la sélection des patients pour un traitement par ICKi. Elles sont plus souvent dues à des erreurs d'interprétation de la PCR. Les limites des tests MMR IHC et PCR-MSI doivent être connues des médecins afin d'éviter toute interprétation erronée, ce qui peut entraîner des erreurs de gestion clinique, en particulier le recours aux ICKi. Notamment, mon laboratoire d'accueil a été montré

que la résistance primaire aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire dans les cancers colorectaux métastatiques était due au diagnostic erroné du statut MSI en premier lieu (faux positifs MMRp/MSI) (Cohen et al., 2019).

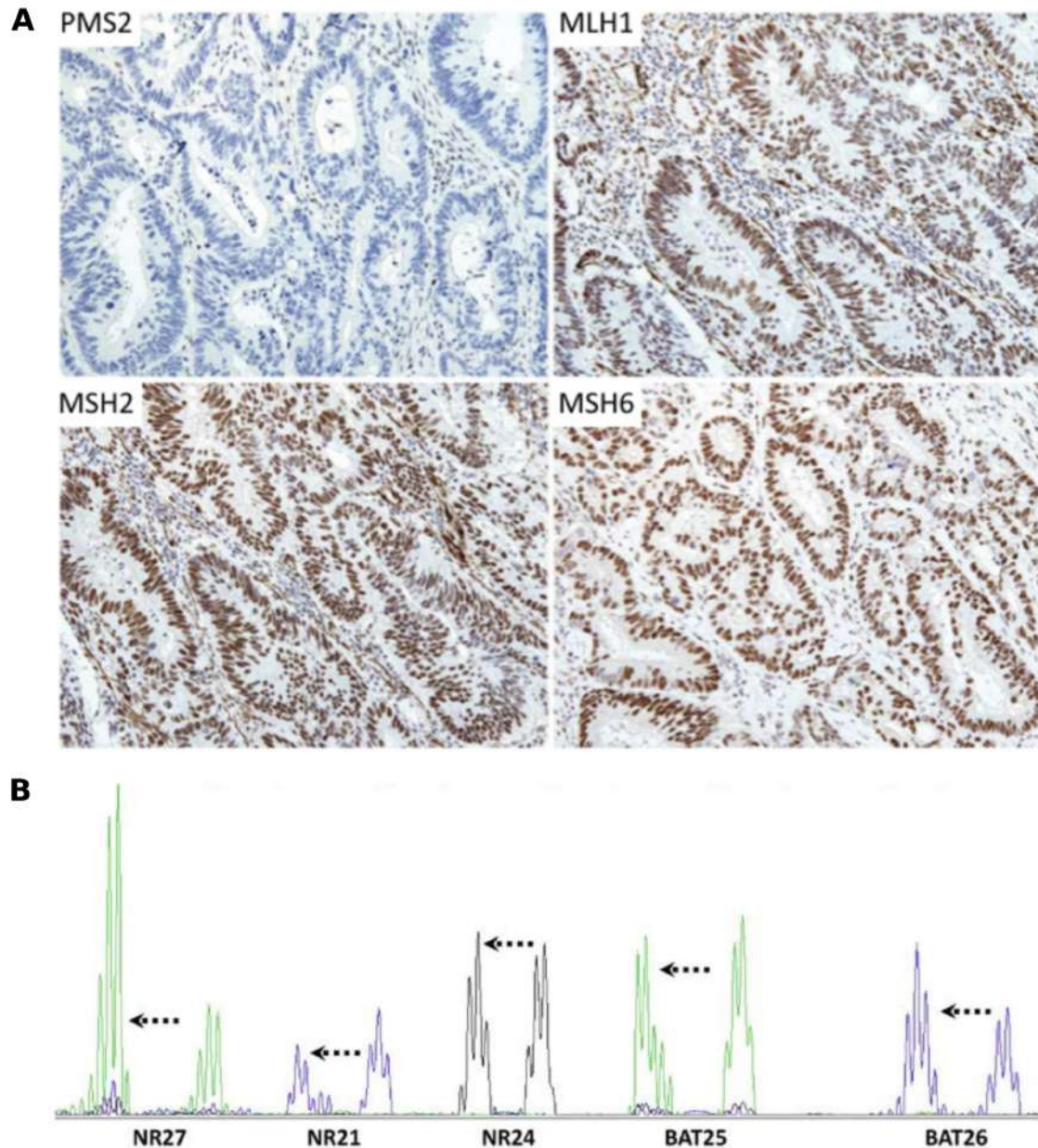


Figure 10: Détermination du statut MSI (microsatellite instability) des tumeurs.

(A) Immunohistochimie (IHC) des quatre protéines MMR (mismatch repair) ; exemple de perte d'expression de marquage PMS2 dans un cancer colorectal, avec conservation de l'expression de MLH1, MSH2 et MSH6 (x200) (d'après Mojtabed et al., 2011). (B) Allélotypage à l'aide des cinq marqueurs microsatellitaires de la pentaplex, BAT26, BAT25, NR21, NR24 et NR27 ; Dans la majorité des cas, l'instabilité des microsatellites se traduit par un raccourcissement des séquences répétées dans l'ADN tumoral par rapport à l'ADN normal (symbolisé par la flèche) (d'après Boland and Goel, 2010)

## 3.2 Méthode émergente pour le diagnostic MSI

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est en train de devenir un outil très répandu pour établir le profil génomique des tumeurs. Ce développement s'explique par l'augmentation des débits de séquençage, la baisse de leur prix et par sa capacité d'analyse transversale au-delà du simple diagnostic MSI. L'analyse de l'instabilité microsatellitaire est ainsi intégrée à une analyse globale des mutations génomiques du tissu tumoral demandée par les oncologues, selon une démarche à visée diagnostique et pronostique. Cette solution, qui repose sur la détection directe du phénotype MSI, est sensible et dispose encore d'un fort potentiel d'amélioration (coût/Mb, profondeur de séquençage, qualité des séquences). Le diagnostic NGS des tumeurs MSI présente également l'avantage d'être évolutif, puisqu'il peut être intégré à des panels ciblés (TGS) ou sur les analyses plus larges telles que l'exome ou le génome complet (WES, WGS). Ainsi plusieurs panels à visées diagnostiques ont été approuvés par la FDA afin d'orienter les praticiens hospitaliers dans leur choix thérapeutique en fonction du profil génomique de la tumeur du patient. Les méthodes émergentes basées sur le NGS devraient donc progressivement devenir un standard de référence pour détecter le phénotype MSI, même si elles présentent encore actuellement plusieurs limitations techniques et financières. Plusieurs de ces tests NGS sont proposés pour le diagnostic MSI sur l'ADN tumoral issu de biopsies solides et liquides (ADN circulant), avec des performances non encore clairement évaluées cliniquement par rapport aux méthodes PCR et IHC.

### 3.2.1 Panels de gènes

En 2017, la FDA a approuvé les deux tests de diagnostic NGS des aberrations génomiques pouvant donner lieu à un choix thérapeutique dans le cancer : FoundationOne CDx ([F1CDx](#)) et MSK-IMPACT ([Cheng et al., 2015](#)).

#### FoundationOne

La technologie F1CDx ("FoundationOne CDx") est utilisée comme test diagnostique compagnon pour la recherche de multiples mutations génétiques quel que soit le type tumoral. Le panel comprend 324 gènes ou fragment de gènes servant à la détection du statut MSI, de la charge mutationnelle des tumeurs (TMB pour Tumor Mutational Burden), du statut mutationnel de gènes clefs et biomarqueurs associés à des thérapies approuvées par la FDA.

Dans le cadre de la détection du statut MSI, la taille de 95 microsatellites (inclu-

ant les loci Bethesda) introniques d'une longueur de 10 à 20 pb de long est calculée dans chaque lecture. Les moyennes et les variances des longueurs de répétition sont enregistrées. Une analyse en composantes principales est utilisée pour projeter les données de 190 dimensions sur une seule dimension (la première composante principale) qui maximise la séparation des données, produisant un " score MSI ". Chaque échantillon se voit attribuer un statut qualitatif, MSI-Élevé (MSI-H) ou MSI-Stable (MSS) ; les plages du score MSI sont attribuées MSI-H ou MSS par regroupement manuel non supervisé. Les échantillons à faible couverture (moyenne < 250X) se voient attribuer le statut MSI-inconnu.

## MSK-IMPACT

Le panel MSK-IMPACT (Memorial Sloan Kettering- Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets) est un panel diagnostique qui utilise le séquençage ciblé de tissus tumoraux appariés à des échantillons normaux, fixés au formol et inclus en paraffine. Il recherche des altérations observées couramment dans différents cancers sur un large panel multigénique de 468 gènes dans sa dernière version (version 3).

Le statut somatique MSI est déduit en interrogeant tous les microsatellites génomiques disponibles et couverts par MSK-IMPACT. Les lectures de séquençage sont analysées via le logiciel MSIsensor (Niu et al., 2014) afin d'évaluer la longueur des microsatellites au sein des régions ciblées de la paire d'échantillons tumeur-normal. Les loci sont considérés comme instables si les distributions des k-mer sont significativement différentes entre la tumeur et le tissu normal apparié en utilisant une correction standard de test multiple de Chi2. La fraction en pourcentage des sites instables est rapportée comme le score MSIsensor. Le test utilise un seuil de score MSIsensor de 10% pour définir un statut MSI (Middha et al., 2017).

### 3.2.2 Diagnostic via l'ADN tumoral Circulant

L'utilisation d'échantillons tumoraux a des limites inhérentes, et oblige un accès à la tumeur dans le cadre d'un geste souvent invasif. La détection du phénotype MSI est réalisable sur l'ADN tumoral circulant (ADNtc), ce qui signifie que le prélèvement se limite dans ce contexte à une simple prise de sang, au lieu des biopsies solides qui sont beaucoup plus invasives pour les patients (Thierry et al., 2017; Perakis et al., 2017). La réalisation de ce diagnostic à partir d'échantillons de sang est cependant rendu difficile par une faible sensibilité due à la quantité infime d'ADNtc présent dans le sang (Rapisuwon et al., 2016). En outre, l'un des principaux défis techniques est la nature très fragmentée de l'ADNtc et aussi la faible fraction d'ADNtc par rap-

port à l'ADN total dans les fluides corporels (Diehl et al., 2008).

Au cours des dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés pour améliorer la résolution des approches tissulaires existantes et les adapter aux besoins de la biopsie liquide. Ces récents progrès technologiques dans le domaine (séquençage profond et/ou enrichissement par capture des microsatellites instables et peu polymorphes) ont montré un fort potentiel pour réduire les bruits de fond et ainsi améliorer l'efficacité de la détection.

Ainsi une bonne concordance globale a été observée entre les tests conventionnels MSI basés sur les tissus et les nouvelles approches basées sur l'ADNtc (Silveira et al., 2020; Georgiadis et al., 2019; Willis et al., 2019). Ceci suggère que le diagnostic MSI basé sur l'ADNtc pourrait rapidement être standardisé dans le cadre de la pratique clinique de routine afin de stratifier les patients ayant un meilleur pronostic et susceptibles de bénéficier d'une ICKi en particulier, lorsque les échantillons de tissu sont indisponibles ou rares (Georgiadis et al., 2019; Willis et al., 2019; Barata et al., 2020).

### **3.2.3 Outils bio-informatiques pour le diagnostic MSI :**

En raison de l'intérêt clinique du diagnostic MSI et du développement du séquençage à haut-débit (TGS, WES, WGS) en oncologie, plusieurs méthodes bio-informatiques ont fait leur apparition pour analyser avec précision les séquences répétées. L'objectif de ce chapitre n'est pas de fournir un panorama complet de toutes les méthodes actuelles disponibles (exemple : Tableau 3) mais en s'appuyant sur quelques exemples de fournir un panel représentatif des méthodes actuelles disponibles.

**Tableau 3 : Exemples d'outils bioinformatiques pour le diagnostic MSI**

Nom	Type d'échantillons	Méthode de diagnostic MSI
mSINGS	Tumor vs. base de référence	Classificateur binaire MSI/MSS
		seuil MSI-H: > 20% des loci instables
MSIsensor	Tumor vs tissu normal apparié	Classificateur binaire MSI/MSS
		seuil MSI-H: > 3,5 % des loci instables (seuil FDA>10%)
MSIsensor-pro	Tumor vs. base de référence	Classificateur binaire MSI/MSS
		seuil MSI-H: probabilité de délétion(p) > $\mu_i + 3\sigma_i$
MSIsensor-ct	ADNct vs base de référence	Classificateur binaire MSI/MSS
		blood MSIscore > 20%
MANTIS	Tumor vs tissu normal apparié	Classificateur binaire MSI/MSS
		seuil MSI : moyenne de l'agrégat des scores MSI >0.4
MIAMs	Tumor vs. base de référence	Classificateur binaire MSI/MSS
		mSINGS et SVM
MSI-ColonCore	Tumor vs. base de référence	Classificateur MSI-H/MSI-L/MSS
		seuil MSI-H: > 40% des loci instables
Méthode Cortes-Ciriano	Tumor vs tissu normal apparié	Classificateur binaire MSI/MSS
		Forêt aléatoire

## MSIsensor

MSIsensor ([Niu et al., 2014](#)) est actuellement le seul outil bio-informatique approuvé par la FDA pour la détection du phénotype MSI. L'algorithme effectue une comparaison des longueurs de distributions entre le tissu tumoral et le tissu sain apparié à l'aide d'un test du Chi2 de Pearson. L'algorithme calcule alors le score MSISensor qui correspond à la proportion de microsatellites instables (mutés) par rapport à l'ensemble des microsatellites testés. Les recommandations FDA ([DEN170058](#)) ([Middha et al., 2017](#)) préconisent un score MSISensor supérieur ou égal à 10% pour classer la tumeur MSI (>3,5% dans la publication originale ; [Niu et al. 2014](#)). Des versions plus récentes de MSIsensor ont été conçues pour la détection de l'instabilité des microsatellites en utilisant uniquement des données tumorales, sans nécessité le tissu sain apparié (MSIsensor-pro, [Jia et al. 2020](#)) ou en utilisant des séquences issus de l'ADNtc dans le plasma (MSIsensor-ct, [Han et al. 2021](#)).

MSIsensor-pro ([Jia et al., 2020](#)) évalue l'instabilité des microsatellites sur les données NGS (BAM : Binary Alignment Map files) de la tumeur en quantifiant les événements de glissements de la polymérase et utilise une méthode de sélection discriminante des sites à analyser, préalablement déterminé pour permettre la détection des MSI sans échantillons normaux appariés. Pour construire la base de référence, une sélection de microsatellites a été faite sur la base des distributions des longueurs alléliques de 27200 microsatellites à partir de 1532 échantillons de tissus normaux (côlon, estomac, endomètre). MSIsensor-pro introduit un modèle de distribution

multinomial pour la quantification de ces glissements de polymérase. Une probabilité de délétion ( $p$ ) du modèle est utilisée pour évaluer la stabilité des microsatellites. Pour distinguer les sites instables des sites stables, la moyenne ( $\mu_i$ ) et l'écart-type ( $\sigma_i$ ) de  $p$  a été déterminée dans le  $i$ -ème site microsatellite dans les échantillons normaux. Plus précisément, un microsatellite est classé comme instable lorsque  $p > \mu_i + 3\sigma_i$ . Le score MSI est défini comme le pourcentage de sites instables parmi tous les sites détectés dans un échantillon. L'interprétation est basée sur le modèle de distribution multinomiale et une classification binaire MSS/MSI est établie.

MSIsensor-ct (Han et al., 2021) est un outil dédié à la détection du statut MSI à l'aide de données de séquençage de l'ADNc (Han et al., 2021). L'algorithme est basé sur un protocole d'apprentissage automatique et sur un set de 1476 sites microsatellites pour réaliser la classification MSI. Pour chaque échantillon, des classificateurs binaires (comme la machine à vecteurs de support, régression logistique) sont appliqués pour déterminer leurs stabilités. Le bMSI score (blood MSI score) correspond au pourcentage de sites instables, et un seuil de 20% est utilisé pour définir le statut MSI (MSI si bMSI score  $>$  20%). Des tests de performances démontrent qu'il peut évaluer de manière fiable le statut MSI sur des échantillons dont la teneur en ADNc est supérieure à 0,05% et la profondeur de séquençage supérieure à 3000X (Han et al., 2021). En outre, sa robustesse rend le MSIsensor-ct compatible avec tous les panels de séquençage de cancers couvrant un minimum de 30 microsatellites valides parmi le set des 1476 microsatellites.

## MANTIS

MANTIS (Microsatellite Analysis for Normal-Tumor InStability) est un algorithme qui permet une détection de l'instabilité des microsatellites entre le tissu tumoral et le tissu sain (Kautto et al., 2016). MANTIS analyse tous les types de microsatellites (mono, di, tri, tetra, penta) et estime l'instabilité en tant qu'agrégat de loci au lieu de différences de loci individuels. En effet, il établit la différence dans la distribution des reads de chaque locus entre normal et tumoral. Puis un score de différence des moyennes est calculé en utilisant tous les loci. Une classification binaire MSI / MSS est réalisée et un statut MSI est attribué si le score de différence moyen est  $>$  0.4. L'approche permet à l'outil d'évaluer l'instabilité générale présente dans un échantillon de tumeur, en utilisant les données de l'échantillon normal correspondant comme référence de correction d'erreur. De plus, en mutualisant les scores de tous les loci et en traitant la moyenne comme le score d'instabilité, l'évaluation bénéficie de la loi des grands nombres en réduisant l'impact que peuvent avoir des erreurs de séquençage ou des loci peu performants sur les résultats.

## mSINGS

mSINGS (Salipante et al., 2014) est un outil bioinformatique qui permet l'évaluation du statut MSI en utilisant uniquement l'échantillon tumoral (sans normal apparié). Pour cela, un groupe de microsatellites référence a été identifié se basant sur des signes d'instabilité spécifiques des tumeurs MSI. Par la suite, les résultats expérimentaux issus des tumeurs à tester sont comparés aux valeurs de la base de référence pour chaque locus, un test Z est utilisé pour évaluer la différence de distribution des longueurs des lectures et ainsi identifie les loci instables. Enfin, la fraction de loci instables par rapport au nombre total de loci analysés est calculée. La tumeur est classée MSI s'il existe plus de 20% de loci instable.

## MIAmS

MIAmS (Escudié et al., 2019) est une application conçue pour marquer le statut des microsatellites à partir d'amplicons NGS d'échantillons de tumeurs. Cet outil ne nécessite pas de tissu normal apparié pour la comparaison. MIAmS utilise l'apprentissage automatique pour prédire le statut MSI et utilise deux classifieurs indépendants (mSINGS et SVM). En outre, il produit un rapport HTML convivial qui permet aux biologistes d'évaluer manuellement les prédictions.

### 3.2.4 Autres outils basés sur la charge mutationnelle

#### MIRMMR

Contrairement aux autres méthodes qui reposent sur l'observation des microsatellites pour évaluer le statut MSI, MIRMMR (Microsatellite Instability Regression using Methylation and Mutations in R) est une méthode de prédiction orthogonale utilisant les niveaux de méthylation et les mutations dans les gènes de la voie MMR (Foltz et al., 2017). Cette méthode ne nécessite que l'échantillon tumoral, sans normal apparié.

MIRMMR se compose de plusieurs modules indépendants permettant de construire des modèles de régression logistique en utilisant les informations sur la méthylation de l'ADN et les mutations des gènes de la voie MMR pour classer le statut MSI. Ce score MIRMMR indique la probabilité prédite d'un échantillon d'avoir le statut MSI. Ainsi, des scores plus élevés indiquent une probabilité plus élevée d'être MSI. Une classification binaire est alors réalisée pour maximiser la sensibilité et la spécificité. Dans l'article original, un score MIRMMR  $> 0.19$  permet de diagnostiquer l'échantillon comme MSI.



## MSIpred

MSIpred ([Wang and Liang, 2018](#)) permet le diagnostic MSI en utilisant une technologie d'apprentissage automatique, la machine à vecteurs de support (SVM). Cette méthode se base sur la charge mutationnelle, en utilisant des échantillons appariés tumeur-normal. MSIpred calcule 22 éléments caractérisant la charge mutationnelle somatique de la tumeur à partir des données de mutation issues de WES. Il utilise ces éléments pour prédire le statut MSI de la tumeur avec un classificateur SVM entraîné avec 1074 tumeurs appartenant à quatre types tumoraux différents (côlon, rectum, estomac, endomètre).

### 3.3 Bilan et futures directions

La détermination du statut MSI dans les cancers est d'une importance clinique particulière compte tenu de son intérêt pronostique et même thérapeutique. L'IHC et la PCR représentent les méthodes de référence standard pour l'identification du statut MMRd/MSI sur les échantillons de tissu tumoraux. Au cours des dernières années, la biopsie liquide a conduit à un changement de paradigme majeur en oncologie, fournissant un substitut viable à la biopsie tissulaire pour les investigations moléculaires. D'autres études translationnelles sont nécessaires pour confirmer l'utilité clinique des approches basées sur le NGS et délimiter les applications potentielles dans la pratique de routine.

Les formats (TGS, WGS, WES) s'appuyant sur le séquençage à haut débit d'un nombre très important de loci sont en train d'entrer progressivement dans la pratique clinique. Le principal avantage de ces approches est qu'elles permettent de cribler simultanément un grand nombre de loci de microsatellites. Néanmoins, elles restent encore coûteuses et demande des infrastructures, des compétences spécifiques et du temps d'analyse. L'utilisation de panels pan-cancer s'avère une stratégie plus abordable pour évaluer le statut MSI sous réserve de disposer d'un nombre satisfaisant de microsatellites au sein de ces panels dont l'instabilité soit de surcroît importante et relativement spécifique à ce type tumoral et à même d'être détectée avec un outil bioinformatique performant.

# Chapitre 4

## Immunothérapie et traitements des tumeurs solides MSI

Au cours de la dernière décennie, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de l'activation immunitaire permettant l'immuno-évasion des cellules tumorales a révolutionné le domaine de l'immunologie et a permis d'aboutir à l'émergence de nouvelles immunothérapies. Dans ce cadre, l'immunothérapie anticancéreuse basée sur l'inhibition de points de contrôle immunitaire (ICKi) constitue une innovation thérapeutique de rupture.

Bien implantée dans les traitements des mélanomes et des cancers bronchiques non à petites cellules pour lesquels elle a obtenu des autorisations de mise sur le marché (AMM), son utilisation se heurte à des limites dans d'autres localisations tumorales. En effet, l'efficacité de l'immunothérapie est caractérisée par une activité clinique durable mais restreinte à un sous-groupe de patients. Discerner ce groupe de patients minoritaires et longs répondeurs est un défi majeur pour l'onco-immunologie dans les années à venir.

L'instabilité des microsatellites, causée par la déficience sporadique ou héréditaire (syndrome de Lynch) du système de réparation des mésappariements des bases, semble être à ce jour un facteur performant pour prédire l'efficacité des ICKi ([André, 2019](#); [Nebot-Bral et al., 2017](#)). Au cours de ce chapitre nous présenterons d'abord l'immunité anti-tumoral et les différents mécanismes d'évasion permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Puis nous nous concentrerons sur les points de contrôles immunitaires et l'émergence des immunothérapies dans les cancers colorectaux MSI. Enfin, nous aborderons les différents bio-marqueurs prédictifs de la réponse aux ICKi connus à ce jour.

## 4.1 L'immunologie des cancers

### 4.1.1 L'immunité anti tumorale

Le système immunitaire est constitué d'un réseau complexe de cellules et d'organes. Sa principale fonction est de protéger l'hôte contre un large éventail d'agents pathogènes, qui sont considérés comme des corps étrangers. La réponse immune joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les tumeurs et le système immunitaire est un régulateur essentiel de la biologie de ces dernières. Il est capable de soutenir ou d'inhiber le développement, la croissance, l'invasion et les métastases des tumeurs. Il fait intervenir d'une part, l'immunité innée, avec notamment des cellules cytotoxiques (ex : lymphocytes NK), et des facteurs solubles (ex : interféron gamma), qui peuvent avoir des effets directs ou indirects (pro-inflammatoire ou anti-angiogénique). Et d'autre part, l'immunité adaptative, comme décrite au premier chapitre, permet notamment la reconnaissance spécifique des antigènes produits par les tumeurs.

Les principaux effecteurs de la réponse immune anti-tumorale sont les lymphocytes, comprenant notamment les cellules T et B, mais aussi les cellules NK. Les cellules T et B expriment toutes deux à leur surface des récepteurs pour les antigènes, respectivement les récepteurs des cellules T (TCR) et récepteurs des cellules B (BCR). Chaque cellule n'exprime qu'un seul type de récepteur, et il existe une très grande diversité pour ces récepteurs. Contrairement aux cellules B, les cellules T n'ont pas la capacité de reconnaître directement les antigènes dont elles sont spécifiques. L'antigène doit être présenté par des molécules du CMH, et un récepteur membranaire des lymphocytes T doit se lier aux molécules du CMH elles-mêmes.

Les cellules qui participent à l'immunité adaptative et innée proviennent d'un processus commun appelé hématopoïèse. Et les interactions complexes entre les cellules du système immunitaire sont régulées par des molécules solubles appelées cytokines. Comme toute réaction immunitaire, la réponse immunitaire anti tumorale est associée à la présence d'anticorps spécifiques (donc une réponse à médiation humorale) et des cellules T cytotoxiques puis auxiliaires (Tc et Th) spécifiques (donc une réponse à médiation cellulaire).

Une fois les lymphocytes présents au niveau du site tumoral, ils reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales qui présentent à leur surface des antigènes tumoraux associés à une molécule de CMH. L'activation du lymphocyte T résulte d'une balance de signaux activateurs et inhibiteurs, liée en particulier aux récepteurs des checkpoints immunitaires. La lyse de la cellule tumorale par le lymphocyte T

cytotoxique entraîne le relargage d'antigènes tumoraux supplémentaires, ce qui permet de relancer le cycle de l'immunité anticancéreuse afin d'intensifier la réponse antitumorale. Étant donné que par définition l'éradication d'une tumeur nécessite l'élimination physique de la totalité des cellules tumorales, la cytotoxicité à médiation cellulaire semble jouer le rôle principal.

#### 4.1.2 L'échappement à la surveillance immunitaire

Si la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire et la capacité de ce dernier à contrôler le développement des tumeurs ont été évoquées il y a plus d'un siècle par Paul Ehrlich (1909) puis reformulées en 1957 par Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas sous le concept d'immunosurveillance antitumorale, ce n'est que récemment que l'échappement au système immunitaire a été reconnu comme une des propriétés importantes permettant de définir un cancer ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)). Dans le cadre de la maladie cancéreuse, les cellules tumorales ont acquis la capacité de détourner leur reconnaissance et/ou leur destruction par le système immunitaire. Et plusieurs mécanismes interviennent pour permettre à la cellule tumorale d'échapper à la surveillance du système immunitaire.

#### Défauts des lymphocytes antitumoraux

Les cellules tumorales étant avant tout des cellules saines (du soi) qui ont progressivement dégénéré en cellules cancéreuses, les antigènes tumoraux sont souvent des antigènes du soi ou des antigènes proches du soi. Aussi, comme l'organisme cherche à limiter le développement de maladies auto-immunes, la plupart des lymphocytes potentiellement autoréactifs, reconnaissant ces antigènes partagés avec le soi, sont supprimés dès leur différenciation au niveau du thymus (délétion clonale) ([Lauritzen et al., 1998](#)). C'est pourquoi les lymphocytes antitumoraux peuvent être peu nombreux, et leur récepteur antigénique (TCR) de faible affinité ([Hoffmann and Slansky, 2020](#)).

#### Cellule tumorale : mécanismes tumoraux d'échappement

Pour éviter une reconnaissance par le système immunitaire, la cellule tumorale peut déployer plusieurs stratégies. Elle peut empêcher la présentation de l'antigène tumoral, notamment en diminuant l'expression de l'antigène tumoral concerné, ou encore en affaiblissant celle du CMH ([Beatty and Gladney, 2015](#); [Jhunjunwala et al., 2021](#)). Les cellules transformées naissantes peuvent être sélectionnées sur la base d'une perte d'antigénicité (i ; Figure 11). De plus, le système immunitaire peut sélectionner les clones tumoraux faiblement immunogènes. En effet, la cellule tumorale peut également produire et libérer des molécules immunosuppressives

comme IDO, TGF $\beta$ , IL-10 ou PGE2. Elle peut augmenter l'expression de molécules anti-apoptotiques (BCL-2, FLIP) ou encore libérer des molécules de mort cellulaire (FAS-ligand) afin d'entraîner l'apoptose des lymphocytes T ou des NK (Beatty and Gladney, 2015; Sordo-Bahamonde et al., 2020). Enfin, elle peut exprimer des ligands des checkpoints immunitaires (comme PD-L1) pour empêcher l'activation des lymphocytes cytotoxiques et en favoriser l'anergie (ii ; Figure 11).

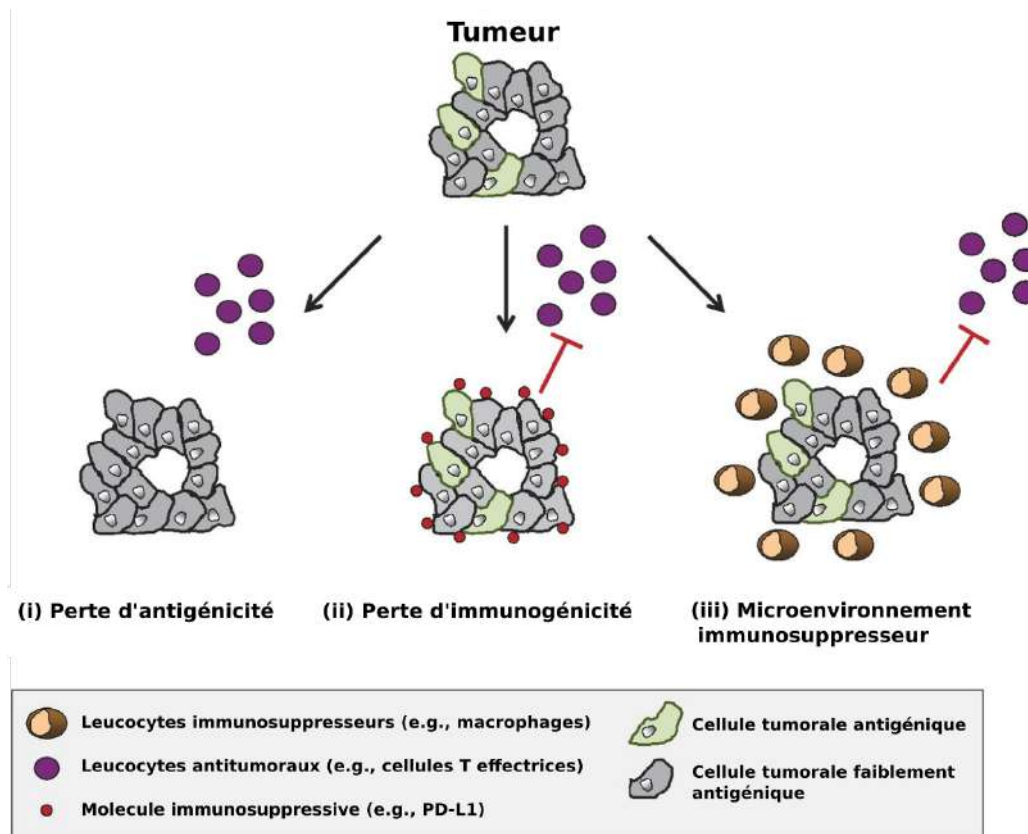


Figure 11: Mécanismes d'échappement immunitaire dans le cancer.

Les tumeurs cliniquement apparentes doivent développer des mécanismes pour échapper à l'élimination immunitaire. Au cours de ce processus, les cellules transformées naissantes peuvent être sélectionnées sur la base (i) d'une perte d'antigénicité et/ou (ii) d'une perte d'immunogénicité. La perte d'antigénicité peut être obtenue par l'acquisition de défauts dans le traitement et la présentation des antigènes ou par la perte d'antigènes tumoraux immunogènes conduisant à un manque de peptides immunogènes présentés dans le complexe peptide-CMH. Bien qu'une perte d'antigénicité soit également associée à une perte d'immunogénicité, les cellules malignes peuvent acquérir des propriétés immunosuppressives supplémentaires, telles que l'expression de PD-L1 ou la sécrétion de cytokines suppressives (par exemple, IL10 et TGF $\beta$ ), ce qui réduit encore leur immunogénicité. (iii) Les tumeurs peuvent également échapper à l'élimination immunitaire en orchestrant un microenvironnement immunosuppresseur. La transformation maligne induite par des altérations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs peut conduire au recrutement d'une réponse immunitaire qui supprime l'immunité antitumorale. Adapté de Beatty and Gladney, 2015

### Rôle immunosuppresseur du microenvironnement tumoral

Par ailleurs, la cellule tumorale est capable de recruter, dans son microenvironnement, tout un ensemble de cellules immunosuppressives pour faciliter l'évasion tumorale (Figures 11 ; iii et Figure 12). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  pour inhiber

les lymphocytes T. Les cellules dendritiques tolérogènes diminuent l'expression de checkpoints immunitaires activateurs (CD80, CD86) ou libèrent des molécules immunosuppressives, comme l'IDO, pour empêcher une activation efficace des lymphocytes T antitumoraux. Les macrophages de type 2 (M2) favorisent un environnement immunosuppresseur via la sécrétion d'IL-4 ou d'IL10. Enfin, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) libèrent des substances comme l'arginase (Arg-1), de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ou du TGF $\beta$  qui vont permettre de supprimer les réponses T et de recruter des lymphocytes T régulateurs (Figure 12).

### Fibroblastes associés au cancer (CAF) :

Les fibroblastes du stroma tumoral peuvent sécréter des facteurs pro-tumoraux, comme avec la production de facteurs de croissance épithéliaux (EGF) ou vasculaires (VEGF). Ils ont également la capacité d'attirer des cellules immunosuppressives via la libération de chimiokines. Par ailleurs, la production de molécules de la matrice extracellulaire (fibrinogène, collagène) leur permet de compliquer l'accès des lymphocytes à la tumeur en créant une barrière physique (Sahai et al., 2020) (Figure 12).

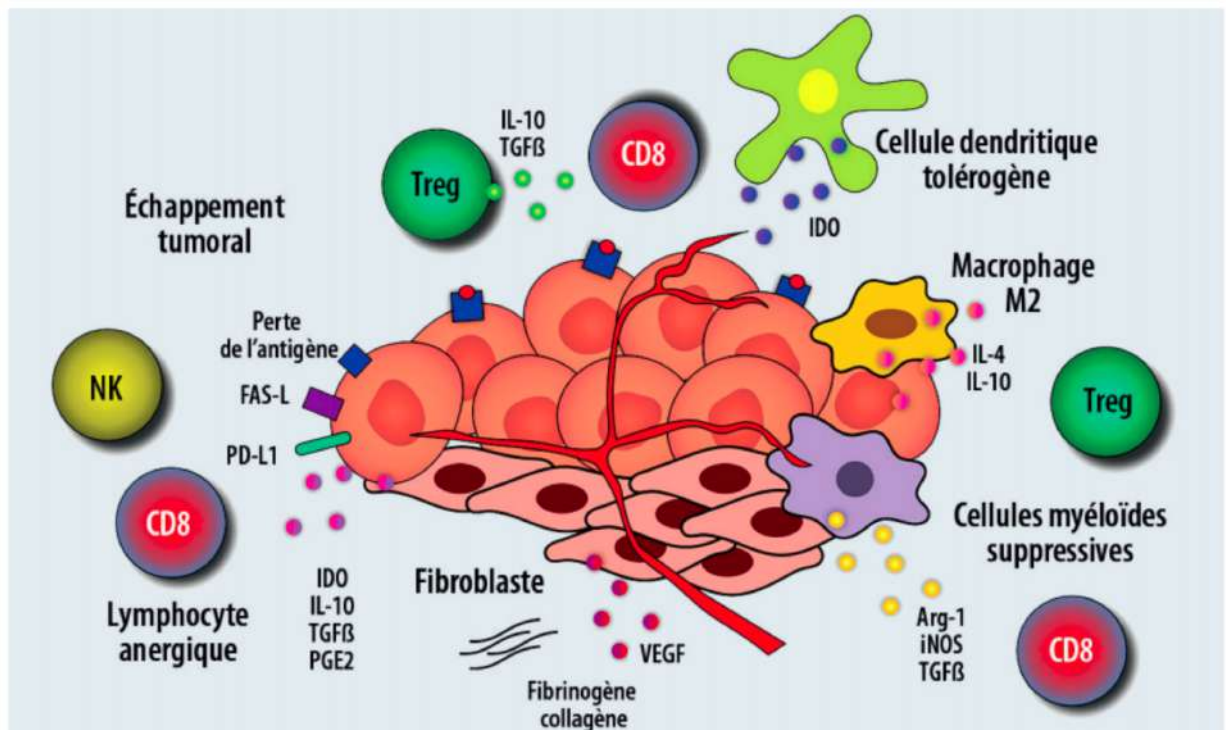


Figure 12: Le microenvironnement immunosuppresseur (D'après Champiat et al., 2016)

## Les Points de contrôle immunitaires (ICK)

Comme nous l'avons vu précédemment, les ICK régulent l'activation immunitaire. Ils jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et la prévention de l'auto-immunité. Dans le cas du cancer, les mécanismes des ICK sont souvent activés pour supprimer la réponse immunitaire antitumorale naissante. Cela a mené à la mise au point de plusieurs anticorps inhibiteur (ICKi) qui font actuellement l'objet d'essais cliniques ou qui ont été même approuvés pour le traitement d'un certain nombre de cancers.

**Mécanisme d'action** Les ICK sont essentiels dans le processus d'activation des cellules immunitaires. Ils interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immune. Il existe à la surface d'une même cellule des récepteurs coactivateurs (qui renforcent l'activation) et des récepteurs co-inhibiteurs (qui diminuent l'activation) (Figure 13). C'est l'équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si une cellule immunitaire peut s'activer. Ainsi, lorsqu'un lymphocyte T reconnaît son antigène spécifique grâce à son récepteur antigénique (TCR), il ne pourra être activé que si les différents signaux envoyés par ses points de contrôle sont en faveur d'une activation. Ce phénomène est physiologiquement très important. Il intervient pour prévenir le risque d'auto-immunité (récepteurs inhibiteurs) mais aussi renforcer l'activation du système immunitaire en cas d'infection par exemple (récepteurs activateurs). Il permet aussi de prévenir une réaction excessive du système immunitaire : lorsqu'une réponse immunitaire a lieu, les signaux inflammatoires libérés dans le microenvironnement vont favoriser l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs par les cellules à proximité afin d'éviter un emballement de la réaction immune.

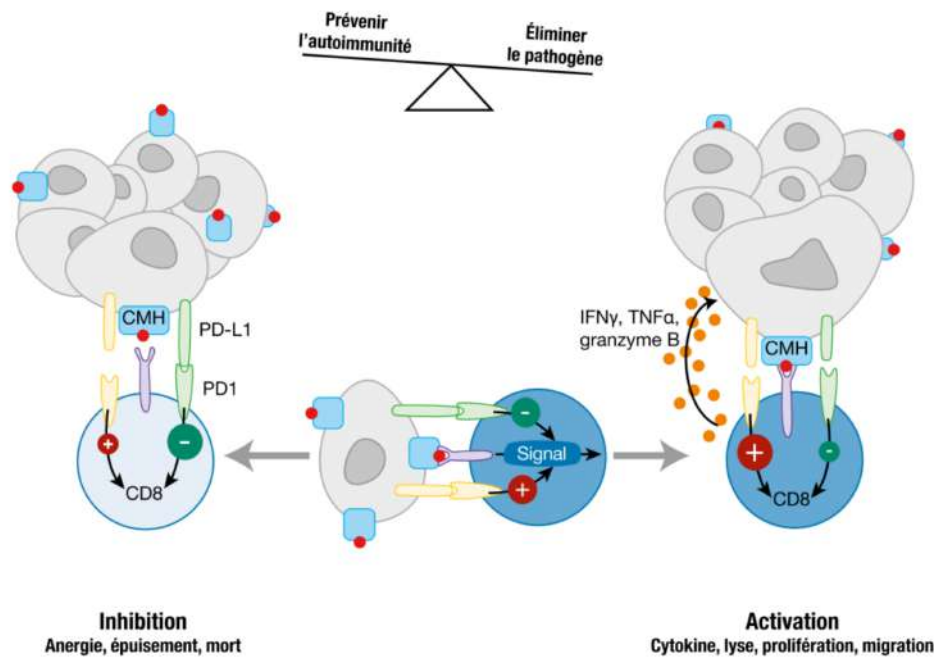


Figure 13: Les points de contrôle de l'immunité permettent un équilibre de la réponse immunitaire

(D'après Vuagnat and Champiat, 2018)

Les lymphocytes T activés sont les principaux médiateurs des fonctions effectrices du système immunitaire et, à ce titre, ils expriment de multiples récepteurs co-inhibiteurs tels que le gène d'activation lymphocytaire 3 (LAG-3), la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) et la protéine cytotoxique T-lymphocytaire associée 4 (CTLA-4). Il a été démontré que ces molécules immunitaires modulent la réponse des lymphocytes T aux auto-protéines ainsi qu'aux infections chroniques et aux antigènes tumoraux (Pardoll, 2012). Notamment, les voies utilisées par ces protéines aux points de contrôle sont uniques et non redondantes (Nirschl and Drake, 2013). Cela démontre le rôle important des points de contrôle immunitaires dans la régulation de l'homéostasie immunitaire et justifie le ciblage de plusieurs points de contrôle immunitaires pour améliorer l'immunité antitumorale.

**Épuisement lymphocytaire dans les tumeurs** Les cellules cancéreuses sont capables de détourner le système des checkpoints à leur avantage. En effet, les cellules tumorales sont capables de surexprimer à leur surface les ligands des récepteurs inhibiteurs pour échapper au système immunitaire grâce à certains mécanismes (Figure 14), à savoir:

- Un mécanisme intrinsèque, ou encore résistance primaire (Résistance innée): du fait de mutations, la cellule tumorale se met à exprimer naturellement les ligands



inhibiteurs.

- Un mécanisme adaptatif ou encore Résistance secondaire (Résistance adaptative) se produisant en réaction à une attaque par le système immunitaire : lorsque la tumeur est attaquée, la libération de cytokines inflammatoires (IFN) par les cellules immunes dans le microenvironnement favorise l'expression de ligands inhibiteurs à la surface des cellules tumorales. Ainsi, L'expression de PD-L1 par les cellules environnantes peut être induite par l'IFN sécrété par les cellules Th1 et T CD8+ activées (Loke and Allison, 2003; Lee et al., 2005; Garcia-Diaz et al., 2017)

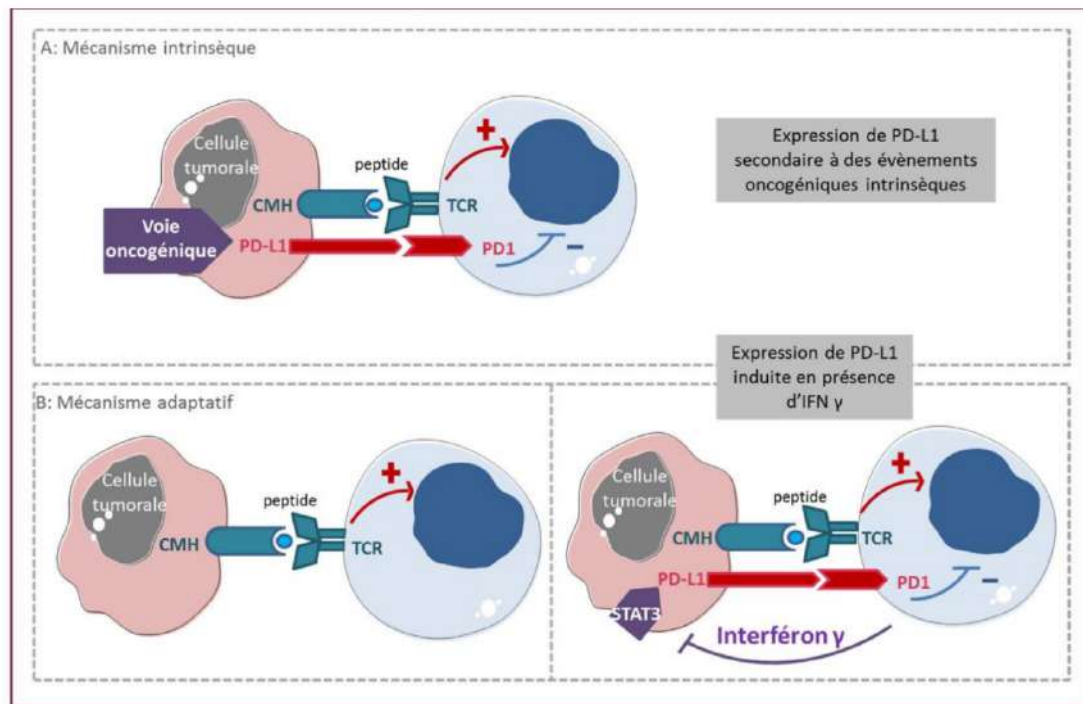


Figure 14: Mécanisme d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

A : expression de PD-L1 par les cellules tumorales, suite à l'activation de voies oncogéniques. B : mécanisme adaptatif de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, suite à la sécrétion d'interféron par les lymphocytes T. (D'après Granier et al., 2017)

Les cellules tumorales peuvent échapper à la destruction par les cellules immunitaires adaptatives en exprimant les ligands des points de contrôle immunitaires (Pardoll, 2012; Marcucci et al., 2017). Une part importante des tumeurs peut acquérir la capacité d'exprimer PD-L1 (Dong et al., 2002; Thompson et al., 2004) ou PD-L2 (Yearley et al., 2017). Ils se lient tous deux à PD-1 à la surface des cellules T activées. Il en résulte une réduction de la cytotoxicité (Blank et al., 2004), de la prolifération (Carter et al., 2002) et de la réponse à la stimulation du TCR (Freeman et al., 2000) des cellules T. Il a été démontré que PD-L1 était suffisant pour induire un échappement immunitaire (Juneja et al., 2017) et que PD-L2 est induit par l'IFN et par l'interleukine Th2 IL-4 (Loke and Allison, 2003).

Tout comme les lymphocytes infiltrant les tumeurs, une forte proportion de macrophages associés aux tumeurs (TAM) exprime la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD1) ([Gordon et al., 2017](#)). L'expression de son ligand PD-L1 par les cellules tumorales inhibe la phagocytose et la réponse immunitaire par les TAMs. Ainsi, dans le contexte de cancer, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ou du stroma constitue l'un des mécanismes d'échappement à l'immunosurveillance responsable de l'inhibition de la réaction immune antitumorale de l'hôte et de l'anergie voire de l'élimination des lymphocytes T effecteurs infiltrant la tumeur.

### **4.1.3 Echappement Immunitaire dans les cancers MSI**

Dans un contexte MSI, une activation immunitaire massive liée à la haute charge antigénique tumorale et la haute immunogénicité des mutations par décalage du cadre de lecture est observée dans les cellules cancéreuses. Elle s'accompagne d'une augmentation de l'expression de régulateurs négatifs du système immunitaire : les points de contrôle immuns. Ainsi les cellules tumorales reconnues par les lymphocytes cytotoxiques activent des inhibiteurs de la réponse lymphocytaire telle que PD-1 (Programmed Death-1 receptor), CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3) ou TIM-3 (T Cell Immunoglobulin Mucin 3). Ce processus est responsable dans ces tumeurs du phénotype d'épuisement des lymphocytes T suite à l'inhibition de leur réactivité (notion d'exhaustion lymphocytaire) (Figure 15).

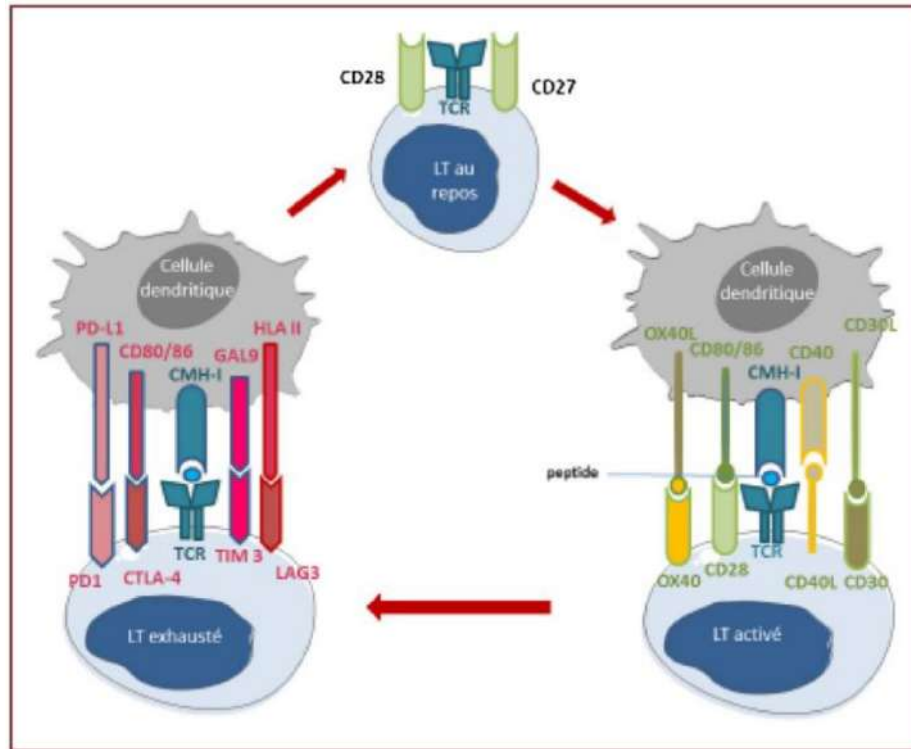


Figure 15: Molécules de co-stimulation activatrices et inhibitrices au cours de l'activation des lymphocytes T (LT).

Au repos, le LT exprime des molécules de co-stimulation activatrices (CD28, CD27) qui vont délivrer le signal d'activation (2e signal) aux LT. Au cours de l'activation lymphocytaire, d'autres molécules de co-stimulation activatrices puis inhibitrices vont être exprimées. Les molécules de co-stimulation inhibitrices permettent le retour à l'homéostasie des LT. En cas de persistance de l'exposition antigénique (cancer, inflammation chronique), l'expression de ces molécules inhibitrices va se chroniciser. (D'après [Granier et al., 2017](#))

Une analyse génomique à grande échelle dans les CCR a montré que les patients MSI subissent fréquemment un processus d'immuno-édition qui leur fournissent des événements génétiques permettant d'échapper au système immunitaire malgré une charge mutationnelle élevée et une infiltration lymphocytaire fréquente ([Grasso et al., 2018](#)). Par ailleurs, un événement courant conduisant à l'évasion immunitaire est la mutation du gène Beta2-microglobuline (B2M), qui provoque une perte complète de l'expression liée à l'antigène HLA de classe I à la surface des cellules affectées, empêchant ainsi leur reconnaissance par les cellules T CD8+ ([Kloor et al., 2007](#); [Cabrera et al., 2003](#); [Bicknell et al., 1996](#)). Un mécanisme supplémentaire qui peut interférer avec la présentation de l'antigène HLA de classe I dans les cellules cancéreuses MSI est constitué par les mutations de TAP1 et TAP2, qui inactivent le transporteur de présentation de l'antigène ([Kloor et al., 2005](#)). Plus récemment, la perte de l'expression de l'antigène HLA classe II a été décrite dans le cancer MSI, résultant de mutations affectant les gènes régulateurs HLA classe II RFX5 et CIITA ([Surmann et al., 2015](#); [Michel et al., 2010](#)). De plus, l'expression de FasL par les cellules cancéreuses MSI a été décrite comme un mécanisme potentiel de suppression de l'activité locale des cellules T, bien que les données soient

controversées ([Kloor et al., 2010](#)).

## 4.2 Immunothérapies pour le traitement des cancers MSI

### 4.2.1 Stratégie d’Inhibition de points de contrôle immunitaire (ICKi)

Les inhibiteurs d’ICK permettent de renverser l’immunosuppression induite par la tumeur. En effet, ces dernières années, la plus grande avancée dans le traitement du cancer a été le blocage des points de contrôles immunitaires. Cette approche a conduit à des dizaines d’approbations de médicaments par la FDA/EMA (European Medicines Agency) et à des milliers d’essais cliniques dans le monde entier au cours des dernières années.

Les immunothérapies anti-checkpoints sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les points de contrôle du système immunitaire. Actuellement, les ICKi qui sont le plus utilisés en cancérologie ciblent des récepteurs inhibiteurs:

- le CTLA4 (Cytotoxic T LymphocyteAssociated antigen 4),
- le PD1 (Programmed cell Death protein 1) et son ligand PD-L1.

#### CTLA-4

Le premier point de contrôle immunitaire à être ciblé a été le CTLA-4. CTLA-4 est un récepteur inhibiteur sur les cellules T qui se lie à CD80 et CD86. Il facilite également les fonctions de régulation des Tregs ([Pardoll, 2012](#)). Il a été utilisé comme cible pour potentialiser la réponse immunitaire antitumorale. Les anticorps monoclonaux ciblant CTLA-4 bloquent sa liaison. Cela a pour effet d’appauvrir ou de neutraliser les cellules Treg et de faciliter l’activation des cellules T par le CD28, ce qui renforce la réponse immunitaire adaptative contre la tumeur ([Rowshanravan et al., 2018](#)). Après avoir démontré en 1996 que le blocage de CTLA-4 chez la souris entraînait une régression de la tumeur ([Leach et al., 1996](#)), des médicaments ciblant CTLA-4 ont été testés dans des essais cliniques sur le mélanome ([Phan et al., 2003](#)). Les deux principaux anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 utilisés sont l’ipilimumab et le tremelimumab.

## PD1/PD-L1

PD-1 est un récepteur exprimé sur les cellules T activées. Lorsqu'il est lié à ses ligands PD-L1 ou PD-L2, il déclenche une cascade de signalisation qui réduit l'activité des lymphocytes T. Pour empêcher cette réduction/suppression d'activité des lymphocytes T dans les tumeurs, il a été suggéré de bloquer l'axe PD-1/PD-L1 ([Dong et al., 2002](#); [Iwai et al., 2002](#)). Cela conduit à surmonter la résistance immunitaire ([Tumeh et al., 2014](#)). L'un des avantages du blocage de PD-1 est qu'il a une expression plus large que CTLA-4 : il peut également être exprimé par les cellules B et NK ([Terme et al., 2011](#); [Fanoni et al., 2011](#)). Par conséquent, le blocage de PD-1 pourrait potentialiser non seulement les réponses des lymphocytes T, mais également la régression tumorale médiée par les cellules NK et la production d'anticorps par les plasmocytes. L'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 induit également une toxicité réduite par rapport au blocage de CTLA-4 ([Pardoll, 2012](#)). Le premier essai clinique bloquant PD-1 a rapporté une efficacité principalement dans le carcinome à cellules rénales, le cancer du poumon et le mélanome ([Brahmer et al., 2010](#)). Plusieurs anticorps monoclonaux pour bloquer l'axe PD-1/PD-L1 ont maintenant été approuvés par la FDA et l'EMA. On peut notamment citer les anti PD-1 nivolumab et pembrolizumab, et les anti PD-L1 atezolizumab, durvalumab et avelumab. De nombreux essais cliniques sont toujours en cours pour évaluer l'efficacité de cette option de traitement dans d'autres tumeurs malignes.

### 4.2.2 Effets secondaires

La toxicité de l'immunothérapie est très différente de celle des chimiothérapies cytotoxiques ou des thérapies ciblées. L'utilisation d'inhibiteurs des points de contrôle immunitaires expose à un large spectre de toxicités auto-immunes de sévérité variable (Tableau 4 & Figure 16) ([Champiat et al., 2016](#)). Les effets indésirables de l'immunothérapie surviennent majoritairement dans les 4 premiers mois de traitement, mais certaines manifestations peuvent survenir plus tardivement au cours du traitement, voire après la fin de celui-ci.

**Tableau 4 : Principales toxicités des inhibiteurs de point de contrôle immunitaires**

Toxicités fréquentes (> 10 %)
<b>Ipilimumab (anti CTLA-4)</b> Diarrhée, rash cutané, prurit, asthénie, nausée, perte d'appétit et douleur abdominale
<b>Nivolumab (anti PD-1)</b> Asthénie, rash cutané, prurit, diarrhée et nausée
<b>Pembrolizumab (anti PD-1)</b> Diarrhée, nausée, prurit, rash cutané, arthralgies et asthénie
Toxicités rares (< 10 %) sévères
Colite avec risque de perforation
Pneumopathie interstitielle ou syndrome de détresse respiratoire aigu
Choc anaphylactique
Acido-cétose diabétique
Syndrome de Stevens Johnson
Syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (DRESS)
Anémie hémolytique
Thrombopénie ou neutropénie auto-immune
Syndrome de Guillain Barré
Encéphalopathie
Myocardite
Insuffisance surrénale aiguë
Épanchement pleural ou péricardique
Néphropathie

L'immunothérapie peut induire une réaction inflammatoire importante, exposant au risque de majoration transitoire des symptômes de la maladie, comme une dyspnée en cas de lymphangite carcinomateuse ou un syndrome méningé en cas de méningite carcinomateuse.

Enfin, l'immunothérapie peut également augmenter les réactions à une infection latente comme une tuberculose ou une hépatite virale.

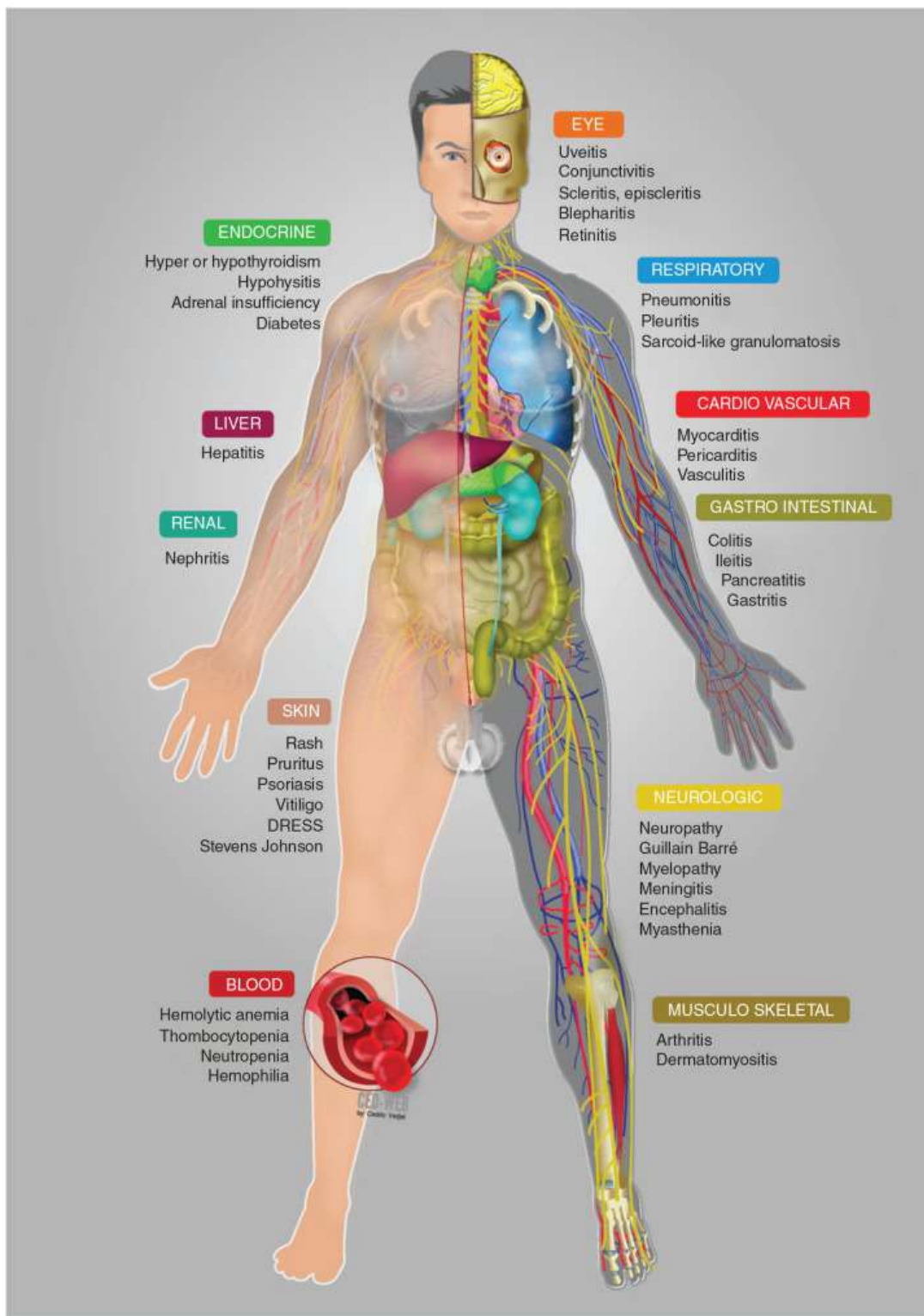


Figure 16: Spectre de toxicité des agents de blocage des points de contrôle immunitaires.

(D'après Champiat et al., 2016)

### 4.2.3 Emergence de l'immunothérapie pour les cancers MSI ICKi en monothérapie

En 2015, une première étude de phase 2 (NCT01876511) présentée au congrès annuel de l'association américaine d'oncologie médicale (ASCO) et publiée simultanément dans le New England Journal of Medicine a évalué le pembrolizumab en monothérapie dans le traitement de tumeurs colorectales ou non colorectales métastatiques MSI et de tumeurs MSS échappant aux traitements conventionnels (Le et al., 2015). Sur les 10 patients atteints de CCR MMRd/MSI, 4 ont eu une réponse partielle et 5 une maladie stable à 20 semaines. Un taux de réponse élevé, une survie sans progression (SSP) et une survie globale (SG) exceptionnellement longues ont été observés chez les patients avec tumeur MSI, comparés aux patients avec tumeur MSS (Figure 17).

L'actualisation des résultats présentée au congrès annuel 2016 de l'ASCO a confirmé que le statut tumoral MMRd/MSI était un facteur prédictif de l'efficacité de l'immunothérapie par ICKi, au contraire du statut MMRp/MSS dans le cancer colorectal. Le taux de réponse dans la cohorte MMRd (N = 28) est de 50% contre 0% dans la cohorte MMRp (N = 25) (Le et al., 2016). Par ailleurs, les résultats d'une extension de cette étude publiée en 2017 sur 12 types de tumeurs ont démontré que le pembrolizumab était efficace dans les tumeurs MMRd quel que soit le tissu d'origine (Le et al., 2017).

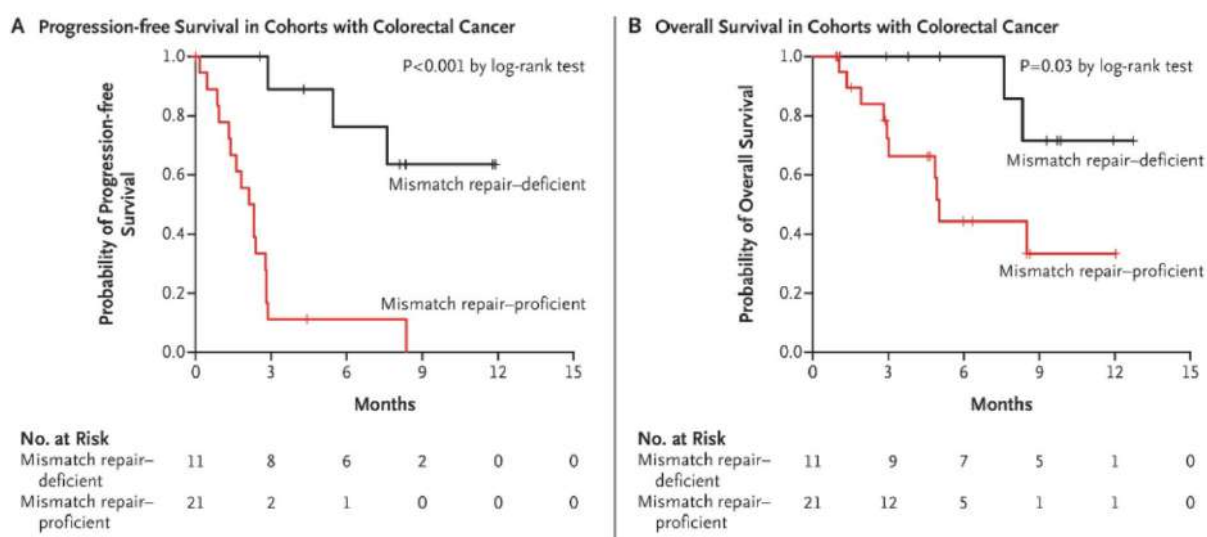


Figure 17: Bénéfice clinique du traitement par pembrolizumab en fonction du statut MMR

Les courbes de Kaplan-Meier sont présentées dans des cohortes de CCR pour la survie sans progression (panneau A) et pour la survie globale (panneau B) et en fonction du statut MMR. (Le et al., 2015)



## Combinaison d'ICKi

D'autres inhibiteurs de points de contrôle immunitaires ont également été évalués pour les CCRm MMRd/MSI. Ainsi le nivolumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1 a été testé seul ou en association à l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Dans l'essai CheckMate 142 ([NCT02060188](#)), le nivolumab, a été testé chez 74 patients atteints de CCRm MMRd-MSI qui ont progressé ou ont été intolérants à au moins une ligne de traitement antérieur (comprenant une fluoropyrimidine et l'oxaliplatine ou l'irinotécan) ([Overman et al., 2017](#)). L'association du nivolumab et de l'ipilimumab a également été évaluée dans cet essai [Overman et al. \(2018\)](#); [Andre et al. \(2018\)](#). Les résultats mis à jour de CheckMate 142 dans la cohorte complète de 119 patients avec une durée médiane de suivi de 13,4 mois ont démontré un taux de réponse objective de 55%. L'association nivolumab + ipilimumab semble donner d'encore meilleurs résultats avec un taux de SSP à 12 mois de 71% et de SG à 12 mois de 85% ([Andre et al., 2018](#)).

Sur la base de ces données convaincantes sur les CCR MMRd/MSI, la FDA a accordé une approbation accélérée au pembrolizumab en mai 2017 et au nivolumab en juillet 2017 pour le traitement de deuxième ligne des patients atteints de CCRm MMRd/MSI. Une AMM européenne a également été accordée en 2021 au nivolumab avec l'ipilimumab pour le traitement des patients avec un cancer colorectal métastatique MMRd/MSI chimiorésistant.

## ICKi en première ligne dans les stades IV MSI:

Les derniers résultats de l'essai de phase II Checkmate 142 évaluant cette fois l'efficacité et l'innocuité d'un traitement combiné par nivolumab et ipilimumab en première ligne de traitement chez des patients atteints d'un CCR de stade IV MMRd/MSI ont été présentés lors du congrès annuel de l'ESMO (European Society for Medical Oncology) 2020 ([Lenz et al., 2020](#)).

Chez 45 patients inclus, avec un suivi médian de 29 mois, le taux de réponse objectif est passé de 60% (IC 95% : 44,3-74,3) à 69% (IC 95% : 53-82), le taux de réponse complète (CR) est passé de 7% à 13% ([Lenz et al., 2018, 2020](#)). La thérapie Nivolumab et ipilimumab à faible dose a montré et continue à montrer un bénéfice clinique robuste et durable avec une amélioration de la réponse. De plus, le traitement a été bien toléré sans aucun nouveau signal d'innocuité identifié avec un suivi plus long. Ainsi, cette étude a mis en évidence que l'association nivolumab + ipilimumab à faible dose peut représenter une nouvelle option de traitement en première ligne pour les patients atteints de CCRm MMRd/MSI.

Keynote-177 est un essai de phase III ([NCT02563002](#)) évaluant le pembrolizumab en première ligne dans le CCR de stade 4 MMRd/MSI. 307 patients ont été recrutés pour être répartis aléatoirement entre un traitement par pembrolizumab ou une chimiothérapie de première ligne choisie par l'instigateur. Le pembrolizumab a été associé à une survie sans progression significativement plus longue que la chimiothérapie (médiane, 16,5 contre 8,2 mois ; hazard ratio, 0,60 ; intervalle de confiance [IC] à 95%, 0,45 à 0,80 ;  $P = 0,0002$ ) lorsqu'il était administré en première ligne dans le traitement du cancer colorectal métastatique MMRd/MSI, avec moins d'effets indésirables liés au traitement ([André et al., 2020](#)). De plus, la monothérapie par pembrolizumab a entraîné des améliorations significatives de la qualité de vie comparée à la chimiothérapie chez ses patients MMRd/MSI ([Andre et al., 2021a](#)). L'analyse de la survie globale montre une amélioration non significative de celle-ci (hazard ratio, 0.74 ; IC 95% 0.53-1.03,  $P = 0.0359$ ), sachant que 60% des patients du bras " chimiothérapie " ont reçu un ICKi après progression sous chimiothérapie (56 patients dans le cadre d'un crossover protocolaire, 37 patients en dehors du protocole), amenant à des taux de survie particulièrement élevés dans le bras contrôle (50% de survivants à 3 ans, contre 61% dans le bras expérimental)([Andre et al., 2021b](#)). Ces données, ainsi que les bénéfices cliniques précédemment rapportés, permettent de considérer le pembrolizumab comme le traitement de première ligne de référence pour les patients avec un cancer colorectal métastatique MSI/dMMR naïf de traitement. Une autorisation de mise sur le marché européenne a été octroyée au pembrolizumab dans cette indication en janvier 2021.

Par ailleurs, deux autres études de phase III sur le traitement de première ligne sont en cours : l'étude COMMIT ([NCT02997228](#)) qui compare une chimiothérapie par FOLFOX (oxaliplatine, 5-fluorouracile et leucovorine) plus du bevacizumab (anticorps anti-facteur de croissance endothélial vasculaire) associé ou non à l'anticorps anti-PDL1 atézolizumab, et l'étude CHECKMATE CA209-8HW qui compare la chimiothérapie de première ligne à nivolumab seul ou associé à l'ipilimumab ([NCT04008030](#)).

### **4.3 Biomarqueurs de la réponse à l'immunothérapie chez les patients avec un cancer MSI**

Le statut MMRd/MSI dans les tumeurs colorectales, ainsi que dans d'autres tumeurs solides, est un biomarqueur clair de la réponse potentielle à l'immunothérapie, mais l'identification de biomarqueurs prédictifs plus précis et plus fiables reste un besoin

clinique non satisfait. En effet, la recherche de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de ces nouvelles immunothérapies représente l'un des défis à relever pour améliorer le traitement des patients. Des efforts intensifs ont été consacrés à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent la réponse à immunothérapie dans les cancers. Plusieurs marqueurs ont été associés à une réponse accrue au blocage des points de contrôle immunitaires, même s'il n'existe à ce jour de bio-marqueur parfaitement discriminant.

### **4.3.1 Erreurs diagnostiques**

Pour commencer, des erreurs diagnostiques du statut MSI peuvent conduire à une inclusion à tort de patient sous immunothérapie. La mise en évidence de ces erreurs diagnostiques a permis, en particulier, d'expliquer l'absence de réponse au traitement observée chez la majorité des patients d'emblée progressifs, venant donc constituer la première cause de " résistance " à l'immunothérapie dans les CCR MSI métastatiques (Cohen et al., 2019).

### **4.3.2 Pseudoprogression**

Certains patients peuvent présenter initialement une augmentation transitoire du volume tumoral, pouvant faire conclure à tort à une résistance de la maladie aux ICKi. Ce phénomène de " pseudoprogression ", bien décrit avec les ICKi, est lié à l'afflux massif de lymphocytes anti-tumoraux dans le tissu tumoral après l'initiation des ICKi. Approximativement 10% des patients avec un CCR métastatique MMRd/MSI traités par ICKi présentent une pseudoprogression, soit environ 50% des cas de progressions d'emblée sous traitement. Dans ces situations, il peut être décidé de poursuivre les ICKi au-delà de la mise en évidence de la progression radiologique, en faisant un second bilan radiologique un mois plus tard pour confirmer la pseudoprogression ou au contraire conclure définitivement à une résistance tumorale aux ICKi. La distinction en vraie résistance aux ICKi et pseudoprogression peut être difficile ; il n'existe pour le moment pas de biomarqueur permettant de différencier ces deux situations et les raisonnements cliniques s'appuient alors sur l'évolution de la symptomatologie et des marqueurs tumoraux sériques tels que l'ACE et le CA19-9 (Colle et al., 2021).

### **4.3.3 La charge mutationnelle tumorale et les néo-antigènes**

Un marqueur émergent de la réponse à l'immunothérapie dans les cancers est le nombre total de mutations présentes dans une tumeur, appelé charge mutationnelle tumorale ou Tumor mutational burden (TMB). La TMB correspond au nombre de

substitutions de bases codantes et de mutations, insertions et délétions somatiques (acquises) se produisant dans un tissu tumoral. Ainsi, la TMB équivaut, sur le plan métrique, au nombre de mutations non synonymes par mégabase. Cependant, une grande hétérogénéité est retrouvée dans les seuils retenus pour définir les différentes catégories de TMB (forte, intermédiaire et faible) et selon les régions génomiques évaluées. En effet, elle peut être évaluée sur le génome, l'exome entier ou bien sur des zones ciblées.

La mesure de la TMB en pratique et son impact sur la réponse à l'immunothérapie sont débattus. Les premières études chez les patients MMRd/MSI suggèrent que la réponse dépend d'une charge mutationnelle tumorale élevée conduisant à une production accrue de néoantigènes peptidiques (Schrock et al., 2019; Mandal et al., 2019). Dans l'étude rétrospective multicentrique de Schrock et al, la TMB, s'est avérée avoir l'association la plus forte avec la réponse objective et pourrait être un biomarqueur potentiel pour prédire la PFS dans les CCR MMRd/MSI traités avec une thérapie anti-PD-1. Le seuil de prédiction optimale pour la TMB était de 37-41 mutations/Mb (Schrock et al., 2019). Mandal et collègue suggéraient que l'augmentation de l'intensité de l'instabilité des microsatellites permet de prédire la réponse tumorale à un traitement par ICKi. Cependant, cette étude était réalisée sur un nombre assez limité (n=9) de patients MMRd/MSI (Mandal et al., 2019). Il est par ailleurs possible que certaines tumeurs aient été classées incorrectement comme MSI (Cohen et al., 2019). Rousseau et al. ont montré que la TMB n'était pas prédictive de l'efficacité des ICKi dans une cohorte de 137 patients avec un CCR métastatique. Parmi ceux-ci, 85 avaient une TMB < 10mt/Mb (dont un seul cas MSI/dMMR), et 52 avaient une TMB élevée (dont 35 MSI). En scindant la population en deux groupes MSI/dMMR ou MSS/pMMR, la TMB n'avait plus d'impact sur la survie sous ICKi (Rousseau et al., 2021)(Figure 18).

Une récente étude de Bortolomeazzi et collègue, a évalué la réponse à l'immunothérapie anti-PD1 dans les CCR (Bortolomeazzi et al., 2021). Dans cette étude, la réponse à l'immunothérapie anti-PD1 n'était pas associée à la TMB mais à plusieurs facteurs, notamment, une forte clonalité des mutations immunogènes, une expansion clonale des cellules T, une faible activation de la signalisation Wnt, ou encore une dérégulation de la voie de l'interféron gamma et à des mécanismes actifs d'échappement immunitaires (Bortolomeazzi et al., 2021).

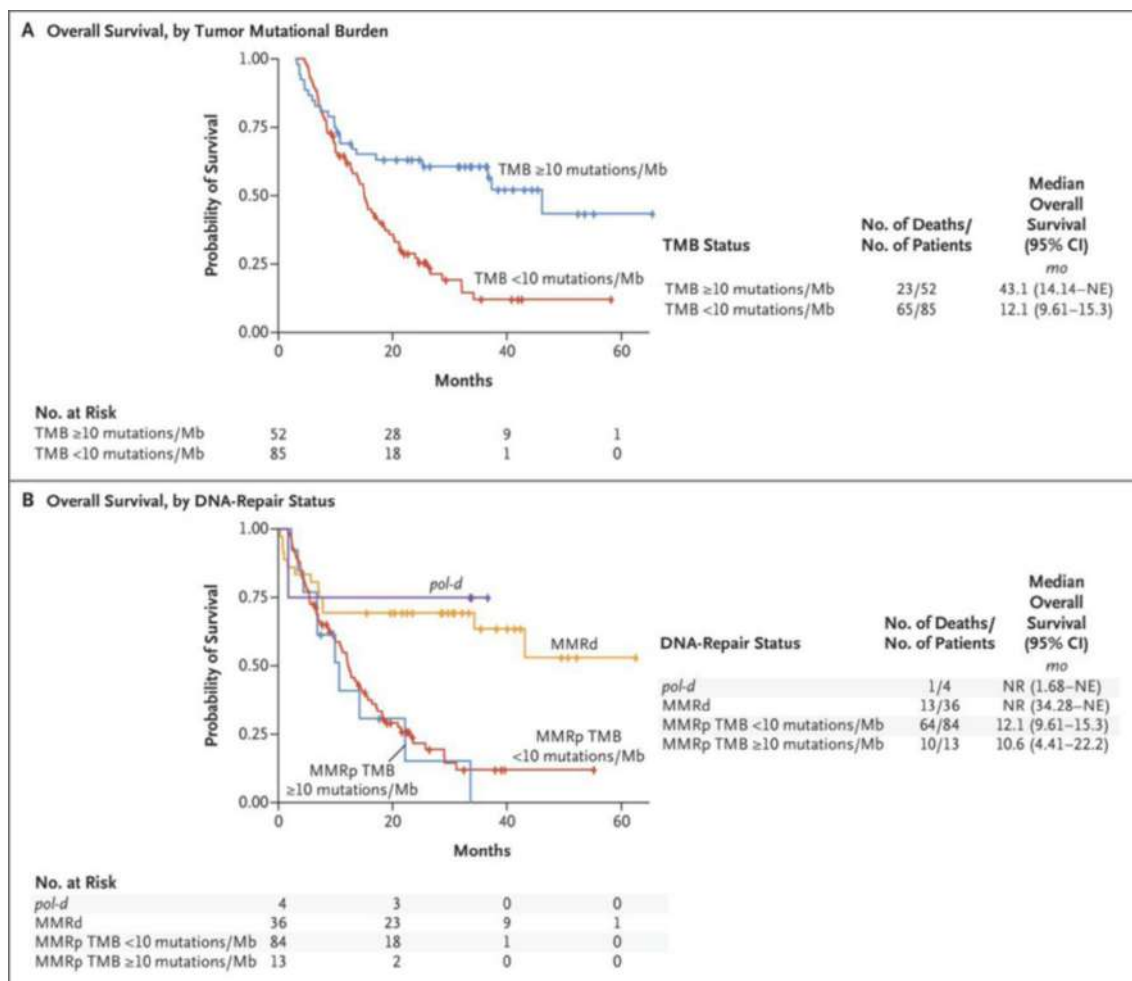


Figure 18: Effet des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire sur la survie des patients atteints de tumeurs à TMB élevée.

Les courbes de Kaplan-Meier montrent la survie globale chez 137 patients atteints d'un cancer colorectal avancé selon la charge mutationnelle tumorale (TMB ; Panel A) et la même cohorte de patients atteints d'un cancer colorectal avancé stratifiés selon la charge mutationnelle tumorale, déficience MMR (MMRd) et le statut MMRp (mismatch-repair-proficient) et le statut *pol-d* (Panel B). (Rousseau et al., 2021)

#### 4.3.4 Mutation de B2M

Le gène humain B2M code pour la  $\beta 2$ -microglobuline, un composant des molécules CMH de classe I qui est retrouvée à la surface de la plupart des cellules. En outre, B2M joue un rôle fondamental dans la présentation des antigènes, car il contribue au repliement et au transport des peptides à la surface de la cellule. Sans une présentation appropriée des peptides sur le CMH, les cellules T CD8+ cytotoxiques ne peuvent pas reconnaître ces néo épitopes pour s'activer (Figure 5). Les mutations et la perte de la protéine B2M ont été proposées comme causes de la résistance aux ICKi, notamment dans le mélanome (Sade-Feldman et al., 2017). Des mutations microsatellites codantes inactivant B2M se produisent dans 20 à 40% des cancers colorectaux MSI, potentiellement en conséquence d'une pression immunosélective,

qui résulte d'une forte densité de cellules T spécifiques de l'antigène tumoral dans l'environnement local de la tumeur primitive. Généralement ces mutations sont associées à une perte d'expression de B2M (dans 93% des cas). De manière intéressante, la plupart des patients présentant un CCR MSI mutant B2M avec perte d'expression de la protéine semble obtenir un bénéfice clinique des ICK ([Middha et al., 2019](#)).

### 4.3.5 Expression de PD-1/PD-L1

L'expression du ligand de PD-1, PD-L1, est un biomarqueur utile de la réponse au traitement anti-PD-1 dans certains types de tumeurs comme les cancers pulmonaires ou le mélanome ([Garon et al., 2015](#)). Cet intérêt prédictif est discuté car nuancé par le manque de standardisation de la méthode utilisant différents anticorps et seuils de positivité, par l'expression probablement hétérogène et dynamique de ce récepteur au cours du temps et au sein même des lésions tumorales. L'expression de PD-L1 est généralement faible dans les CCR MMRd/MSI et n'est pas prédictive de la réponse aux ICKi ([Le et al., 2015](#); [Lee and Chu, 2018](#); [Overman et al., 2017](#)). Si l'expression de PD-L1 peut être corrélée à la réponse aux anti-PD1, l'existence de patients répondeurs chez les patients n'exprimant pas PD-L1 (valeur prédictive négative insuffisante) limite à ce jour l'impact de ce marqueur dans la décision thérapeutique.

### 4.3.6 Le taux de lymphocytes et leucocytes

La présence d'infiltrats lymphocytaires péri-tumoraux avant traitement (TILS = Tumor Infiltrated Lymphocytes) est liée à une augmentation de la réponse aux anti-PD1 ([Teng et al., 2015](#); [Tumeh et al., 2014](#)). Et plusieurs études ([Dronca et al.; Ngiow et al., 2015](#)) ont montré que des taux élevés de certains types de lymphocytes étaient associés à une meilleure réponse.

Chez les patients MMRd/MSI, une série de cas récents a été examinée pour l'association des densités intratumorales de lymphocytes T CD3+ et CD8+ avec le taux de réponse objective et la durée de réponse chez des patients atteints de CCR métastatiques qui ont reçu du pembrolizumab en monothérapie après avoir progressé sous chimiothérapie ([Chakrabarti et al., 2019](#)). Des densités plus élevées de lymphocyte T CD3+ et CD8+ étaient associées à un taux de survie plus élevé et à une durée de contrôle de la maladie plus longue. Cela suggère donc que la mesure de ces marqueurs immunitaires pourrait aider à prédire la réponse au traitement anti-PD-1 dans les CCR MMRd. Inversement, une faible densité de cellules T peut prédire un manque de réponse aux ICKi ([Chakrabarti et al., 2019](#)).

### 4.3.7 Microenvironnement stromal et fibroblastes associés aux tumeurs

L'analyse complète des signatures d'expression génique a permis de classer les CCR en 4 sous-types moléculaires consensus (CMS) (Guinney et al., 2015). Les tumeurs MSI sont principalement regroupées dans le CMS1, dit " immune ", tandis qu'une plus faible proportion est classée dans le CMS4, est dont les caractéristiques évoquent une immunorésistance. En effet cette classe est enrichie en protéines du microenvironnement (collagène, fibronectine) et est caractérisée par la présence de nombreuses altérations somatiques, une activation fréquente du TGF $\beta$  et de l'angiogenèse . Le rôle du TGF $\beta$  dans la carcinogenèse colorectale est complexe car il peut activer de multiples voies de transduction et a un double rôle, anti et pro-tumoral du stade précoce au stade avancé du cancer (Jung et al., 2017; Cohen et al., 2020).

Récemment, Endo et collègue ont développé une signature de gènes stromaux régulés par le TGF $\beta$  et prédictif de la résistance au ICKi. Ainsi, ils ont identifié, parmi les patients atteints de cancers colorectaux MMRd/MSI, un sous-groupe unique de mauvais pronostic (Endo et al., 2020). Parallèlement, ce sous-groupe stromal MMRd/MSI n'était enrichi ni en cellules T CD8+ ni en altérations génomiques courantes, par rapport aux tumeurs MMRd/MSI sans activité stromale (Endo et al., 2020). Comme attendu, la signature TGF $\beta$  stromale était significativement plus élevée dans les tumeurs CMS4 que dans celles de CMS1-3, puisque le sous-type CMS4/mésenchymateux est caractérisé par une infiltration stromale et une activation du TGF $\beta$  (Guinney et al., 2015). Comme implication, la double inhibition des points de contrôle immunitaires et de la signalisation TGF $\beta$  pourrait constituer une stratégie prometteuse pour les patients. De plus, des études précliniques récentes suggèrent que le ciblage de la voie TGF $\beta$  dans le CCR favorise le recrutement des cellules T et améliore la réponse Th1, ce qui conduit à une sensibilité accrue aux ICKi (Tauriello et al., 2018).

Ces résultats appuient l'idée que, bien que les tumeurs MSI soient caractérisées par une signalisation immunitaire accrue, l'hétérogénéité de la maladie est importante sur ce plan et l'expression d'autres marqueurs doit être prise en compte pour mieux guider la thérapeutique (Kloor and von Knebel Doeberitz, 2016).

### 4.3.8 Autres bio marqueurs de la réponse au ICKi

#### Structure lymphoïde tertiaires

Des structures similaires aux follicules des ganglions lymphatiques ont été décrites à côté de la tumeur et appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) (Dieu-Nosjean et al., 2008). Il s'agit d'un agrégat cellulaire riche en lymphocytes B. Des études récentes sur la formation des TLS suggèrent qu'elles commencent par une seule zone de cellules T contenant des cellules dendritiques, et qu'elles se transforment en TLS pleinement fonctionnelles avec le recrutement dépendant de CXCL13 du centre germinal (Posch et al., 2018; Silia et al., 2018). Plusieurs études révèlent le rôle essentiel de CXCL13, exprimé par les cellules T auxiliaires folliculaires (Gu-Trantien et al., 2017), pour la formation des TLS (Henry and Kendall, 2010). Ils favorisent les cellules T CD8+ cytotoxiques et les réponses Th1 dans la tumeur et permettent l'initiation, la maturation et le maintien de la réponse immunitaire adaptative (Goc et al., 2014). La présence de ces structures semble être associée à une meilleure réponse à l'immunothérapie dans différents cancers (Cabrita et al., 2020; Petitprez et al., 2020). Cependant, aucune étude n'a encore évalué ces derniers dans les tumeurs MMRd/MSI.

#### Microbiote

Il a été démontré que le microbiote intestinal affecte le résultat du traitement contre le cancer en modulant la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, certains microbes spécifiques faciliteraient l'immunité anti-tumorale et augmenteraient la réponse au blocage de PD-L1 chez les patients atteints de mélanome (Sivan et al., 2015; Matson et al., 2018) et influenceraient la réponse au blocage de CTLA-4 (Vétizou et al., 2015). L'utilisation d'antibiotiques est associée à une moins bonne survie sous ICKi (Derosa et al., 2018; Pinato et al., 2019), apportant des arguments supplémentaires pour l'impact de la composition du microbiote sur l'efficacité des ICKi. Par ailleurs, il a été démontré que transplantation fécale à partir de donneurs sensibles à l'immunothérapie induisaient une réponse aux ICKi chez des patients dont la tumeur était initialement résistante à ces traitements (Davar et al., 2021; Baruch et al., 2021). Ces découvertes ont été principalement faites chez des patients atteints de mélanome, et le rôle du microbiote intestinal dans le CCR MMRd/MSI reste à déterminer.

### 4.3.9 Bilan et défis

La prédiction de la réponse à l'immunothérapie ne repose pas sur des biomarqueurs aussi solides que les addictions oncogéniques pour la réponse aux thérapies



ciblées. Que l'on s'intéresse à l'expression de PD-L1, à la TMB ou à des signatures géniques ou du microenvironnement, ces biomarqueurs sont continus, évoluent dans le temps et dans l'espace, sans cut-off, permettant de distinguer répondeurs et non-répondeurs. L'association de biomarqueurs intervenant à différents niveaux de la cascade immunitaire permettrait d'améliorer la sélection des patients. Des biomarqueurs d'exclusion, prédicteurs de l'absence de réponse pourraient également être pris en compte dans la stratégie décisionnelle. Parmi les 35% de résistants primaires aux anti-PD1 monothérapie, il est important de comprendre qu'on a environ 5% d'erreurs diagnostiques, 10-15% de pseudo progressions et 10-20% de vrais résistants, dont la moitié pourrait être contrôlée par anti-PD1+anti-CTLA4.

Ainsi, aujourd'hui, les défis sont donc de réaliser en premier lieu le bon diagnostic des cancers MMRd/MSI, puis de trouver un facteur biologique ou clinique permettant de distinguer les pseudo progression des vraies progressions lorsqu'on est face à un patient dont le scanner montre une progression d'emblée. Mais aussi, de trouver un bio marqueur permettant de dire quels sont les patients qui auraient besoin d'une combinaison anti-PD1+ anti-CTLA4 plutôt que l'anti-PD1 seul. Et enfin de trouver des biomarqueurs de résistance aux anti-PD1+antiCTLA4 pour leur trouver une autre thérapeutique, par exemple le ciblage d'autre ICK, ou au contraire de la chimiothérapie si malgré le phénotype MSI, ces tumeurs contiennent peu ou pas de cellules T infiltrantes.

## 4.4 Immunothérapie : Futures directions

### 4.4.1 Cibler des points de contrôle immunitaires alternatifs

De nombreux essais cliniques en cours testent si les combinaisons d'immunothérapies (inhibition de plusieurs ICK, ou combinaison d'ICKi et d'autres immunothérapies antitumorales) pourraient améliorer la prise en charge des patients ([Swart et al., 2016](#)).

Tout d'abord, il est important de rappeler que les données non comparatives de l'étude Checkmate-142 suggèrent un plus faible taux de résistance primaire des CCR MMRd/MSI sous double blocage anti-PD1/CTLA4 que sous anti-PD1 monothérapie ([Overman et al., 2017](#)), résultats qui sera confirmé ou non par l'étude Checkmate CA209-8HW (2025).

Le ciblage d'autres ICK pourrait également augmenter l'efficacité des traitements. Le blocage de LAG-3, qui inhibe la fonction des cellules T lorsqu'il est lié

au CMH de classe II et est fortement exprimé sur les cellules Treg, a des effets synergiques avec le blocage de PD-1 pour induire une régression tumorale dans le cancer colorectal métastatique (Zhou et al., 2018).

TIM-3, un ligand de la galectine 9, une molécule couramment régulée à la hausse dans les cancers (Pardoll, 2012), inhibe les réponses Th1. Il a été démontré que son blocage induit une régression tumorale dans des modèles murins (Sakuishi et al., 2010; Ngiew et al., 2011).

D'autres cibles potentielles sont également envisagées pour prévenir l'épuisement des cellules NK infiltrant la tumeur. C'est le cas de NKG2A, un récepteur inhibiteur des cellules NK pour un sous-ensemble de molécules du CMH de classe I. Le Monalizumab est un inhibiteur des points de contrôle immunitaires ciblant le récepteur NKG2A exprimé sur les lymphocytes cytotoxiques NK et T CD8 infiltrés dans la tumeur. Il a une utilité clinique potentielle dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (McWilliams et al., 2016) et montre une activité prometteuse dans les tumeurs solides (Fayette et al., 2020). De même, les récepteurs KIR des cellules NK pour d'autres sous-ensembles de molécules du CMH de classe I attirent l'attention (Chiossone et al., 2017).

Néanmoins, il semble essentiel de mener ces recherches cliniques à partir de données pré-cliniques robustes afin d'optimiser les chances de succès. La combinaison d'un anti-PDL1 associé à un anticorps anti-TIM3 n'a ainsi pas montré d'efficacité chez des patients avec des tumeurs MMRd/MSI résistantes aux anti-PD(L)1 (1 réponse objective parmi 22 patients traités) (Hollebecque et al., 2021).

#### 4.4.2 Développement de l'immunothérapie dans les stades précoces

Le statut MMRd/MSI est retrouvé dans approximativement 20% des cancers du côlon localisés de stade II (tumeur avec atteinte au minimum de la couche musculuse de la paroi colique mais sans atteinte ganglionnaire de voisinage) et 12% des cancers du côlon de stade III (tumeur localisée avec atteinte ganglionnaire de voisinage), contre seulement 3-5% en situation métastatique. Les patients avec un cancer colique de stade III ont un risque de récurrence de 10 à 35% après chirurgie et chimiothérapie adjuvante par FOLFOX pendant 6 mois (Cohen et al., 2021). Dans le but de déterminer l'efficacité potentielle de l'immunothérapie dans cette situation, un essai randomisé de phase III évalue l'association de la chimiothérapie et de l'atezolizumab par rapport à la chimiothérapie seule chez 700 patients atteints d'un

cancer colorectal de stade III MMRd/MSI (étude ATOMIC, [NCT02912559](#)). Dans le bras expérimental, les patients reçoivent FOLFOX plus atezolizumab pendant 6 mois, puis l'atezolizumab en monothérapie pendant 6 mois. Le critère d'évaluation principal de l'essai est la survie sans maladie, la survie globale et l'incidence des événements indésirables sont les critères d'évaluation secondaires. L'administration d'une chimiothérapie combinée à l'atezolizumab pourrait être plus efficace que la chimiothérapie seule pour augmenter les chances de guérison des patients atteints d'un cancer du côlon MMRd/MSI localisés de stade III.

Par ailleurs, l'étude NICHE sur l'association néoadjuvante du nivolumab et de l'ipilimumab chez des patients atteints d'un CCR localisé résécable a attiré l'attention sur l'utilisation des ICKi dans cette situation. Parmi 21 patients avec une tumeur MMRd/MSI, une réponse pathologique majeure (<5% de cellules tumorales viables) a été observée dans 95% des cas, dont 12 (60%) de réponses complètes pathologiques. Il est à noter que 15 patients avec une tumeur MMRp/MSS ont été traités dans cette étude par nivolumab et ipilimumab néoadjuvant (associé ou non à du celecoxib) et que 3 réponses pathologiques majeures ont été observées. Ses augmentations significatives de l'infiltration tumorale en lymphocytes T, particulièrement les lymphocytes T CD8+, ont été observées chez les tumeurs MMRp et MMRd, avec un fold-change médian de 2,4 (p=0,018) et 4,8 (p=0,0009) respectivement. Si ces données sont confirmées dans de plus grandes cohortes avec un suivi à long-terme, ils soulèveraient la question de savoir si la résection chirurgicale, qui est le traitement à visée curative de référence pour le CCR à un stade précoce, pourrait être évitée en toute sécurité dans un sous-groupe sélectionné de patients atteints de CCR MMRd/MSI.

#### 4.4.3 Développements en situation prophylactique

Outre les possibilités de traitement des tumeurs existantes, l'avènement de l'immunothérapie offre également la possibilité d'un traitement de précision préventive pour les personnes présentant des mutations germinales dans les gènes MMR, notamment diagnostiqué du syndrome de Lynch. Le dépistage du cancer ou les interventions chirurgicales visant à réduire le risque, telles que la coloscopie ou l'hystérectomie et l'ovariectomie prophylactiques, font partie des considérations de gestion pour ces personnes ([Syngal et al., 2015](#)), mais la prévention basée sur la réponse immunitaire est également explorée pour réduire le risque. Une étude en cours ([NCT04711434](#)) vise à explorer le rôle de l'anticorps PD-1 pour la prévention des polypes adénomateux et des deuxième tumeurs primaires chez les patients atteints du syndrome de Lynch.

L'applicabilité des ICKi, y compris les agents anti-PD1 ou anti-PDL1, pour la prévention du cancer est actuellement limitée par la toxicité des médicaments ; toutefois, d'autres stratégies d'intervention immunologique, y compris les vaccins, sont à l'étude ([Doeberitz et al., 2016](#)).

# **TRAVAUX DE RECHERCHE**

# Chapitre 5

## Résultats

### 5.1 Article 1: Diagnostic de l'instabilité des microsatellites par NGS

#### Résumé de l'article n°1:

Dans ce travail publié dans la revue *Gastroenterology*, nous avons tout d'abord examiné les performances du séquençage à haut débit de l'ADN (NGS) pour identifier le phénotype tumoral MSI. Nous avons focalisé notre analyse à l'étude des performances de l'outil MSISensor, celle-ci ayant été approuvée par la FDA pour l'identification de l'instabilité des microsatellites en pan-cancer outre-atlantique, et en particulier dans le cancer colorectal (CCR) (méthode retenue soit à partir d'une analyse de l'Exome tumoral, soit à partir de l'analyse de panels commerciaux plus restreints comme le panel MSK-IMPACT ou d'autres). Nous avons évalué les performances diagnostiques de cet outil MSISensor (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative) au sein de cohortes de patients avec un CCR dont le statut MMRd/MSI avait été établi au préalable par les méthodes de référence, à savoir l'immunohistochimie et la PCR MSI (gold standards). Les cohortes de patients analysées incluaient aussi bien des patients avec un CCR métastatique (CCRm) ou non métastatique (CCRnm). Une proportion importante des patients avec un CCRm provenaient d'essais cliniques dans le cadre desquels ils avaient bénéficié d'une thérapie à l'aide d'un inhibiteur de points de contrôle immunitaire (ICKi). Brièvement, les résultats relatifs à cette première partie de l'étude démontrent que le test MSISensor manque de sensibilité pour la détection du phénotype MSI dans le CCR, à la fois dans les CCRm et CCRnm, avec une récurrence de cas faux négatifs dans toutes les cohortes analysées, en particulier chez les patients avec une tumeur MSH6 déficiente, de manière attendue.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons pu identifier les raisons les plus probables concourants au manque de sensibilité de l'outil MSISensor. Un nouvel outil bioinformatique a ainsi pu être généré, nommé MSICare. Les résultats de l'analyse comparative des performances de ces deux algorithmes diagnostiques sur les mêmes cohortes de malades et d'autres supplémentaires que nous avons analysées à la suite, démontrent clairement la supériorité du nouvel outil MSICare par rapport à MSISensor pour identifier le phénotype MSI d'un CCR. De manière remarquable, l'outil MSICare est adaptable et permet des performances optimales (pas de faux négatifs en particulier par rapport aux méthodes de référence), à la fois à partir d'une analyse de l'exome tumoral complet qu'en partant de l'examen de panels plus restreints de gènes (panel MSK-IMPACT testé en exemple de panel déjà utilisé par la communauté oncologique, approuvé FDA ; panel MSI-DIAG proposé à façon). Toutes les analyses proposées dans ce manuscrit se sont basées sur un examen concomitant de l'ADN tumoral et de l'ADN normal.

De manière intéressante, nos résultats suggèrent également une très haute performance de MSICare pour détecter l'instabilité des microsatellites en dehors du CCR, dans une série publique de cancer de l'estomac et de l'endomètre que nous avons pu examiner. Ces derniers résultats demandent à être confirmés néanmoins sur de plus large séries de patients.

Ces résultats arrivent à un moment critique, où le phénotype MSI devient de plus en plus un marqueur théranostique pour guider la thérapie des patients avec un cancer métastatique, et même de plus en plus en situation non métastatique, dans les CCR et pour un nombre croissant de tumeurs primaires. Le biomarqueur MSI reste en outre un marqueur d'orientation vers le syndrome de Lynch. L'utilisation du NGS pour identifier le phénotype MSI dans les cancers est très rapidement progressive et elle va très probablement devenir dans les années à venir la méthode de choix pour l'analyse du génome tumoral par rapport à de nombreux biomarqueurs incluant MSI, avec des coûts de plus en plus bas et attractifs. MSICare pourrait devenir dans ce contexte une méthode très utile pour l'identification du phénotype MSI dans le CCR et, en fonction de résultats qu'il faudra confirmer pour les tumeurs non-colorectales, de manière plus générale en oncogénétique pour guider la médecine de précision des tumeurs.

# CLINICAL—ALIMENTARY TRACT

## Performance of Next-Generation Sequencing for the Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer With Deficient DNA Mismatch Repair



Toky Ratovomanana,<sup>1</sup> Romain Cohen,<sup>1,2</sup> Magali Svrcek,<sup>1,3</sup> Florence Renaud,<sup>1,4</sup> Pascale Cervera,<sup>1,5</sup> Aurélie Siret,<sup>1</sup> Quentin Letourneur,<sup>1</sup> Olivier Buhard,<sup>1</sup> Pierre Bourgoin,<sup>1</sup> Erell Guillerm,<sup>1,5</sup> Coralie Dorard,<sup>1</sup> Remy Nicolle,<sup>6</sup> Mira Ayadi,<sup>6</sup> Mehdi Touat,<sup>1,7</sup> Franck Bielle,<sup>7,8</sup> Marc Sanson,<sup>7,8</sup> Philippe Le Rouzic,<sup>1,5</sup> Marie-Pierre Buisine,<sup>4,9</sup> Guillaume Piessen,<sup>4,10</sup> Ada Collura,<sup>1</sup> Jean-François Fléjou,<sup>1,3</sup> Aurélien de Reyniès,<sup>6</sup> Florence Coulet,<sup>1,5,§</sup> François Ghiringhelli,<sup>11,12,§</sup> Thierry André,<sup>1,2,§</sup> Vincent Jonchère,<sup>1,5,§</sup> and Alex Duval<sup>1,5,§</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938 and Site de Recherche Intégrée sur le Cancer (SIRIC) Cancer United Research Associating Medicine, University & Society (CURAMUS), Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France; <sup>2</sup>Sorbonne Université, Department of Medical Oncology, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>3</sup>Sorbonne Université, Department of Pathology, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>4</sup>Université de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, UMR9020-U1277 CANTHER-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France; <sup>5</sup>Sorbonne Université, Genetics Department, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>6</sup>Programme “Cartes d’Identité des Tumeurs,” Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France; <sup>7</sup>Service de Neurologie 2-Mazarin, Sorbonne Université, Inserm, CNRS, UMR S 1127, Institut du Cerveau, ICM, AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Paris, France; <sup>8</sup>AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Département de Neuropathologie, Paris, France; <sup>9</sup>Molecular Oncogenetics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lille University Hospital, Lille, France; <sup>10</sup>Department of Digestive and Oncological Surgery, Claude Huriez University Hospital, University Lille, Lille, France; <sup>11</sup>Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; and <sup>12</sup>INSERM, UMR866, Burgundy University, Dijon, France

**BACKGROUND & AIMS:** Next-generation sequencing (NGS) was recently approved by the United States Food and Drug Administration to detect microsatellite instability (MSI) arising from defective mismatch repair (dMMR) in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) before treatment with immune checkpoint inhibitors (ICI). In this study, we aimed to evaluate and improve the performance of NGS to identify MSI in CRC, especially dMMR mCRC treated with ICI. **METHODS:** CRC samples used in this post hoc study were reassessed centrally for MSI and dMMR status using the reference methods of pentaplex polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Whole-exome sequencing (WES) was used to evaluate MSISensor, the Food and Drug Administration-approved and NGS-based method for assessment of MSI. This was performed in (1) a prospective, multicenter cohort of 102 patients with mCRC (C1; 25 dMMR/MSI, 24 treated with ICI) from clinical trials NCT02840604 and NCT033501260, (2) an independent retrospective, multicenter cohort of 113 patients (C2; 25 mCRC, 88 non-mCRC, all dMMR/MSI untreated with ICI), and (3) a publicly available series of 118 patients with CRC from The Cancer Genome Atlas (C3; 51 dMMR/MSI). A new NGS-based algorithm, namely MSICare, was developed. Its performance for assessment of MSI was compared with MSISensor in C1, C2, and C3 at the exome level or after downsampling sequencing data to the MSK-IMPACT gene panel. MSICare was validated in an additional retrospective, multicenter cohort (C4) of 152 patients with new CRC (137 dMMR/MSI) enriched in tumors deficient in MSH6 (n = 35) and PMS2 (n = 9) after targeted sequencing of samples with an optimized set of microsatellite

markers (MSIDIAG). **RESULTS:** At the exome level, MSISensor was highly specific but failed to diagnose MSI in 16% of MSI/dMMR mCRC from C1 (4 of 25; sensitivity, 84%; 95% confidence interval [CI], 63.9%–95.5%), 32% of mCRC (8 of 25; sensitivity, 68%; 95% CI, 46.5%–85.1%), and 9.1% of non-mCRC from C2 (8 of 88; sensitivity, 90.9%; 95% CI, 82.9%–96%), and 9.8% of CRC from C3 (5 of 51; sensitivity, 90.2%; 95% CI, 78.6%–96.7%). Misdiagnosis included 4 mCRCs treated with ICI, of which 3 showed an overall response rate without progression at this date. At the exome level, reevaluation of the MSI genomic signal using MSICare detected 100% of cases with true MSI status among C1 and C2. Further validation of MSICare was obtained in CRC tumors from C3, with 96.1% concordance for MSI status. Whereas misdiagnosis with MSISensor even increased when analyzing downsampled WES data from C1 and C2 with microsatellite markers restricted to the MSK-IMPACT gene panel (sensitivity, 72.5%; 95% CI, 64.2%–79.7%), particularly in the MSH6-deficient setting, MSICare sensitivity and specificity remained optimal (100%). Similar results were obtained with MSICare after targeted NGS of tumors from C4 with the optimized microsatellite panel MSIDIAG (sensitivity, 99.3%; 95% CI, 96%–100%; specificity, 100%). **CONCLUSIONS:** In contrast to MSISensor, the new MSICare test we propose performs at least as efficiently as the reference method, MSI polymerase chain reaction, to detect MSI in CRC regardless of the defective MMR protein under both WES and targeted NGS conditions. We suggest MSICare may rapidly become a reference method for NGS-based testing of MSI in CRC, especially in mCRC, where accurate MSI status is required before the prescription of ICI.



**Keywords:** Microsatellite Instability (MSI); Defective Mismatch Repair (dMMR); Next-Generation Sequencing; Diagnostic Test; Reference Methods; Immunotherapy.

The human tumor phenotype referred to as microsatellite instability (MSI) is associated with inactivating alterations in mismatch repair (MMR) genes. MSI was first reported in inherited tumors associated with Lynch's syndrome. This is one of the most frequent cancer predisposition syndromes in humans and requires specific care and genetic counseling. MSI was later observed in sporadic colorectal cancer (CRC) and more rarely in other primary tumors.<sup>1-4</sup> Tumors with MSI generally show a dense infiltration with cytotoxic T-cell lymphocytes.<sup>5</sup> Recently, it was reported that MSI tumors and, notably, MSI CRC resist this hostile immune microenvironment by overexpressing immune checkpoint-related proteins to allow immune escape.<sup>6,7</sup> Furthermore, MSI status was shown by our team and others to predict clinical benefit from immune checkpoint inhibitors (ICI) in patients with metastatic CRC (mCRC).<sup>8-12</sup> These observations have led to international guidelines recommending universal MSI/defective MMR (dMMR) screening of all newly diagnosed CRC.<sup>13</sup> There is also increasing evidence to support the evaluation of MSI status in all human tumors, regardless of the primary tissue of origin.

Several specialized cancer centers, including ours, have aimed to standardize and validate the accepted reference methods for testing MSI and dMMR in CRC such as polymerase chain reaction (PCR)-based methods for MSI<sup>14-16</sup> and immunohistochemistry (IHC) for dMMR (see also Svrcek et al<sup>17</sup> for review). In mCRC, we recently highlighted that misinterpretation of the results for MSI and/or MMR testing using these gold standard methods could account for most cases showing primary resistance to ICI.<sup>18</sup>

In the meantime, an alternative United States Food and Drug Administration (FDA)-approved method based on next-generation sequencing (NGS) technology was reported for MSI screening in pan-cancer, including CRC.<sup>19</sup> This was based on the use of an algorithm, namely MSISensor, that analyzes sequence reads at designated microsatellite regions in tumor and paired normal samples and reports the percentage of unstable loci as a cumulative score in the tumor.<sup>20</sup> However, the diagnostic performance of MSISensor has yet to be evaluated in patient cohorts where the MSI/dMMR status has already been established using the reference IHC and MSI-PCR methods, notably in the prospective setting of mCRC patients treated with ICI.

The aim of the present study was therefore to evaluate the performance of MSISensor for the detection of MSI in dMMR/MSI CRC, especially dMMR mCRC treated with ICI. The CRC samples used in this post hoc analysis were centrally reassessed for MSI and dMMR status using the reference methods of pentaplex PCR and IHC. We analyzed samples from multicenter, prospective series of patients with CRC involved in clinical trials with ICI (NCT02840604 and NCT033501260) and 2 large retrospective, multicenter

## WHAT YOU NEED TO KNOW

### BACKGROUND AND CONTEXT

A United States Food and Drug Administration-approved method based on next-generation sequencing technology, namely MSISensor, was reported for microsatellite instability screening in pan-cancer, including colorectal cancer. However, the diagnostic performance of MSISensor has yet to be evaluated in patient cohorts where the microsatellite instability/defective mismatch repair status has already been established using the reference immunohistochemistry and microsatellite instability-polymerase chain reaction methods, notably in the prospective setting of patients with metastatic colorectal cancer treated with immune checkpoint inhibitors.

### NEW FINDINGS

An analysis of samples from a large multicenter independent series of colorectal cancer, including patients with metastatic colorectal cancer involved in clinical trials with immune checkpoint inhibitors, demonstrated that the MSISensor test lacks sensitivity for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer. A new bioinformatic tool has been developed for the detection of microsatellite instability, namely MSICare, which shows much better performance compared with MSISensor and has 100% sensitivity and specificity compared with microsatellite instability-polymerase chain reaction in the colorectal cancer cohorts.

### LIMITATIONS

Although the results also suggest the high performance of MSICare to detect microsatellite instability in a public series of gastric and endometrial cancers, further evaluation in non-colorectal cancer types is required.

### IMPACT

These findings come at a critical time when microsatellite instability is increasingly becoming a theranostic marker to guide the therapy of patients at all stages of cancer and for a growing number of tumor types. MSICare may rapidly become a reference method for next-generation sequencing-based testing of microsatellite instability in colorectal cancer and hopefully in noncolorectal tumors.

independent series of mCRC and nonmetastatic CRC (nmCRC), as well as a publicly available series of CRC from The Cancer Genome Atlas (TCGA). Importantly, cohorts

§ Authors share co-senior authorship.

**Abbreviations used in this paper:** bp, base pair; C1, cohort 1; C2, cohort 2; C3, cohort 3; C4, cohort 4; CI, confidence interval; CRC, colorectal cancer; dMMR, defective mismatch repair; FDA, Food and Drug Administration; FFPE, formalin fixed and paraffin embedded; ICI, immune checkpoint inhibitors; IHC, immunohistochemistry; mCRC, metastatic colorectal cancer; MMR, mismatch repair; MNR, mononucleotide repeats; MSI, microsatellite instability; MSI-H, microsatellite instability-high; MSI-L, microsatellite instability-low; NGS, next-generation sequencing; nmCRC, nonmetastatic colorectal cancer; pMMR, proficient mismatch repair; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TP, tumor purity; WES, whole-exome sequencing.

 Most current article

© 2021 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.05.007>

were enriched in MSH6-deficient tumors in which MSI is known to be more difficult to detect<sup>21</sup> and in PMS2-deficient tumors for which limited data are available.

Overall, our results demonstrate that the FDA-approved NGS-based diagnostic test for identifying MSI in mCRC and nmCRC gave inaccurate results compared with the gold standard reference methods. This misdiagnosis included patients that showed a positive response to ICI but would not have been treated if MSISensor alone had been used for MSI screening without reference to the IHC and MSI PCR methods.

Next, full or partial WES data restricted to the MSK-IMPACT gene panel were exploited to improve detection of the MSI genomic signal in CRC. This enabled us to design and validate a newly optimized algorithm, namely MSICare. The high accuracy of MSICare for the detection of MSI in CRC was validated under analysis of full or partial WES data or after targeted NGS of tumors with an optimized panel of microsatellite markers. These results should allow MSICare to become a future reference test for assessing MSI in colorectal tumors and putatively in noncolorectal dMMR tumors, especially for dMMR metastatic patients before therapeutic decision.

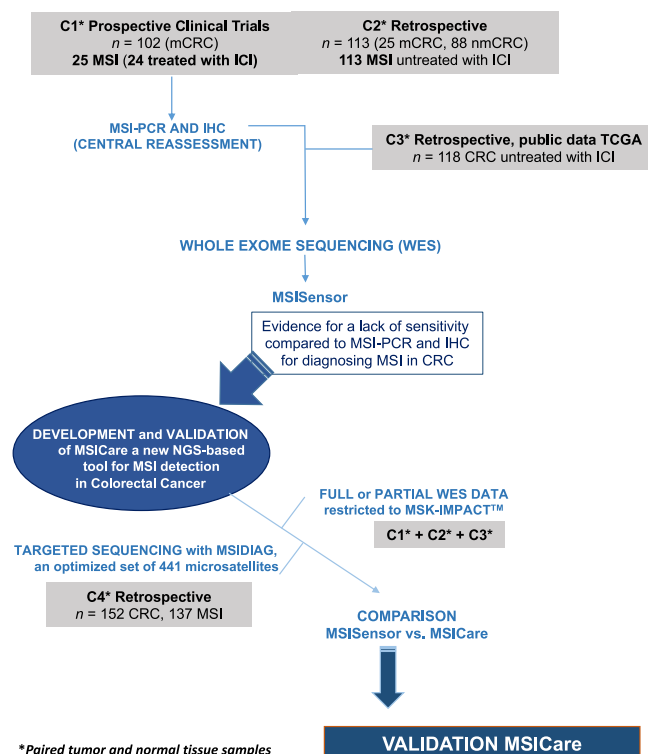
## Materials And Methods

### Study Populations

The clinical rationale and design of this study are presented in [Figure 1](#). The origin of patients enrolled in the study is provided in [Supplementary Table 1](#). The study comprised 102 patients with mCRC (cohort 1 [C1]; [Figure 1](#)), who originated from 2 multicenter French clinical trials (NCT02840604 and NCT033501260) that accrued patients between May 2015 and November 2019. NCT02840604 aimed to show that exome analysis is feasible in the routine care of patients, thereby improving access to targeted therapies and improving the detection of genetic cancer predisposition. Genomic sequencing (WES) was performed at the Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Genomic and Immunotherapy Medical Institute, Dijon, France. Patients were eligible if they presented with a locally advanced, nonoperable, or metastatic cancer that had progressed during at least one line of systemic therapy. The NIPICOL (Interest of iRECIST Evaluation for DCR for Evaluation of Patients With Deficient MMR and /or MSI Metastatic Colorectal Cancer Treated With Nivolumab and Ipilimumab) trial (NCT033501260) involves treatment of patients with MSI/dMMR mCRC with nivolumab (anti-PD-1) and ipilimumab (anti-CTLA-4). mCRC response to ICI was determined according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST).<sup>22</sup> ICI was used to treat 26 patients from the NCT033501260 cohort. Of these, 23 were confirmed to be MSI/dMMR, and 3 were identified later as MSS/proficient MMR (pMMR) after reassessment of their MSI and MMR status centrally. WES was performed by IntegraGen SA.

All patients provided signed informed consent for the trials and genomic analysis. After giving consent, patients underwent consultation with a geneticist to explain the consequences of constitutional genetic testing. After this consultation, the patient could accept or refuse to provide a blood sample for constitutional exome analysis. This trial protocol was approved

## STUDY DESIGN



**Figure 1.** Background and study design. \*Paired tumor and normal tissue samples

by an Institutional Review Committee and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

A historical retrospective cohort (cohort 2 [C2]) was also analyzed by WES in the same conditions ([Figure 1](#)). This comprised 25 patients with mCRC who were diagnosed between 1998 and 2016 in 6 French hospitals as MSI or dMMR<sup>18</sup> as well as 88 patients from the Saint-Antoine Hospital, Paris, who were diagnosed between 1998 and 2007 as having MSI/dMMR nmCRC.<sup>23</sup>

We further evaluated and compared the performance of MSICare and MSISensor using WES data in a third independent tumor cohort (cohort 3 [C3]). This included 118 patients with CRC whose MSI status was previously assessed by PCR using the Bethesda microsatellite panel and whose WES data were publicly available from TCGA. All patients with CRC with MSI-high (MSI-H; N = 51) or MSI-low (MSI-L; N = 14) and a similar proportion of patients with MSS (N = 53) were included.<sup>24</sup> C3 also included 382 extracolonic tumors from TCGA with a relatively high incidence of MSI, including gastric (53 MSI-H, 9 MSI-L, 42 MSS) and endometrial (159 MSI-H, 17 MSI-L, 102 MSS) cancers.

Finally, a last retrospective cohort was examined (cohort 4 [C4]; [Figure 1](#)) using targeted NGS because WES is not routinely used in clinical care (see below for details). C4 was retrospective, nonconsecutive, assembling 152 new patients from the Saint-Antoine Hospital, Paris, and the Lille University Hospital, who were previously diagnosed as having MSI/dMMR or MSS/pMMR CRC (137 MSI, 15 MSS) using MSI PCR and IHC. The patients with dMMR/MSI CRC from the Saint-Antoine

Hospital were previously diagnosed as being dMMR/MSI between 1998 and 2021 regardless of the MMR defect detected in the tumor. Both tumor and nontumor DNA material was available for these cases, and they were not previously analyzed by WES (no overlap with the C2 cohort). The patients with dMMR/MSI CRC from the Lille University Hospital with material available (biopsy sample or surgical resection) from 2016 to 2021 displayed isolated loss of MSH6 or PMS2 expression. They were selected to further evaluate the performance of MSICare for identifying MSI in these rare dMMR/MSI CRC settings, in particular for MSH6-deficient CRC, which are known to be more difficult to diagnose.<sup>21</sup>

All patients provided written consent, and the Institutional Review Boards/Ethics Committees of the participating centers approved the study.

### Samples

In the prospective cohort (C1, clinical trials NCT02840604 and NCT033501260), the mCRC samples were formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) and were composed of the primary or metastatic tumor tissue. In the C2 retrospective cohort, all nmCRC samples (N = 88) were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. For mCRC patients (N = 25), the primary tumors and metastases preserved in FFPE (N = 45; 25 primary tumors and 20 metastases) were collected and analyzed whenever possible to provide a more complete description of this rare CRC subtype. For the public retrospective cohort (C3), frozen tissue samples were collected from the primary tumor sites (colorectum, stomach, and endometrium) as described.<sup>24</sup> In the C4 retrospective cohort, CRC samples (N = 152; primary or metastases) and matched nontumor samples were FFPE (N = 87) or frozen (N = 65) to appreciate the feasibility of the MSICare method under various technical conditions and qualities of DNAs. Matched normal colonic mucosa samples were considered in all cohorts to perform NGS-based MSI screening.

### Immunohistochemistry and Microsatellite Instability-Polymerase Chain Reaction

All CRC samples from C1, C2, and C4 used in this post hoc study were centrally reassessed in expert centers involved in this study (Saint-Antoine Hospital, Paris, Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Dijon, and Lille University Hospital, Lille, France) for dMMR status using IHC and for MSI using PCR, as previously described.<sup>14-16</sup>

### MSISensor End Points

False-negatives were defined as samples initially diagnosed as MSI and/or dMMR using MSI-PCR and IHC, respectively, but showing a negative MSISensor score ( $\leq 10\%$ ) when considering (1) the full exome data or downsampled exome data restricted to the MSK-IMPACT gene panel (C1, C2, and C3),<sup>19,20</sup> or (2) MSIDIAG microsatellite panel of markers (see below) after targeted sequencing of tumors (C4). This was done by central assessment at the Saint-Antoine Hospital (C1, C2, C3, and C4), at the Georges-Francois Leclerc Cancer Center (C1), or at the Lille University Hospital (C4). The sensitivity of MSISensor was calculated as the percentage of true-positive

cases among the total of true-positive and false-negative cases.

### Whole-Exome Sequencing and Next-Generation Sequencing-Based Microsatellite Instability Diagnosis With MSISensor

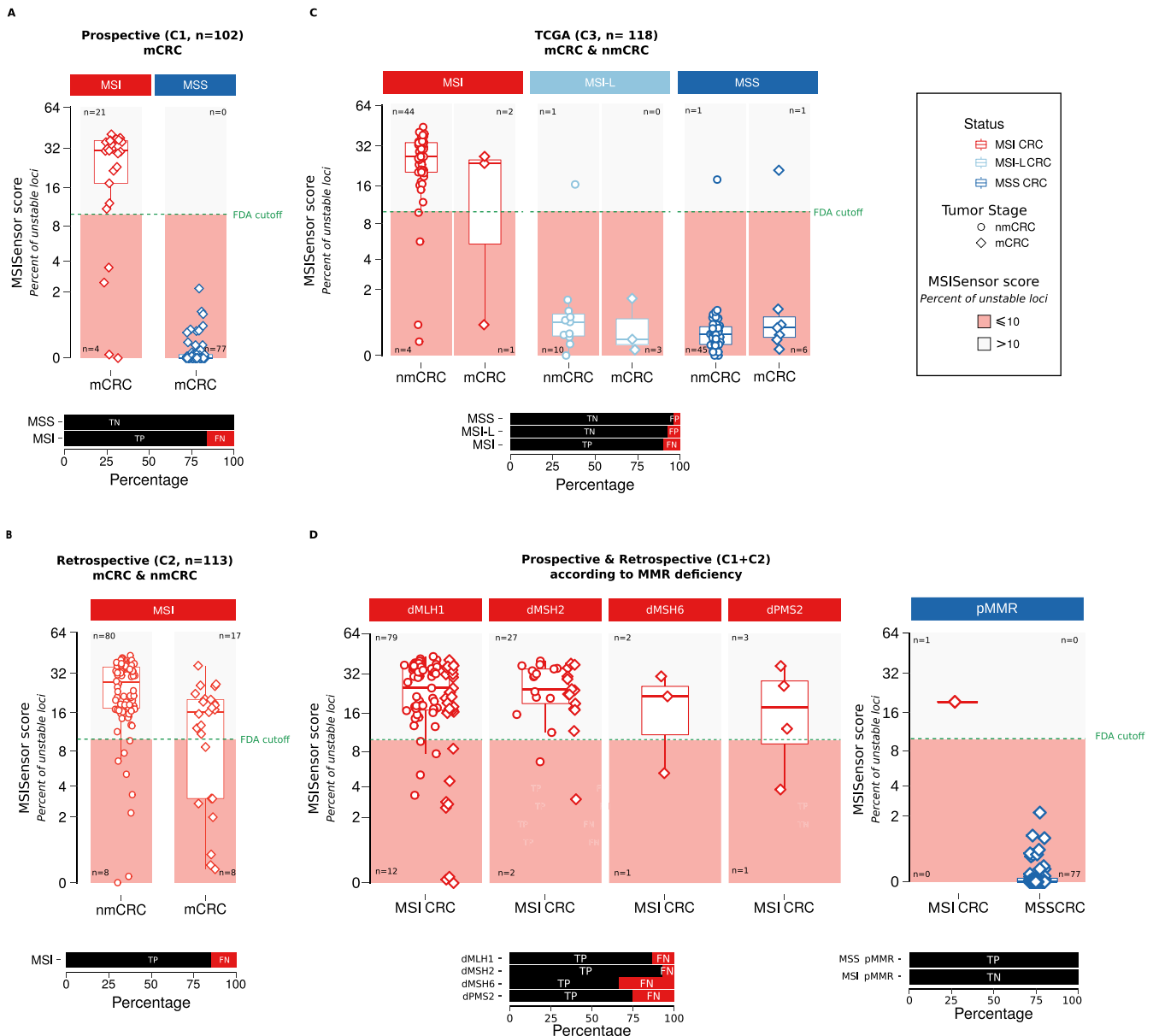
For the prospective (C1) and retrospective (C2) cohorts, the WES procedure was performed as recommended by the manufacturer (SureSelect Human Exon Kit v5, 75 megabase; Agilent, Les Ulis, France) and as previously described.<sup>25</sup> For metastatic tumor samples (C1 and C2), the generated reads were mapped to the reference genome hg38 (Genome Reference Consortium Human Build 38), whereas for the retrospective nonmetastatic samples (C2), the reads were mapped onto hg19 (Genome Reference Consortium Human Build 37). Sequencing data comprised between  $\sim 50\times$  depth (normal samples) and  $\sim 200\times$  depth (tumor samples). MSISensor was used at the default setting to evaluate the mutation status of microsatellites from the WES data.<sup>20</sup>

### Implementation of the Optimized Next-Generation Sequencing-based MSICare Method to Increase the Sensitivity of Microsatellite Instability Detection in Colorectal Cancer and in Other Tumors

A new method (MSICare) was developed to optimize the detection of MSI based on comparison of the read distribution between normal and tumor samples from full WES data (C1, C2, and C3). Mononucleotide repeats (MNR) with a length  $\geq 12$  base pairs (bp) were considered for analysis only if they were covered by at least 20 mapping reads in both healthy tissue and tumor samples. The total number of reads covering each candidate MNR was then normalized (arbitrary value of 100) in tumor and matched healthy tissue. For each MNR and each deletion size, the normalized number of reads in healthy tissue was subtracted from the normalized number of reads in tumor tissue [ $\Delta\text{ratio} = \% \text{ tumor} - \% \text{ normal}$ ] to generate an MSI signal corresponding to the sum of the  $\Delta\text{ratio}$  values for all candidate MNR. The  $\Delta\text{ratio}$  value was then adjusted by estimating the tumor purity (TP) for each tumor sample, with the estimated TP corresponding to the median value of the MSI signal for all MNR with a length  $\geq 14$  bp covered by at least 30 reads in tumor and 20 reads in normal tissue. The adjusted value for the  $\Delta\text{ratio}$  was then used to classify a given MNR as wild-type ( $\Delta\text{ratio-adjusted} = \Delta\text{ratio} \times \text{estimated TP} < 50\%$ ) or mutated ( $\Delta\text{ratio-adjusted} = \Delta\text{ratio} \times \text{estimated TP} \geq 50\%$ ), given that observed microsatellite mutations can be heterozygous or homozygous in primary tumor samples. Finally, the MSICare score for tumor samples corresponds to the percentage of microsatellites that were mutated among the total number of microsatellites analyzed using this approach. The scripts and documentation are available at <https://curamuscancer.fr/msicare/>.

### MSICare Cutoff Determination

A cutoff value for MSICare was estimated to optimize the differentiation of MSI from MSS samples in the C1 and C2 cohorts. This was done using cutpoint 1.0.32 software (University of Applied Sciences Bielefeld), which estimates



**Figure 2.** Reassessment of MSI using MSISensor in prospective and retrospective cohorts of mCRC and nmCRC whose MSI/dMMR or MSS/pMMR status had been previously assessed with gold standard reference methods. (A) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 25 MSI (red) and 77 MSS (blue) patients with mCRC from the prospective cohort (C1). (B) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 88 MSI patients with nmCRC (left) and 25 MSI patients with mCRC (right) from the retrospective cohort (C2). (C) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 118 TCGA patients, including 51 MSI, 14 MSI-L, and 53 MSS patients (C3). (D) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of patients from the C1 and C2 cohorts with deficient dMLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC. A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dashed line). The horizontal line in the middle of each box indicates the median; the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the vertical lines mark the minimum and maximum of all the data. Non-metastatic samples are represented by a circle and metastatic samples by a diamond. The horizontal bar plots indicate the percentage of true-negative (TN), true-positive (TP), false-negative (FN), and false-positive (FP) results for each cohort.

optimal cutoff points in binary classification tasks and validates their performance using bootstrapping. A cutoff point of 20 was determined using full WES data in a CRC discovery set of 77 MSS and 138 MSI (C1 + C2) and then applied to a CRC and non-CRC validation set of MSI (C3) from public TCGA data

(see the Results section for further details). The same cutoff was tested again to test MSICare for identifying MSI in the same cohorts of patients with CRC when considering only partial WES data restricted to the MSK-IMPACT gene panel.

**Table 1.** Estimate of the Sensitivity, Specificity, and Negative and Positive Predictive Values of Microsatellite Instability Detection Using MSISensor

Cohort	Method: MSISensor			
	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
C1	84.0 (63.9–95.5)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	95.1 (87.8–98.6)
C2				
All	85.8 (78.0–91.7)	NA	NA	NA
nmCRC	90.9 (82.9–96.0)	NA	NA	NA
mCRC	68.0 (46.5–85.1)	NA	NA	NA
C1 + C2	85.5 (78.5–90.9)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	79.4 (70.0–86.9)
C3 CRC	90.2 (78.6–96.7)	95.5 (87.5–99.1)	93.9 (83.1–98.7)	92.8 (83.9–97.6)
C4	97.1 (92.7–99.2)	73.3 (44.9–92.2)	97.1 (92.7–99.2)	73.3 (44.9–92.2)

NA, not applicable; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

### Diagnosing Microsatellite Instability in Colorectal Cancer With MSICare After Targeted Sequencing of Paired Tumoral and Normal Mucosa Samples With an Optimized Panel of Microsatellite Markers

From the viewpoint of clinical application, the MSI test is important not only in WES but also in panel testing. The performance of MSICare compared with MSISensor was assessed again in the additional independent, multicenter CRC cohort (C4) using the same cutoff. Sequencing of this cohort on paired tumor and normal mucosa samples was performed using an optimized targeted panel of microsatellite markers, namely MSIDIAG. This panel includes 441 MNRs that have been selected among the MNR harboring a size of  $\geq 12$  bp whose instability was exclusively observed in MSI tumor samples from C1, C2, and C3 after WES (low frequency of somatic mutations in MSS CRC;  $\chi^2$  test with  $P < .05$ ). After capture and sequencing, reads were mapped to the human genome build (hg38) with depth of coverage between  $100\times$  and  $500\times$ . The diagnosis of MSI was assessed using the MSISensor or MSICare procedure exactly as this was performed previously from WES data in C1, C2, and C3 (see above).

## Results

### Frequent Misdiagnosis of Microsatellite Instability with MSISensor in Metastatic and Nonmetastatic Colorectal Cancer

All CRC samples from C1 and C2 were centrally reassessed for MSI and dMMR status using the gold standard reference methods of pentaplex PCR and IHC (Figure 1, Supplementary Table S1, and data not shown). MSISensor confirmed the status of 77 MSS/pMMR mCRC samples from the prospective C1 cohort (MSISensor score  $\leq 10\%$ ) (Figures 1 and 2A). However, it failed to confirm the status of 4 of the 25 MSI/dMMR mCRC samples (MSISensor score  $\leq 10\%$ ) (Figure 2A). The frequency of misdiagnosis in C1

was therefore 16% ( $n = 4$  of 25; sensitivity, 84%; 95% confidence interval [CI], 63.9%–95.5 %).

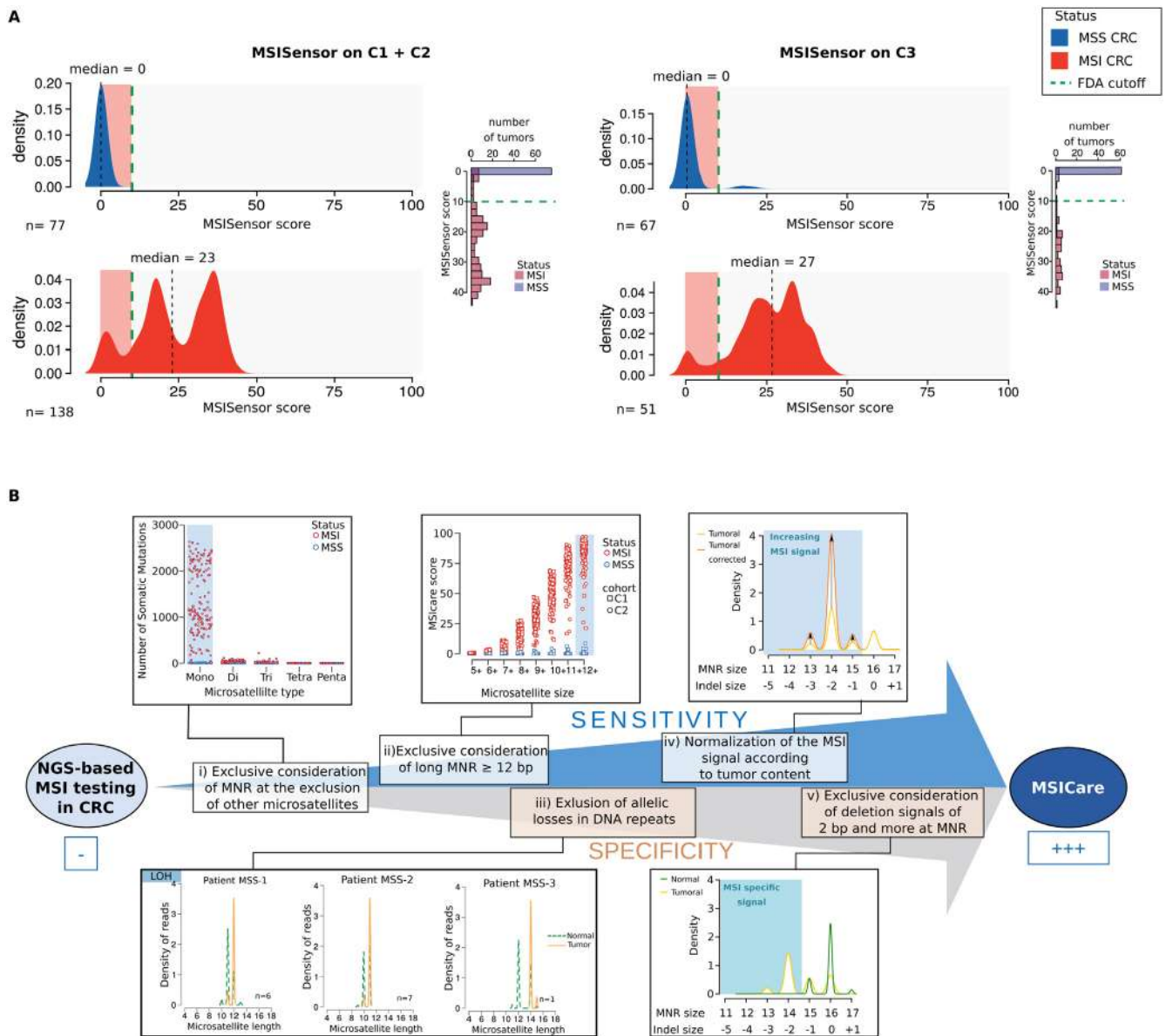
The sensitivity of MSISensor was further assessed in 25 patients with mCRC with MSI/dMMR from the retrospective C2 cohort (Figure 1). In mCRC, the frequency of misdiagnosis was even higher at 32% ( $n = 8$  of 25; sensitivity, 68%; 95% CI, 46.5%–85.1%) (Figure 2B). Supplementary Figure 1 shows the performance of MSISensor according to the metastatic site for these 25 mCRC samples with MSI/dMMR. In 88 patients with nmCRC with MSI/dMMR from the C2 cohort, misdiagnosis occurred in 9.1% ( $n = 8$  of 88; sensitivity, 90.9%; 95% CI, 82.9%–96%) (Figure 2B).

The sensitivity of MSISensor was finally assessed in the public C3 cohort of patients with CRC that included both nmCRC and mCRC (Figure 1). The frequency of missed diagnoses was again very similar at 9.8% ( $n = 5$  of 51), giving a sensitivity of 90.2% (95% CI, 78.6%–96.7%) in patients with MSI/dMMR CRC. This included 1 misdiagnosed case of mCRC (1 of 3 [33%]) (Figure 2C). MSISensor confirmed the status of all but 2 MSS/pMMR mCRC samples from C3, thus indicating the major limitation of this method was its lack of sensitivity.

Figure 2D shows our analysis of the performance of MSISensor, taking into account the nature of the dMMR defect in tumors. The results indicate that the sensitivity of this test is likely to be especially low in MSH6-deficient or PMS2-deficient CRC (sensitivity, 71.4%; 95% CI, 29%–96.3%), as expected.<sup>21</sup> The overall performance of MSISensor in the C1 cohort compared with the C2 and C3 cohorts is summarized in Table 1.

### Identifying Weaknesses and Limits of MSISensor by Deciphering the Microsatellite Instability Genomic Signal of DNA Repeats in Colorectal Cancer

A density plot was created to show fluctuations in the MSISensor score for the C1, C2, and C3 patient cohorts



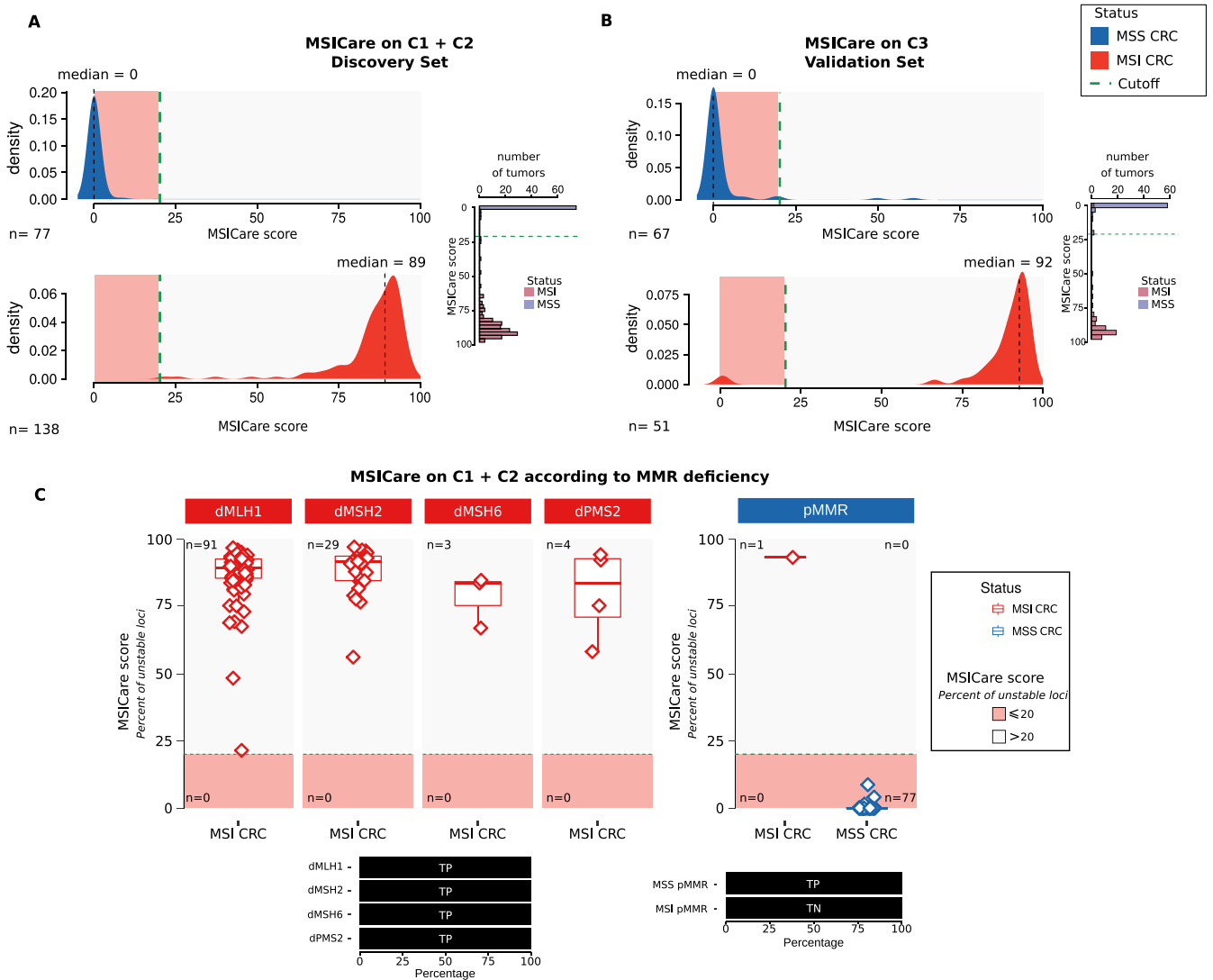
**Figure 3.** Improving the computational detection of MSI in CRC by identifying the weaknesses and limits of MSISensor. (A) Density plot of the MSISensor score in C1 + C2 (left) and C3 (right) cohorts. The cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to separate MSS from MSI tumors (green dashed line). The adjacent histograms represent the distribution of tumor samples according to their MSISensor score. (B) Schematic representation of the improvement in the MSI status detection method using NGS (see also Results section and Supplementary Figure 3 for details). LOH, loss of heterozygosity.

analyzed in this study (Figure 3A). The MSI/dMMR and MSS/pMMR status of all samples in cohorts C1 and C2 were pooled because these had previously been validated centrally. CRC samples from the public cohort C3 were considered separately because we were unable to independently confirm the status of these tumors using IHC and MSI-PCR. The density profiles clearly highlight the lack of sensitivity of MSISensor for the detection of MSI in dMMR CRC, as already shown above for the 3 cohorts (Figure 2, Table 1).

We next hypothesized that it should be possible to improve the detection of MSI in CRC by modifying certain parameters in the analysis of NGS data. In support of this,

WES analyses revealed that MSISensor lacked sensitivity because:

1. MNR sequences were by far the most unstable category of microsatellites in dMMR colon tumors and therefore better at distinguishing MSI from MSS CRC than other types of repeat used by MSISensor (eg, di-, tri-, tetra-, penta-) (Supplementary Figure 2A);
2. the ability of MNR to discriminate between MSS and MSI colon tumors was dependent on their length, with long MNR of  $\geq 12$  bp found to be the most discriminating compared with other microsatellites used by MSISensor (Supplementary Figure 2B); and



**Figure 4.** Testing the diagnostic performance of MSICare. Density plot of the MSICare score in (A) the C1 and C2 cohorts and (B) the C3 cohort. (C) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSICare score) obtained from WES of patients from the C1 and C2 cohorts with deficient dMLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC. The horizontal line in the middle of each box indicates the median; the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the vertical lines mark the minimum and maximum of all the data. Horizontal bar plots indicate the percentage of true-negative (TN) and true-positive (TP) results.

3. MSISensor was not suitable for detecting MSI in CRC samples with an estimated TP of <30% to 40%. This is an important limitation to the sensitivity of MSISensor in primary MSI CRC due to the often high levels of contamination with nontumor and inflammatory pMMR/MSS cells (Supplementary Figure 3; see also our review<sup>26</sup> and original publications for further details<sup>15,16,23,25,27</sup>).

WES analyses also revealed that MSISensor lacks specificity for 2 reasons. Firstly, the MSISensor computational tool confused the true MSI signal with allelic losses (loss of heterozygosity) for some of the MNR. Loss of heterozygosity occurs frequently in MSS colon tumors with high levels of chromosomal instability (Supplementary Figure 4A).

Secondly, stuttering by DNA polymerase during the PCR reaction occurs frequently at microsatellites and in particular at long MNR. A misdiagnosis of MSI can therefore occur when MSISensor considers small 1-bp deletions in these microsatellites to represent MSI (Supplementary Figure 4B). Figure 3B shows a summary of the various pitfalls that have been identified for MSISensor, leading us to develop a more refined NGS-based bioinformatic tool, namely MSICare.

### Designing and Validating MSICare to Improve Next-Generation Sequencing-Based Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer

To avoid the abovementioned pitfalls of MSISensor, we next designed a new computational tool referred to as

**Table 2.** Estimate of the Sensitivity, Specificity, and Negative and Positive Predictive Values of Microsatellite Instability Detection Using MSICare

Cohort	Method : MSICare			
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
	% (95 % CI)	% (95% CI)	% (95% CI)	% (95% CI)
C1	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)
C2				
All	100.0 (100.0–100.0)	NA	NA	NA
nmCRC	100.0 (100.0–100.0)	NA	NA	NA
mCRC	100.0 (100.0–100.0)	NA	NA	NA
C1 + C2	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)
C3 CRC	96.1 (86.5–99.5)	97.0 (89.6–99.6)	96.1 (86.5–99.5)	97.0 (89.6–99.6)
C4	99.3 (96.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	100.0 (100.0–100.0)	93.8 (69.8–99.8)

NA, not applicable; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

MSICare to accurately detect MSI in CRC from C1 and C2, based on analysis of their WES profile. In contrast to MSISensor, MSICare identifies true MSI signals defined as somatic deletions of at least 2 bp in length that occur in long MNR ( $\geq 12$  bp) in DNA from dMMR cancers but not in DNA from paired normal tissue (see [Figure 3B](#) and Materials and Methods for further details).

A receiver operating characteristic curve was constructed assuming binary classification of the MSICare score. This revealed a perfect discrimination between dMMR and pMMR CRC in C1 and C2, with 100% sensitivity and 100% specificity when using a cutoff value of 20% ([Figure 4A](#)). dMMR/MSI samples showed a mean MSICare score  $>80\%$  with little dispersion around this value, whereas the mean MSICare score of pMMR/MSS samples was  $<10\%$ . MSICare thus appears to be very effective in discriminating MSI from MSS CRC cases.

The high level of discrimination achieved using the cutoff value of 20% was validated in the public C3 cohort ([Figure 4B](#), right panel) and led us to correct 3 cases among 5 that were true MSI that showed false-negative status with MSISensor. Of interest, the 2 remaining CRC samples with negative MSISensor status that were previously classified as MSI by PCR according to TCGA remained unambiguously MSS with MSICare. Detailed analysis of the exomic profile of both these tumors revealed very few mutations in microsatellites located within coding regions of known MSI target genes ([Supplementary Figure 5](#)). Furthermore, one of the samples showed pMMR according to TCGA, thus suggesting an equivocal MSI status.

The overall performance of MSICare in the C1 cohort compared with the C2 and C3 cohorts is summarized in [Table 2](#). In [Figure 4C](#), we analyze the performance of MSICare taking into account the nature of the dMMR defect in tumors. The results indicate that the sensitivity of this test remain optimal in MSH6-deficient or PMS2-deficient colon tumors from this cohort (sensitivity 100%).

### Confirmation of the Performance of MSICare in Detecting Microsatellite Instability in Colorectal Cancer Using Targeted Next-Generation Sequencing

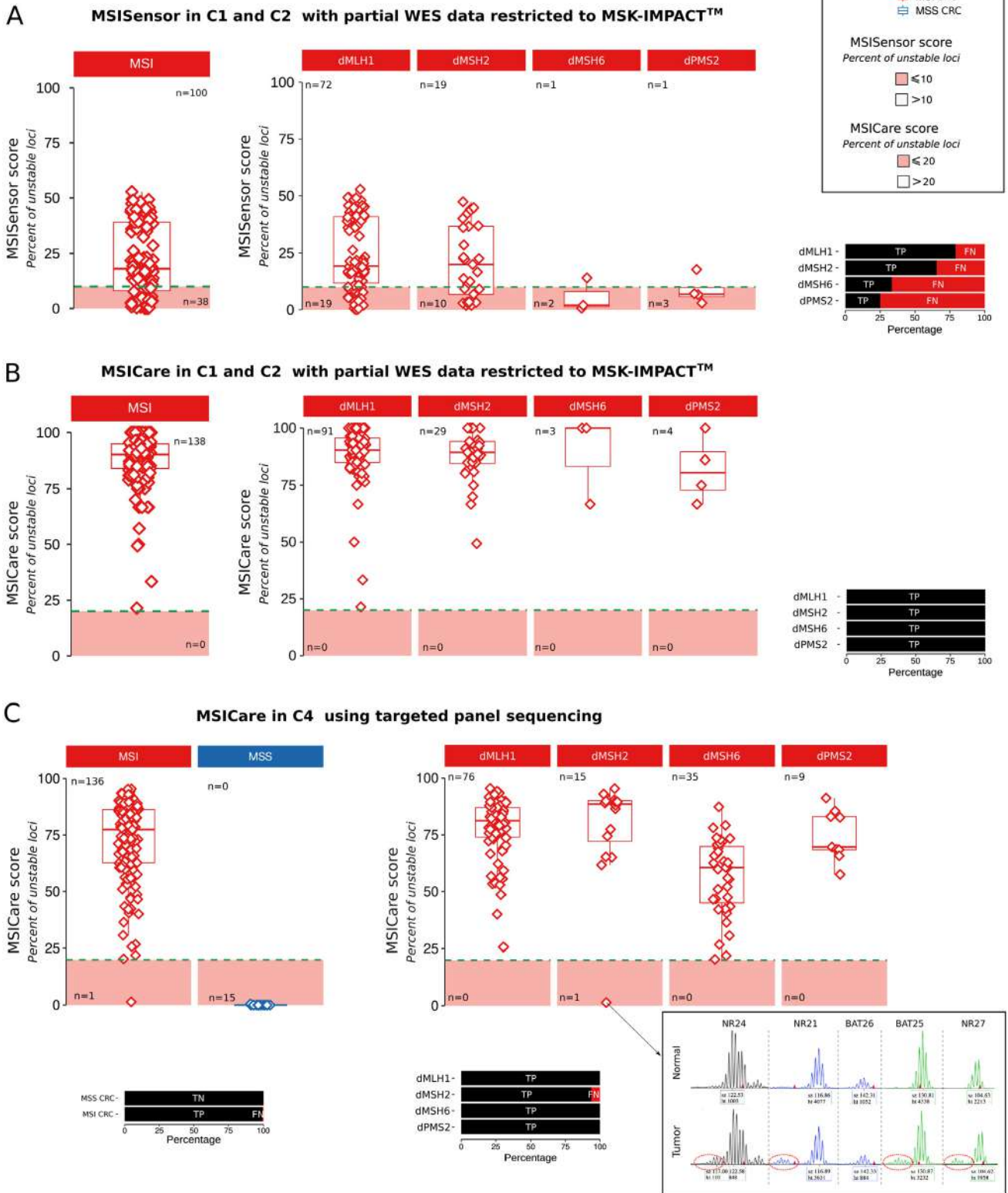
Because WES is not routinely used in clinical care, we finally aimed to confirm the high performance of MSICare for detecting MSI after targeted sequencing of CRC samples compared with paired samples of healthy mucosa. This was first done in C1 and C2, considering only the microsatellites included in the restricted MSK-IMPACT gene panel (see Materials and Methods for details). The overall number of false-negative cases detected among MSI/dMMR from these cohorts under these conditions was important with MSISensor for all 3 versions of MSK-IMPACT ([Figure 5A](#), [Supplementary Figure 6](#)), particularly in MSH6- and PMS2-deficient settings (sensitivity, 28.6%; 95% CI, 4.9%–62%) ([Figure 5A](#)). By contrast, the performance of MSICare remained optimal under the same conditions (sensitivity 100%) ([Figure 5B](#)).

Next, we generated an optimally designed panel of 441 mononucleotide repeats (length  $\geq 12$  bp and unstable in MSI tumors; see Materials and Methods for details) called MSIDIAG. Using this panel, we confirmed that in the C4 cohort, including 152 patients (137 MSI, 15 MSS) and which was enriched in CRC with MSH6 (35 patients) or PMS2 (9 patients) deficiency, MSICare still optimally detected MSI in CRC regardless of MMR defect (sensitivity, 99.3%; 95% CI, 97.8%–100.7%; specificity, 100%) ([Figure 5C](#)), whereas MSISensor remained less sensitive while becoming un-specific expectedly with sensitivity of 73.3% (95% CI, 44.9%–92.2%) ([Supplementary Figure 7](#)).

## Discussion

Several publications have recently highlighted the potential of NGS for the detection of MSI in human cancers by using distinct computational algorithms.<sup>19,20,28–31</sup> Among





these, MSISensor has received FDA approval and is used to guide the prescription of ICI therapy in patients with metastatic cancer, regardless of the primary location of the tumor. MSISensor has been tested on advanced solid cancers, including a large number of CRC. However, the performance of this NGS-based test has yet to be evaluated in a large series of CRC previously assessed for MSI/dMMR status using the reference PCR and IHC methods. The accuracy of MSISensor is especially important not only for patients deemed as MSI/dMMR mCRC and subsequently treated with ICI but also more generally in CRC regardless of tumor staging to help the detection of Lynch's syndrome. It is also important in nmCRC because adjuvant chemotherapy with fluoropyrimidines may be ineffective or even detrimental in patients with MSI/dMMR CRC with localized diseases, especially in those with stage II disease.<sup>32</sup>

In this study we provide clear evidence that MSISensor lacks sensitivity for the detection of MSI. This was shown in large cohorts of mCRC and nmCRC samples that were previously confirmed as MSI/dMMR or MSS/pMMR by IHC and MSI-PCR methods performed in large, specialized test centers. These results are of particular clinical relevance for ICI therapy. They highlight that in a prospective cohort of patients with MSI mCRC, the consideration of results from MSISensor alone in the absence of MSI-PCR and IHC testing would have led to a significant number of patients not being offered ICI treatment. Of interest, of the 4 patients with MSI CRC not detected by MSISensor, 3 were found to be responsive to ICI treatment.

The present results in patients with CRC are consistent with those of another study that found NGS was unable to detect MSI in dMMR tumors from 2 patients with prostate cancer who displayed prolonged positive response to immune checkpoint blockade therapy.<sup>33</sup> Both tumors showed a high mutational burden and a high density of intratumoral infiltration with CD3 cells. We therefore extrapolate that the low sensitivity of MSISensor for the detection of MSI is likely to apply to all tumor types, as suggested also by the analysis of gastric and endometrial tumors from TCGA in the present study (see [Supplementary Figure 8](#)).

The new MSICare bioinformatic tool proposed here for the detection of MSI shows much better performance compared with MSISensor. As an expert center for the analysis of MSI in clinical oncology, we have optimized this bioanalytic tool so that MSI detection in tumor DNA is highly

sensitive while remaining specific. It has 100% sensitivity and specificity compared with PCR-MSI in the CRC cohorts tested here, thus matching the performance of the gold standard IHC and MSI-PCR methods. The use of MSICare makes it possible to diagnose MSI in CRC that is highly contaminated with stromal tissue, which is frequently the case in MSI primary tumors.

Of note, this new algorithm shows the same performance for both FFPE and frozen primary or metastatic tissue samples regardless of their primary MMR defect in MLH1, MSH2, MSH6, or PMS2. It was notably checked to be relevant, in contrast to MSISensor, for identifying MSI in MSH6-deficient CRC in which MSI is more difficult to diagnose<sup>21</sup> and in PMS2-deficient CRC, which is scarce. Importantly, and again in contrast to MSISensor, its performance for assessment of MSI remained optimal when tested with the full or partial exome data restricted to the MSK-IMPACT panel of markers.

MSICare also showed great performance when exploited with an optimally designed set of microsatellite markers after targeted sequencing of tumor samples (MSIDIAG). The outstanding diagnostic performance of MSICare to detect MSI with different sequencing strategies on independent series of CRC validates with a high level of evidence the relevance of this method to detect MSI in CRC. The MSIDIAG panel includes mononucleotide repeats that are of particular interest for detecting MSI in tumor DNA, and it is therefore recommended to use this panel with MSICare in targeted sequencing analyses for optimal sensitivity of this assay.

In summary, these data establish that MSICare has the potential to become a new NGS-based international reference method for the determination of MSI phenotype in CRC from WES or targeted NGS using homemade or FDA-approved panels. It should become very useful for translational research, clinical trials, and in routine clinical practice in the management of patients with CRC, especially as MSI is becoming an indispensable theranostic biomarker in the metastatic setting.

This study has several limitations. Firstly, although our results suggest the reliable performance of MSICare in a public series of gastric carcinoma and esophageal carcinoma from TCGA (see [Supplementary Figure 8](#)), further evaluation in noncolorectal cancer types is required.

Secondly, we investigated a relatively small prospective series of patients with true MSI/dMMR mCRC treated with

**Figure 5.** Comparative performance of MSISensor and MSICare for the identification of MSI using targeted panel sequencing data. (A) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from the MSK-IMPACT for patients from the C1 and C2 cohorts (all patients, *right panel*; the same patients with deficient [d]MLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC, *left panel*). A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (*green dashed line*). (B) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSICare score) obtained from the MSK-IMPACT for patients from the C1 and C2 cohorts (all patients, *right panel*; the same patients with dMLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC, *left panel*). A cutoff MSICare score of 20 was used to discriminate MSS from MSI tumors (*green dotted line*). (C) Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score and/or MSICare score) obtained after targeted sequencing of patients from the C4 cohort (all patients, *right panel*; the same patients with dMLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC, *left panel*). The pentaplex profile of the only one misdiagnosed case is shown in a box. The *horizontal line* in the middle of each box indicates the median; the *top and bottom borders* of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the *vertical lines* mark the minimum and maximum of all the data. Horizontal bar plots indicate the percentage of true-negative (TN), true-positive (TP), false-negative (FN), and false-positive (FP) results.

ICI. Larger prospective studies are required to confirm these findings in mCRC settings involving ICI treatment.

In the future, we plan to further validate the exceptional performance of MSICare in patients with and without CRC using the homemade MSIDIAG or commercial panel of markers (eg, Memorial Sloan Kettering, FoundationOne), especially for the metastatic setting with immunotherapy. This should allow further confirmation of MSICare as an accurate NGS-based tool for the detection of MSI in human cancers. This comes at a critical time when MSI is increasingly becoming a theranostic marker to guide the therapy of patients at all stages of cancer and for a growing number of tumor types.

## Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.05.007>.

## References

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812–816.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027–1038.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816–819.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–561.
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849–5852.
- Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5:43–51.
- Marisa L, Svrcek M, Collura A, et al. The balance between cytotoxic T-cell lymphocytes and immune checkpoint expression in the prognosis of colon tumors. *J Natl Cancer Inst* 2018;110:68–77.
- Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372:2509–2520.
- Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2018;36: 773–779.
- Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017;18:1182–1191.
- Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* 2020;38:11–19.
- Andre T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2020;383:2207–2218.
- Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 2019; 30:1232–1243.
- Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–1811.
- Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–251.
- Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J Med Genet* 2016;53:377–384.
- Svrcek M, Lascols O, Cohen R, et al. MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: differences between tumors. *Bull Cancer* 2019; 106:119–128.
- Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of primary resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer with misdiagnosis of microsatellite instability or mismatch repair deficiency status. *JAMA Oncol* 2019;5:551–555.
- Middha S, Zhang L, Nafa K, et al. Reliable pan-cancer microsatellite instability assessment by using targeted next-generation sequencing data. *JCO Precis Oncol* 2017;1. PO.17.00084.
- Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:1015–1016.
- You JF, Buhard O, Ligtenberg MJ, et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. *Br J Cancer* 2010;103:1840–1845.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45:228–247.
- Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401–411.e1.
- Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, et al. Classification and characterization of microsatellite instability

- across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22:1342–1350.
25. Jonchere V, Marisa L, Greene M, et al. Identification of positively and negatively selected driver gene mutations associated with colorectal cancer with microsatellite instability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;6:277–300.
  26. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447–2454.
  27. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–1289.
  28. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, et al. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem* 2014;60:1192–1199.
  29. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget* 2017;8:7452–7463.
  30. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, et al. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 2018;7:746–756.
  31. Johansen AFB, Kassentoft CG, Knudsen M, et al. Validation of computational determination of microsatellite status using whole exome sequencing data from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2019;19:971.
  32. 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;28:3219–3226.
  33. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, et al. Pembrolizumab for treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer: multicohort, open-label phase II KEYNOTE-199 Study. *J Clin Oncol* 2020;38:395–405.

Received September 13, 2020. Accepted May 6, 2021.

#### Correspondence

Address correspondence to: Alex Duval, Team “Microsatellite Instability and Cancer”, Inserm UMRS 938, CRSA, Sorbonne University, Hôpital Saint-Antoine, Paris 75010, France. e-mail: alex.duval@inserm.fr.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr Catherine Vermaut and Lucie Delattre (Lille University Hospital) for their help with acquisition and interpretation of MSI data. This

work was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa), DGOS (Direction Générale de l’Organisation des soins) and the Ligue contre le Cancer. Dr. Duval’s team has the label de La Ligue contre le Cancer. T.R was a recipient of a grant from the Region Ile-de-France (PhD Student bursary). F.R. was a recipient of a grant from the foundation Nuovo Soldati.

#### CRedit Authorship Contributions

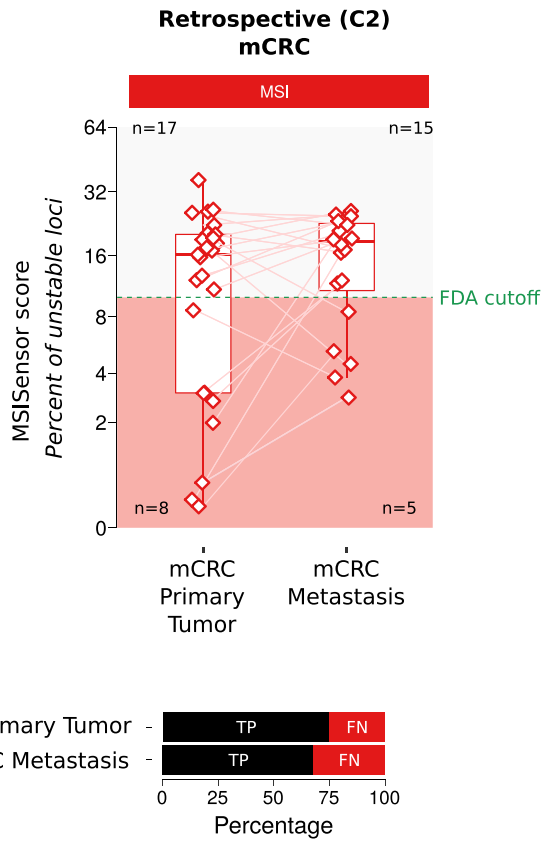
Toky Ratovomanana, PhD (Conceptualization: Equal; Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Investigation: Equal; Methodology: Equal; Software: Equal; Writing – original draft: Equal). Romain Cohen, MD, PhD (Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Resources: Supporting; Writing – original draft: Supporting). Magali Svrcek, MD, PhD (Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Methodology: Supporting; Resources: Lead; Writing – original draft: Supporting). Florence Renaud, MD, PhD (Conceptualization: Supporting; Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Resources: Supporting; Writing – original draft: Supporting; Writing – review & editing: Supporting). Pascale Cervera, MD, PhD (Investigation: Supporting; Resources: Supporting). Aurélie Siret (Methodology: Supporting; Software: Supporting). Quentin Letourneur, (Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Software: Supporting; Validation: Supporting; Visualization: Supporting). Olivier Buhard (Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Validation: Supporting; Visualization: Supporting; Writing – original draft: Supporting; Writing – review & editing: Supporting). Pierre Bourgoin (Investigation: Supporting; Resources: Supporting). Erell Guillem, PharmD (Methodology: Supporting; Resources: Supporting; Validation: Supporting). Coralie Dorard, PhD (Investigation: Supporting; Methodology: Supporting; Resources: Supporting). Remy Nicolle, PhD (Methodology: Supporting; Software: Supporting). Mira Ayadi, PhD (Methodology: Supporting; Project administration: Lead; Visualization: Supporting). Mehdi Touat, MD (Resources: Supporting; Software: Supporting). Franck Bielle, MD, PhD (Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Methodology: Supporting). Marc Sanson, MD, PhD (Project administration: Supporting; Resources: Supporting). Philippe Le Rouzic, PhD (Formal analysis: Supporting; Investigation: Supporting; Software: Supporting). Marie-Pierre Buisine, MD, PhD (Methodology: Equal; Resources: Equal). Guillaume Piessen, MD, PhD (Resources: Equal). Ada Collura, PhD (Investigation: Supporting; Writing – original draft: Supporting). Jean-François Fléjou, MD, PhD (Data curation: Supporting; Methodology: Supporting; Resources: Lead). Aurélien de Reyniès, PhD (Funding acquisition: Supporting; Investigation: Supporting; Project administration: Lead; Validation: Supporting). Florence Coulet, PharmD, PhD (Data curation: Supporting; Formal analysis: Supporting; Investigation: Equal; Methodology: Equal; Resources: Lead; Validation: Supporting). François Ghiringhelli, MD, PhD (Methodology: Supporting; Resources: Lead; Writing – original draft: Supporting). Thierry André, MD (Data curation: Supporting; Project administration: Lead; Resources: Lead; Writing – review & editing: Equal). Vincent Jonchère, PhD (Data curation: Lead; Formal analysis: Lead; Investigation: Equal; Methodology: Equal; Software: Lead; Supervision: Equal; Validation: Equal; Visualization: Lead; Writing – original draft: Equal; Writing – review & editing: Supporting). Alex Duval, MD, PhD (Data curation: Lead; Formal analysis: Supporting; Funding acquisition: Lead; Investigation: Supporting; Methodology: Lead; Project administration: Lead; Resources: Lead; Software: Supporting; Supervision: Lead; Validation: Lead; Visualization: Lead; Writing – original draft: Lead; Writing – review & editing: Lead).

#### Conflicts of interest

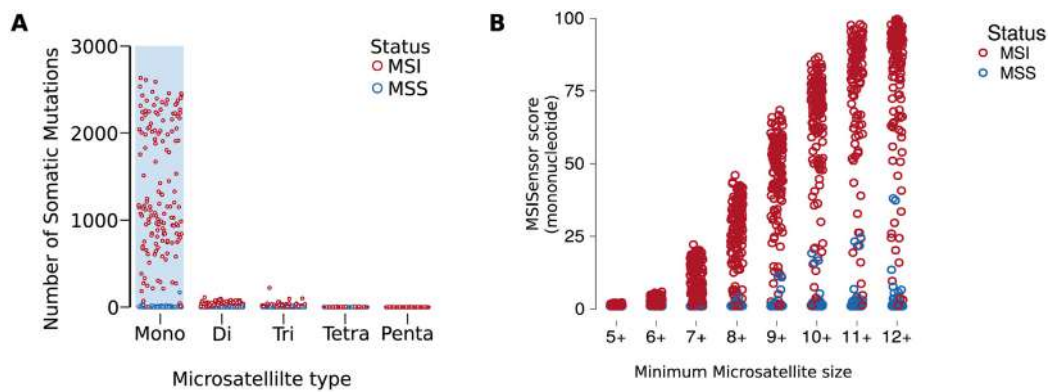
The authors disclose no conflicts.

#### Funding

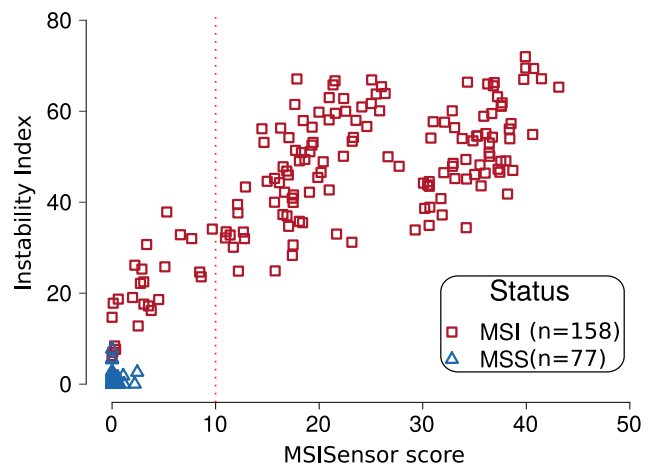
This work was supported by grants from Site de Recherche Intégrée sur le Cancer (SIRIC) Cancer United Research Associating Medicine, University & Society (CURAMUS), and the Ligue Nationale Contre le Cancer.



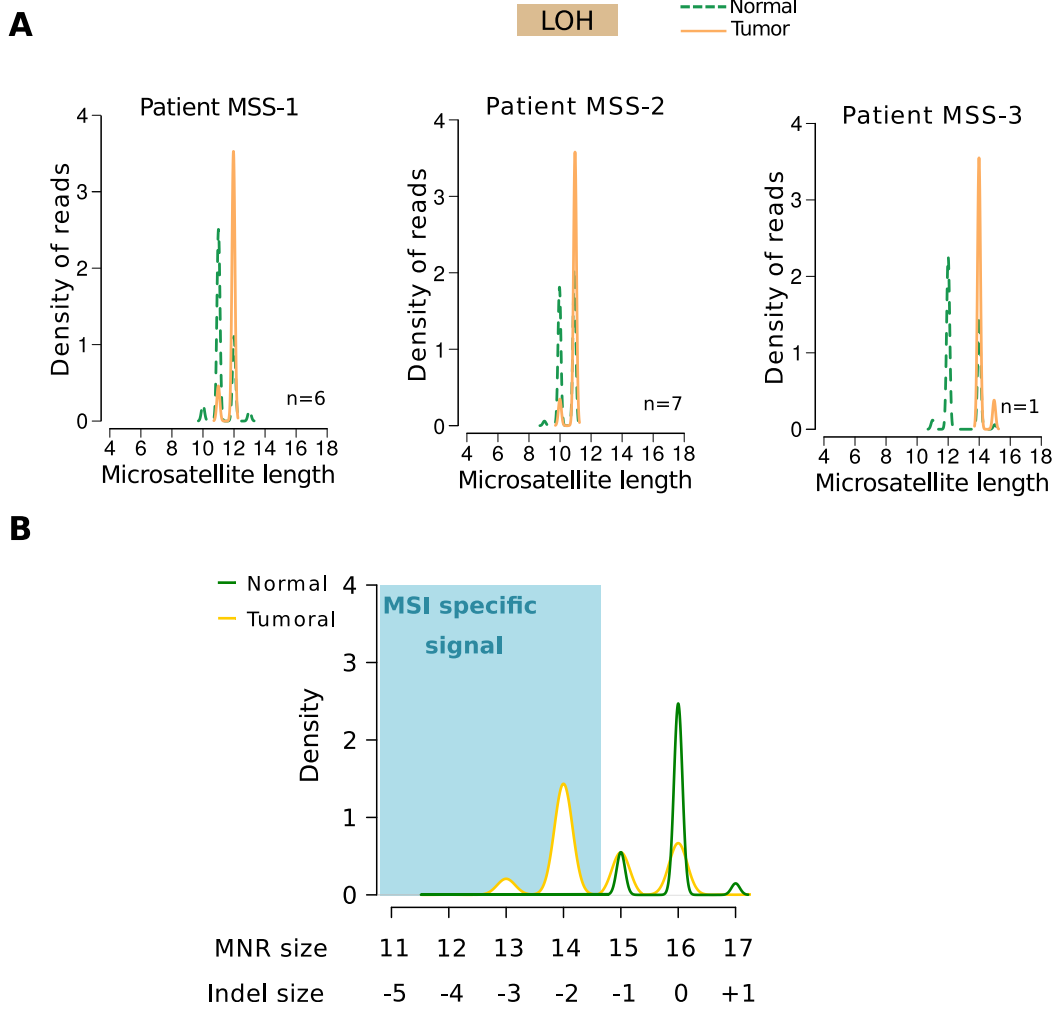
**Supplementary Figure 1.** Comparative analysis of MSI-Sensor scores between primary tumors and distant metastases from the retrospective C2 cohort. Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 25 primary tumors (*left*) and 20 distant metastases (*right*) in C2. A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (*green dashed line*). The correspondence per patient is indicated by the *pink lines*. The *horizontal line* in the middle of each box indicates the median; the *top and bottom borders* of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the *vertical lines* mark the minimum and maximum of all the data. The horizontal bar plots indicate the percentage of false-negative (FN) and true-positive (TP) results.



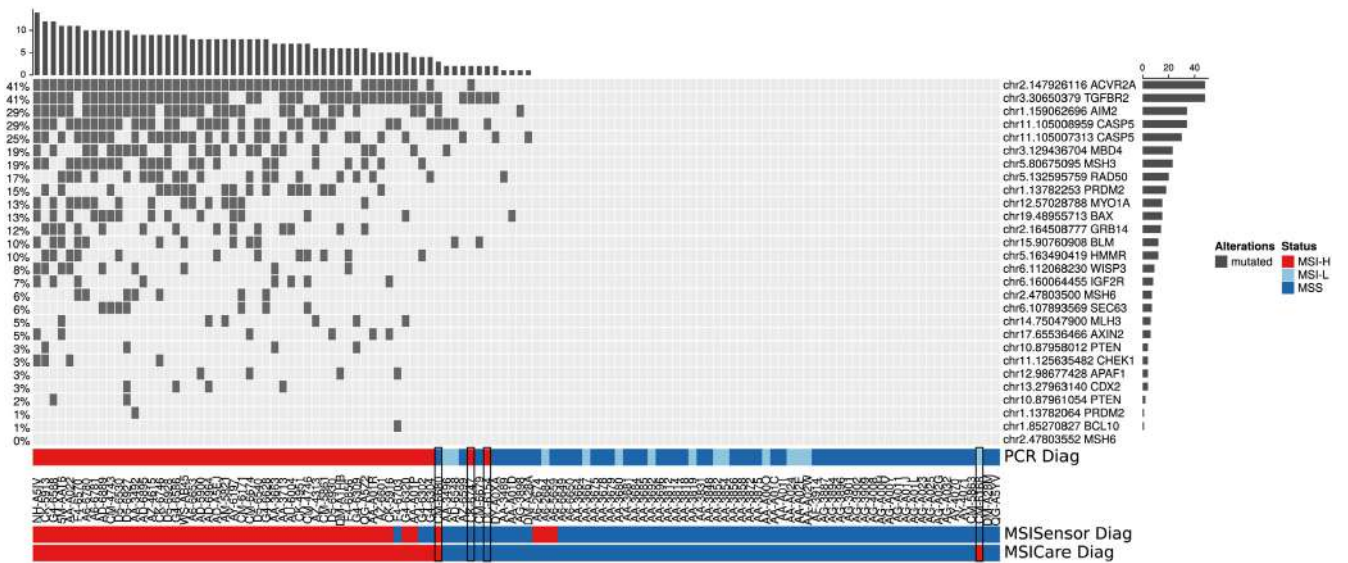
**Supplementary Figure 2.** Identification of weaknesses and limits of MSISensor for detecting MSI (lack of sensitivity). (A) Distribution of the total number of somatic mutations identified with MSISensor from WES data (C1 and C2) for each category of microsatellites (mono-, di-, tri-, tetra-, or penta-nucleotide repeats). MNR sequences (blue rectangle) are by far the most unstable category of microsatellites in dMMR colon tumors and are therefore better at distinguishing MSI from MSS CRC than other forms of repeats used by MSISensor (eg, di, tri, tetra, penta). (B) Percentage of mutated MNR according to their size (range from 5–12, MSICare score) (C1 and C2). 5+, includes all mononucleotide repeats with a length of  $\geq 5$  bp; 6+, includes all mononucleotide repeats with a length of  $\geq 6$  bp, etc. The long MNR of  $\geq 12$  bp was best at discriminating the 2 phenotypes.



**Supplementary Figure 3.** Genomic instability index according to the MSISensor score. Distribution of genomic instability index (based on mononucleotide repeat instability, see Materials and Methods for details) of tumors according to MSISensor score (x-axis) of cohorts C1 and C2.



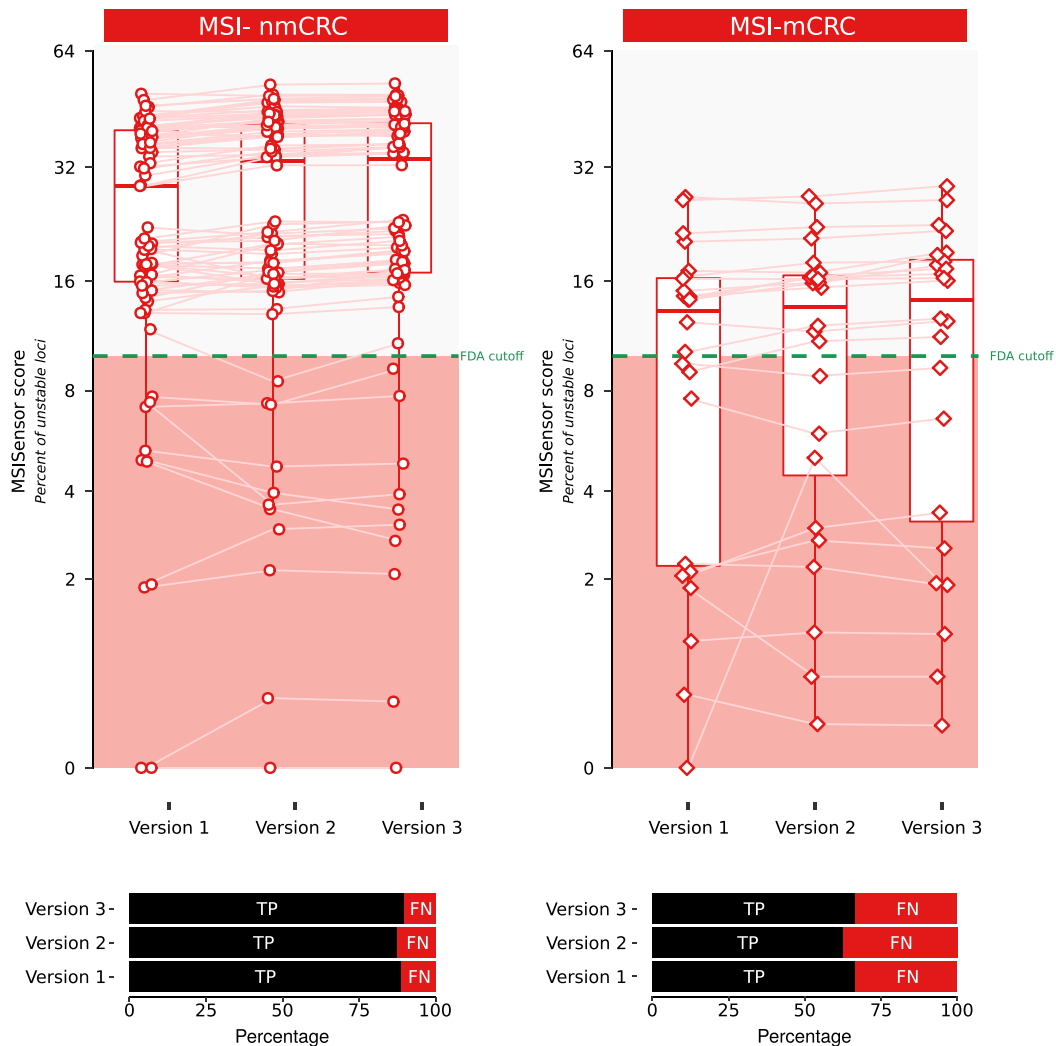
**Supplementary Figure 4.** Identification of the weaknesses and limits of MSISensor for detecting MSI (lack of specificity). (A) Density plot of reads according to the repeat length for 3 examples of loss of heterozygosity in 3 tumors identified as having mutated microsatellites by MSISensor. (B) Wild-type and mutated profiles of the T16 microsatellite are shown (normal wild-type DNA in *green*; MSI tumor mutated DNA in *yellow*). This illustrates that due to stuttering (T15), a pure MSI signal can be captured only by considering somatic deletion of  $\geq 2$  bp in this long MNR.



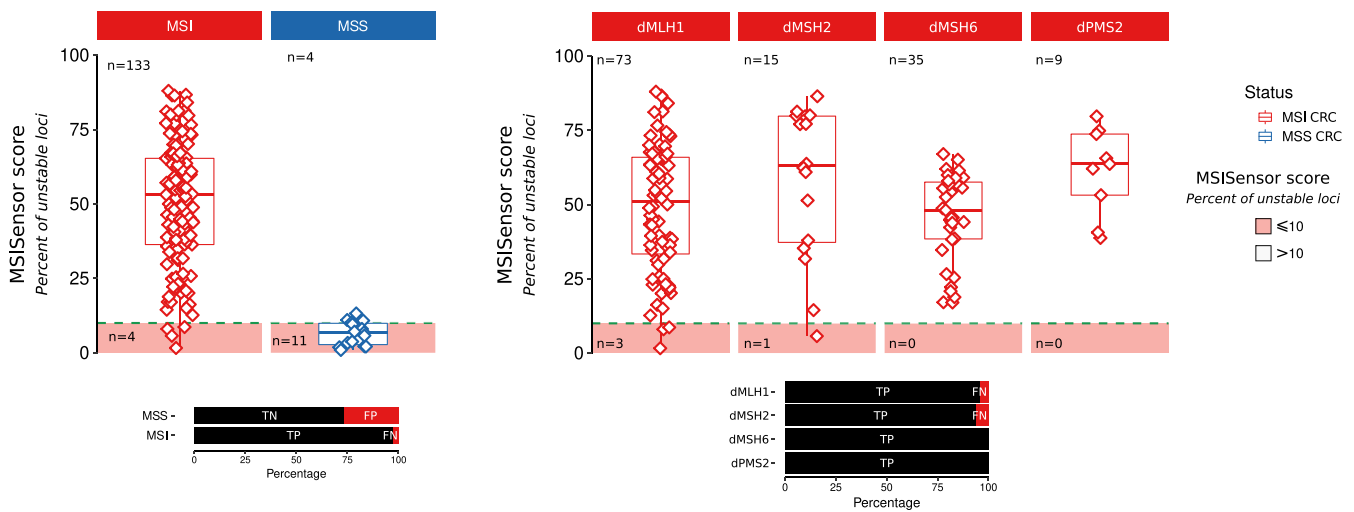
**Supplementary Figure 5.** Mutational frequencies of 28 well-known MSI CRC target genes. Oncoprint representation of 28 MSI targets. The bar plots indicate the percentage of each type of mutation within the sample (*top*) and within the gene (*side*). Patients with ambiguous classification are indicated.



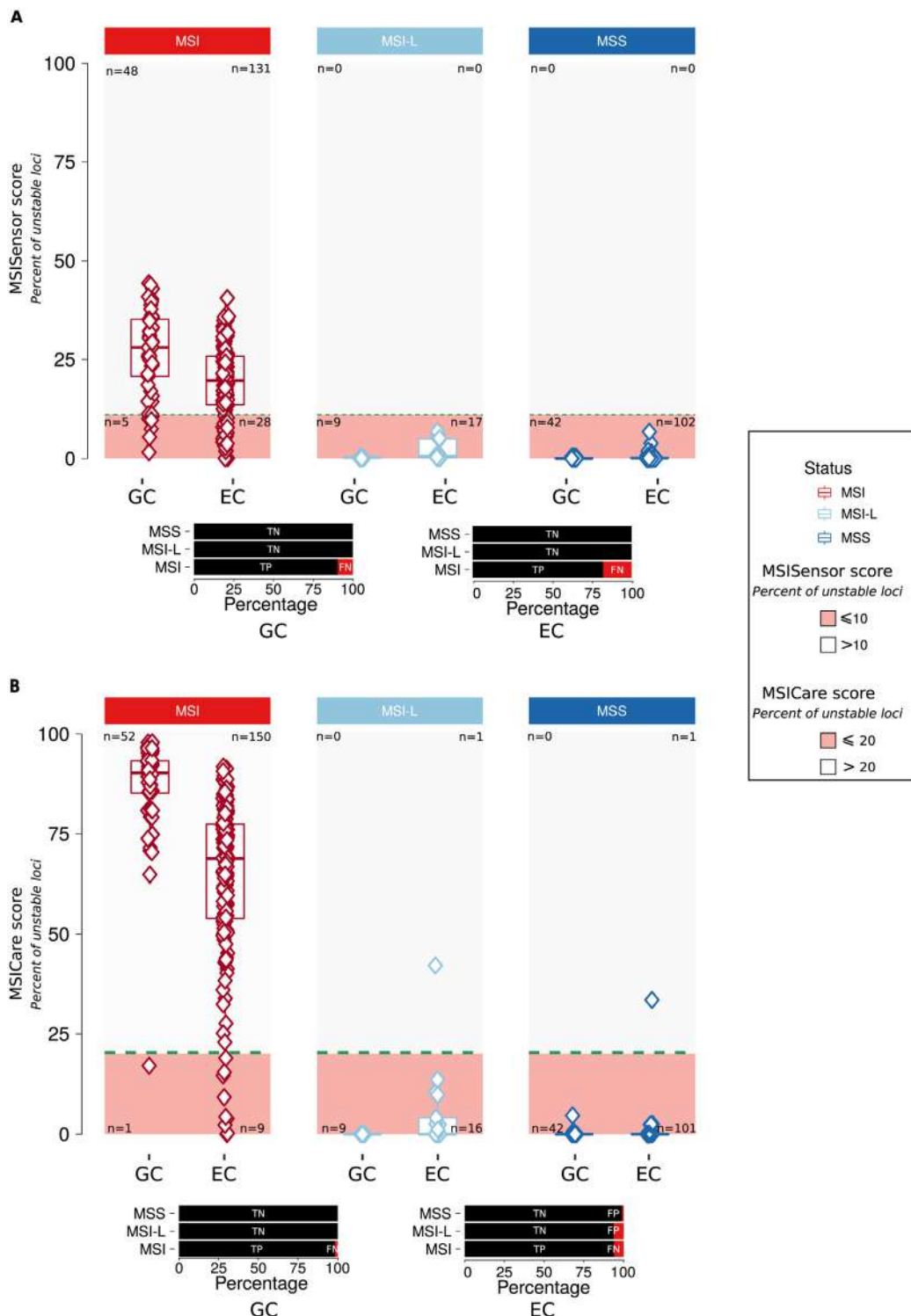
### Retrospective (C2, n=113) mCRC & nmCRC MSK-IMPACT version



**Supplementary Figure 6.** Assessment of MSISensor score from MSK-IMPACT. Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from the different versions of MSK-IMPACT for nmCRC (left) and mCRC (right) in C2. A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dashed line). The correspondence per patient is indicated by the pink lines. The horizontal line in the middle of each box indicates the median; the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the vertical lines mark the minimum and maximum of all the data. The horizontal bar plots indicate the percentage of false-negative (FN; in red) and true-positive (TP; in black).



**Supplementary Figure 7.** Assessment of MSISensor score after targeted sequencing with MSIDIAG. Box plots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained after targeted sequencing of patients from the C4 cohort (all patients, *left panel*; the same patients with deficient [d]MLH1, dMSH2, dMSH6, or dPMS2 CRC, *right panel*). The *green dashed line* indicates a cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) for discriminating tumors. The *horizontal line* in the middle of each box indicates the median; the *top and bottom borders* of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the *vertical lines* mark the minimum and maximum of all the data. The horizontal bar plots indicate the percentage of true-negative (TN), true-positive (TP), false-negative (FN), and false-positive (FP) results.



**Supplementary Figure 8.** Comparative performance of MSISensor and MSICare for the identification of MSI in gastric and endometrial tumors from the TCGA. (A) Box plots show the MSISensor score obtained from WES of 104 TCGA patients with gastric cancer (GC) (including 53 MSI, 9 MSI-L, and 42 MSS) and 278 TCGA patients with esophageal cancer (EC) (including 159 MSI, 17 MSI-L and 102 MSS) from C3. A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dashed line). (B) Box plots show the MSICare score obtained from WES of the same TCGA patients with CRC, GC, or EC. A cutoff MSICare score of 20 was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dashed line). The horizontal line in the middle of each box indicates the median; the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, and the vertical lines mark the minimum and maximum of all the data.

## 5.2 Article 2: Mécanismes de résistance aux Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire chez les patients MMRd/MSI

### Résumé de l'article n°2:

Le cancer colorectal métastatique (CCRm) présentant une instabilité des microsatellites (MSI) est sensible aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICKi). Cependant, jusqu'à 50% de ces patients progresseront malgré tout sous ICKi, sans que les mécanismes sous-jacents à la résistance à ces nouvelles thérapies n'aient pu être encore clairement identifiés. Dans cette étude ancillaire à l'essai clinique NIPICOL (NCT033501260), nous avons cherché à identifier des biomarqueurs prédictifs de la résistance au traitement par ICKi chez les patients atteints de MSI CCRm (combithérapie anti-PD1 et anti CTLA4 dans cet essai clinique, association nivolumab et ipilimumab). Ce travail a été réalisé en analysant à la fois les profils de séquençage de l'exome entier (WES) et de séquençage de l'ARN (RNAseq) de la muqueuse colique normale et tumorale correspondante de 30 échantillons de patients traités par nivolumab plus ipilimumab. Les résultats sont maintenant en cours de validation dans une cohorte indépendante de patients avec un CCRm MSI. La cohorte de validation indépendante est constituée de 39 patients traités par anti-PD1 en monothérapie et de 28 patients traités par la même combithérapie anti-PD1+anti-CTLA4. La valeur prédictive des biomarqueurs d'intérêt (marqueurs ADN ou ARN) a été étudiée en utilisant la survie sans progression selon les critères iRECIST. Les taux de réponse ont été analysés comme critère d'évaluation secondaire.

Je devrai être en mesure de présenter au jury une version soumise pour publication de ce travail que je signerai en tant que co-premier auteur au moment de la soutenance de ma thèse.

# Chapitre 6

## Annexes: Articles en co-auteurs & Brevet

### 6.1 Articles en co-auteurs

#### Résumé des articles présentés en annexe :

Ma thèse s'est déroulée au sein du laboratoire Inserm/SU Instabilité des Microsatellites et Cancer', au sein du CRSA, à l'Hôpital Saint-Antoine. Cette équipe est multidisciplinaire et c'est dans ce contexte que j'ai pu participer à des travaux connexes à ceux dont je suis premier auteur pendant mon doctorat, en collaboration avec d'autres membres de l'équipe. Ces travaux sont tous relatifs à l'étude des cancers MSI et à l'étude de leur génomique, dans une démarche descriptive plutôt fondamentaliste (article 3), ou au contraire plus translationnelle (article 4 et 5).

Brièvement, l'article 3 est une vaste étude pionnière de l'analyse de l'exome tumoral MSI dans le CCR. Il décrit de manière inédite comment l'instabilité du génome dans une série de CCR MSI impacte l'ADN codant et non codant, au niveau de séquences répétées et non répétées. Les résultats sont originaux et mettent particulièrement en perspective comment ces mutations surviennent dans le contexte d'un bruit de fond d'instabilité élevé de ces cancers. Ils suggèrent un modèle de progression tumorale MSI inédit dans lequel de nombreux événements sont sélectionnés positivement mais aussi négativement au cours du développement tumoral, avec des conséquences probablement pro- mais aussi anti-oncogénique dans ce contexte. Ce travail a été publié dans la revue CMGH et à fait l'objet d'un Editorial dans cette revue pour souligner certains points particulièrement originaux de ce travail. J'ai contribué très significativement à la recherche de variants de séquence dans les tumeurs et participé de manière active à sa rédaction.

Dans l'article 4, nous analysons une cohorte de 5 patients avec un cancer MSI métastatique traités par immunothérapie. De manière remarquable, ces patients ont présenté tous une progression de la maladie au niveau de la glande surrénale, proposé de fait comme un site sanctuaire pour la progression de ces tumeurs. J'ai significativement contribué à l'analyse de l'exome des cas inclus dans ce travail qui a été publié dans la revue *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* en 2021.

L'article 5 est relatif à une étude soumise pour publication qui met en avant la mutation de la chaperonne HSP110 dans les cancers gastriques MSI. A l'instar des travaux de l'équipe et d'autres dans les CCR, nos résultats démontrent un impact fonctionnel et clinique majeur de cette mutation somatique chez les patients avec un adénocarcinome gastrique résecable MSI (resGA). En bref, la mutation (délétion somatique due à MSI, de 1 à 6 pb dans l'ADN tumoral) touche un microsatellite intronique T17 situé dans l'intron 8 du gène HSP110. Comme dans le CCR, ces mutations déstabilisent significativement l'épissage du transcrit HSP110 par saut de l'exon 9 dans les ResGA MSI lorsque la taille des délétions somatiques du T17 dépassent une certaine taille ( 4 pb, délétion T17 large). Comme dans les CCR, cette mutation augure la perte de fonction complète de l'onco chaperonne HSP110, avec des effets néfastes sur les capacités de résistance des cellules tumorales au stress cellulaire, notamment lorsqu'il est induit par des drogues pendant les phases de chimiothérapie (sensibilisation des cellules tumorales aux agents utilisés en thérapeutiques comme le FLOT, e.g. 5-Fluorouracil, Oxaliplatine et Docetaxel). De manière encore beaucoup plus marquée que dans le CCR, nous montrons dans ce travail sur une série exceptionnelle de plus de 500 patients avec un ResGA incluant plus de 200 patients avec une tumeur MSI, que l'effet clinique de la mutation sur la réponse au traitement est majeur dans ces conditions. Les données établissent en particulier que la délétion large du T17, observée chez plus de la moitié des malades, permet d'isoler un groupe de patients chez lesquels le pronostic de la maladie est excellent. Dans l'autre groupe de malades avec un ResGA MSI sans mutation HSP110 large, le pronostic de la maladie est à l'inverse très réservé, que les patients aient été traités par chirurgie seule ou avec une chimiothérapie en association. Cette dernière catégorie de malades devraient pouvoir bénéficier de protocoles de traitement mieux adaptés, comme par exemple une immunothérapie d'emblée. J'ai dans ce travail contribué à l'analyse des cribles de recherche de mutations du T17 d'HSP110 sur les cohortes publiques (analyse de l'exome tumoral MSI à cet effet).

### 6.1.1 Article 3: Sélection et contre-sélection des mutations dans la tumorigenèse MSI

Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability

Vincent Jonchere, 1,2, \* Laetitia Marisa, 1,2, \* Malorie Greene, 1, \* Alain Virouleau, 1,3,4 Olivier Buhard, 1 Romane Bertrand, 1 Magali Svrcek, 1,5 Pascale Cervera, 1,5 Anastasia Goloudina, 1,6 Erell Guillerm, 1,7 Florence Coulet, 1,7 Samuel Landman, 1 **Toky Ratovomanana**, 1 Sylvie Job, 2 Mira Ayadi, 2 Nabila Elarouci, 2 Lucile Armenoult, 2 Fatiha Merabtene, 1,8 Sylvie Dumont, 1,8 Yann Parc, 1,9 Jérémie H. Lefèvre, 1,9 Thierry André, 1,10 Jean-François Fléjou, 1,5 Agathe Guilloux, 3,4,§ Ada Collura, 1,§ Aurélien de Reyniès, 2,§ and Alex Duval 1,§

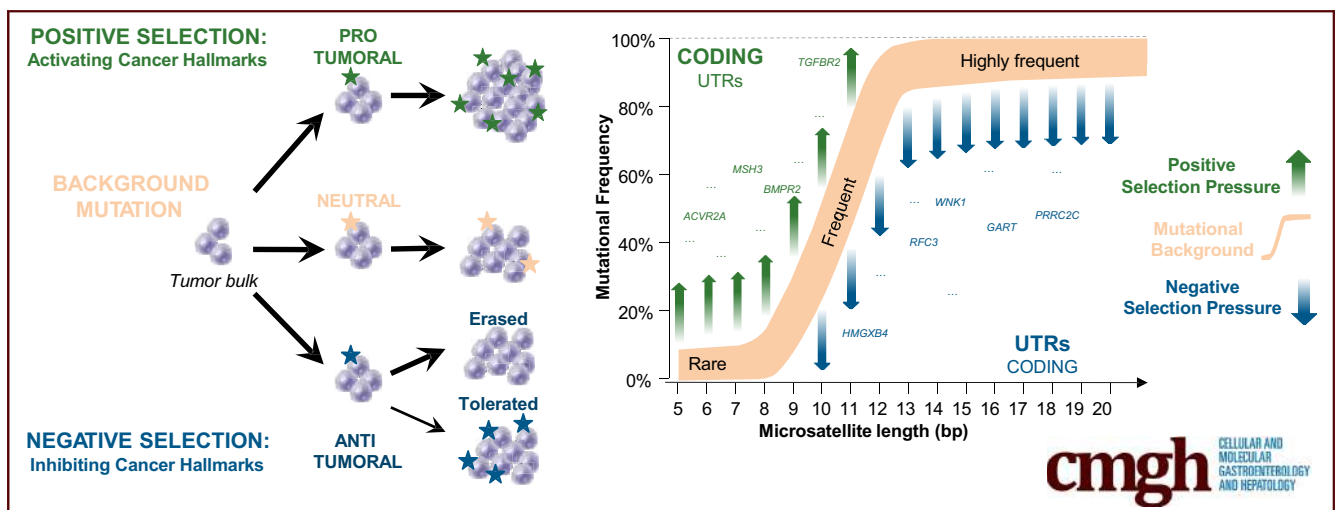
## ORIGINAL RESEARCH

## Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability



Vincent Jonchere,<sup>1,2,\*</sup> Laetitia Marisa,<sup>1,2,\*</sup> Malorie Greene,<sup>1,\*</sup> Alain Virouleau,<sup>1,3,4</sup> Olivier Buhard,<sup>1</sup> Romane Bertrand,<sup>1</sup> Magali Svrcek,<sup>1,5</sup> Pascale Cervera,<sup>1,5</sup> Anastasia Goloudina,<sup>1,6</sup> Erell Guillerm,<sup>1,7</sup> Florence Coulet,<sup>1,7</sup> Samuel Landman,<sup>1</sup> Toky Ratovomanana,<sup>1</sup> Sylvie Job,<sup>2</sup> Mira Ayadi,<sup>2</sup> Nabila Elarouci,<sup>2</sup> Lucile Armenoult,<sup>2</sup> Fatiha Merabtene,<sup>1,8</sup> Sylvie Dumont,<sup>1,8</sup> Yann Parc,<sup>1,9</sup> Jérémie H. Lefèvre,<sup>1,9</sup> Thierry André,<sup>1,10</sup> Jean-François Fléjou,<sup>1,5</sup> Agathe Guilloux,<sup>3,4,§</sup> Ada Collura,<sup>1,§</sup> Aurélien de Reyniès,<sup>2,§</sup> and Alex Duval<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, University Pierre and Marie CURIE Paris 06, INSERM, Unité Mixte de Recherche 938, Equipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France; <sup>2</sup>Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Mathématiques et Modélisation d'Évry, University Évry, Évry, France; <sup>4</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Saclay, Evry, France; <sup>5</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>6</sup>Inovation, Collaborative research Department Paris, France; <sup>7</sup>Genetics Department, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, Pitié Salpêtrière Hôpital, Paris, France; <sup>8</sup>University Pierre and Marie CURIE Paris 06, Unité Mixte de Service 30 L'Unité Mixte de service Imagerie Cytométrie, Plateforme d'Histomorphologie, Sorbonne Université Paris, France; <sup>9</sup>Service de Chirurgie Générale et Digestive, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>10</sup>Department of Oncology, Assistance publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Antoine, Paris, France



## SUMMARY

Recent studies have shown that cancers arise as a result of the positive selection of driver somatic events in tumor DNA, with negative selection playing only a minor role, if any. The present work indicates that in microsatellite instability cancer, the high level of genomic instability generates both positively selected somatic mutations that contribute to the tumorigenic process but also recurrent somatic mutational events that are negatively selected due to their deleterious for the tumor cells.

**BACKGROUND & AIMS:** Recent studies have shown that cancers arise as a result of the positive selection of driver somatic events in tumor DNA, with negative selection playing only a minor role, if any. However, these investigations were concerned with alterations at nonrepetitive sequences and did not take into account mutations in repetitive sequences that have very high pathophysiological relevance in the tumors showing microsatellite instability (MSI) resulting from mismatch repair deficiency investigated in the present study.

**METHODS:** We performed whole-exome sequencing of 47 MSI colorectal cancers (CRCs) and confirmed results in an



independent cohort of 53 MSI CRCs. We used a probabilistic model of mutational events within microsatellites, while adapting pre-existing models to analyze nonrepetitive DNA sequences. Negatively selected coding alterations in MSI CRCs were investigated for their functional and clinical impact in CRC cell lines and in a third cohort of 164 MSI CRC patients.

**RESULTS:** Both positive and negative selection of somatic mutations in DNA repeats was observed, leading us to identify the expected true driver genes associated with the MSI-driven tumorigenic process. Several coding negatively selected MSI-related mutational events ( $n = 5$ ) were shown to have deleterious effects on tumor cells. In the tumors in which deleterious MSI mutations were observed despite the negative selection, they were associated with worse survival in MSI CRC patients (hazard ratio, 3; 95% CI, 1.1–7.9;  $P = .03$ ), suggesting their anticancer impact should be offset by other as yet unknown oncogenic processes that contribute to a poor prognosis.

**CONCLUSIONS:** The present results identify the positive and negative driver somatic mutations acting in MSI-driven tumorigenesis, suggesting that genomic instability in MSI CRC plays a dual role in achieving tumor cell transformation. Exome sequencing data have been deposited in the European genome–phenome archive (accession: EGAS00001002477). (*Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;6:277–300; <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.06.002>)

**Keywords:** Colorectal Cancer; Microsatellite Instability; Tumorigenic Process; Driver Gene Mutations; Positive and Negative Selection.

See editorial on page 349.

Acquisition of the multiple hallmarks of cancer mainly is owing to somatic mutations. These hallmarks are a convenient organizing principle to rationalize the growth and complexity of tumors (for review, see Hanahan and Weinberg<sup>1</sup>). Underlying these mutations is the characteristic of genomic instability. This leads to the generation of mutant genotypes that confer advantages or disadvantages to the cells in which they occur, thus allowing the cells to dominate or to involute within the tumor mass.<sup>2</sup> Data obtained from the analysis of thousands of tumors from different primary sites have shown that unlike species evolution, positive selection outweighed the negative selection of somatic mutational events during tumor progression.<sup>3,4</sup>

Different types of genomic instabilities have been described in human malignancies, including a subset of cancers that is characterized by inactivating alterations of mismatch repair (MMR) genes.<sup>5–7</sup> These tumors show a distinctive phenotype referred to as microsatellite instability (MSI). MSI affects thousands of microsatellite DNA sequences, although numerous alterations also occur in nonrepetitive DNA sequences during tumor progression. This phenotype was first observed in tumors from individuals with the familial cancer condition known as Lynch syndrome, and later in sporadic colon, gastric, endometrial, and other cancer types.<sup>8–10</sup> The activating *BRAF* V600E


somatic hotspot mutation,<sup>11</sup> affecting a nonrepetitive coding DNA sequence, plays an important role in the progression of sporadic MSI colorectal cancer (CRC). However, most somatic mutations with a postulated role in MSI tumorigenesis are found in microsatellites contained within coding regions, and to a much lesser extent in microsatellites contained within noncoding gene regions (eg, intronic splicing areas, or in the 5' UTR or 3' UTR).<sup>12</sup> Because microsatellites constitute hot spots for mutations in MSI tumors regardless of their location in genes and the function of these genes, such frequent mutations could be neutral or even detrimental to tumorigenesis.<sup>13,14</sup> In accordance with this working hypothesis, we previously reported frequent inactivation of the *HSP110* oncogenic chaperone in MSI CRC.<sup>15–18</sup>

Recent advances in high-throughput sequencing have made it possible to identify all genetic changes in human MSI neoplasms. Kim et al<sup>12</sup> reported a global view in 27 colon and 30 endometrial tumors with the MSI phenotype. With regard to the selection of MSI-driven events, these investigators did not take into account the strong influence of the length and nature of DNA repeats on the frequency of their instability, as shown earlier by several groups.<sup>14,19,20</sup> Furthermore, nucleotide instability outside of DNA microsatellites was not investigated, even though this is an important part of the landscape of somatic changes in MSI CRC.<sup>21</sup> Other studies have attempted to identify driver genes containing selected mutations, or to use various probabilistic models of unselected mutations in MSI CRC while ignoring negative selection, which is more difficult to establish.<sup>8,22</sup> A recent study reported that tumors with a mutator phenotype (including MMR-deficient cancers) acquired more positively selected driver mutations than other tumors, but found no evidence of negative selection.<sup>3</sup> The latter study investigated substitutions at nonrepetitive sequences, without taking into account repetitive sequences that have high physiopathologic relevance in these tumors.

In the present study we performed whole-exome sequencing (WES) of 47 MSI CRCs and validated results in an independent series of 53 MSI CRCs from the The Cancer Genome Atlas (TCGA). Overall, our results shed new light on MMR-deficient tumorigenesis and suggest that genomic instability in MSI CRC plays a dual role in achieving tumor cell

\*Authors share co-first authorship; §Authors share co-senior authorship.

**Abbreviations used in this paper:** bp, base pair; CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio; indel, insertion/deletion; MLH1, MutL Homolog 1; MMR, mismatch repair; mRNA, messenger RNA; MSH, MutS Homolog; MSI, microsatellite instability; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; NR, nonrepetitive; R, repetitive; RFS, relapse-free survival; RTCA, Real-Time Cell Analyzer; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA; UTR, untranslated region; WES, whole-exome sequencing; WGA, whole-genome amplification.

 Most current article

© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the AGA Institute. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2352-345X

<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.06.002>

transformation. They show hitherto unknown pathophysiological aspects of MSI colon tumors that could lead to novel therapeutic approaches specific for this tumor subtype.

## Materials and Methods

### *Tumor Cohort of MSI CRC Patients Analyzed by WES*

Forty-seven patients who underwent surgical resection for MSI CRC from the Hôpital Saint Antoine (Paris, France) were selected for this study. Tumor samples and adjacent normal tissue counterparts were collected and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  before DNA extraction. DNA was purified using the Qiamp protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France) as recommended by the manufacturer. Informed consent was obtained for all patients. Gene expression for 30 samples from this cohort was analyzed previously on the Affymetrix U133 plus 2 chips as described (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).<sup>23</sup>

### *Tumor Cohort of MSI CRC Patients for Survival Analysis*

A total of 164 MSI CRC samples with available whole-genome amplification (WGA) DNA were analyzed further for association between MSI mutational events and relapse-free survival (RFS).<sup>16</sup>

### *Exome Data Analyses*

**WES.** For the 47 pairs of MSI CRC and paired adjacent normal mucosa, 3  $\mu\text{g}$  of genomic DNA was fragmented by sonication and purified to obtain fragments of 150 to 200 base pairs (bp). The oligonucleotide adapters for sequencing were ligated to DNA fragments and purified. After purification, exonic sequences were captured by hybridizing the sequences to biotinylated exon library baits, which then were captured with streptavidin-coated magnetic beads that complex with biotin (SureSelect Human All Exon Kit v5+UTR, 75 Mb; Agilent, Les Ulis, France). The eluted fraction then was amplified by 4–6 polymerase chain reaction (PCR) cycles and sequenced on an Illumina HiSeq 2000 sequencer as paired-end 75 bp (San Diego, CA). Image analysis and base calling were performed using the Illumina Real-Time Analysis Pipeline version 1.14 with default parameters. Read-sequence Fastq files were generated and quality control was checked following Illumina's recommendations and FastQC reports.

**Overall mutation (single-nucleotide variant and insertion/deletion) calling.** The exome data analysis was first performed using Illumina CASAVA 1.8.2 software (San Diego, CA), which includes reads mapping and variant calling. Exome sequencing data have been deposited in the European genome-phenome archive (accession: EGAS00001002477). Reads were aligned against the hg19 genome build (GRCh37 - Human genome assembly 19) with ELANDv2, a gapped and multiseed aligner that reduces artifactual mismatches and allows the identification of small insertions/deletions (indels) ( $\leq 10$  nucleotide), which is mandatory for analyzing microsatellite instability. Casava then detects single-nucleotide variants and indel variants

independently in the tumor and normal samples. To distinguish somatic from germline variants, the results are combined and a Fisher test for base distribution between normal and tumor DNA is computed. We then applied a previously described method<sup>24</sup> to generate a list of somatic variants. Quality control filtering removed variants sequenced in  $<10$  reads, with  $<3$  variant calls or with a Quality-Phred of  $<20$ . Variants were considered to be of somatic origin when the frequency of variant reads was  $\geq 10\%$  in the tumor and  $<5\%$  in the normal counterpart, with significant enrichment of variant calls in the tumor as assessed by the Fisher exact test ( $P < .05$ ). Variants then were annotated with Annovar for gene symbol, gene structure location, and exonic functional impact using the RefGene database (hg19 version). Common polymorphisms with a reported frequency of  $>1\%$  were removed after comparison with the 1000 Genomes Project database and a proprietary database of exomes from normal tissues. Variants were functionally annotated using the annotations provided by Annovar based on the LJB databases (include SIFT scores, PolyPhen2 HDIV scores, PolyPhen2 HVAR scores, LRT scores, MutationTaster scores, MutationAssessor score, FATHMM scores, GERP++ scores, PhyloP scores, and SiPhy scores). When the annotation was not provided, PolyPhen2, Sift, and Provean software were used. If at least one of the methods defined the mutation as damaging, the mutation was annotated as deleterious. The mutation incidence in each tumor was evaluated by dividing the number of somatic mutations by the number of exonic bases covered by  $\geq 10\times$  in both the tumor and normal samples. Mutations were classified into nonrepetitive (NR) and repetitive (R) sequences using the microsatellite list defined with MSIsensor (see later).

**Mutation calling in microsatellite sequences.** To analyze mutations extensively at microsatellite sequence sites, we used the software MSIsensor<sup>25</sup> version 0.2, a program for detecting somatic microsatellite changes. First, the list of microsatellites was generated using the scan command of MSIsensor, which searches for sequences of 1–5 bases repeated at least 5 times in the human reference genome sequence (NCBI build37.1 genome fasta file). Then, using the MSIsensor msi command, the mutation status for each microsatellite site (with  $\geq 20$  mapped reads) and each tumor/normal tissue pair was estimated by comparing the read-length distribution between tumor and normal samples using the chi-square test.  $P$  values for each microsatellite were extracted from MSIsensor outputs and used to define the microsatellite mutation status (if  $P < .05$ , the microsatellite was considered to be mutated). Each microsatellite was annotated for gene symbol and gene region type location (exonic, intronic, 5' UTR, and 3' UTR) using Annovar, according to the RefGene database (hg19 version). **Driver mutation selection in nonrepetitive sequences.** Casava mutation (SNV and indel) calling results in coding regions was defined by Annovar and outside repetitive sequences. We applied MutSigCV (v1.4) and Intogen online software with default parameters. Many genes previously published as potential drivers in MSI CRC were not found with those 2 gold standard methods. To allow

recovering these genes, we implemented a simpler method: intrasample binomial laws are fitted to report the different probabilities of mutation from one sample to another; given a sequence, its probability to be mutated at least once is calculated in each sample according to the corresponding binomial law; these probabilities then are combined across samples using the Fisher combined probability test. The resulting statistics then are compared with an empiric null distribution drawn using intronic and synonymous mutations.

**Driver mutation selection in repetitive sequences.** For each repeat  $i = 1, \dots, n$  ( $7 \times 10^5 \leq n \leq 3 \times 10^6$ ), we observed the following: a count  $Y_i$  with values in  $[0, n_i]$ , where  $n_i$  is the number of observed tumor samples for this repeat, and the repeat length  $x_i$  (with values from 5 to 27). We tried logistic models on the data but they miss fitting our data well enough for 2 reasons: the observed mutation proportion for 1 repeat never goes to 1, and we observed overdispersion as compared with the logistic model. We consequently added the parameter  $\alpha$  to adjust for the first observation and chose a 2 layer-model to model the overdispersion.<sup>26</sup> The model contained 2 layers. In the first layer, let  $\pi_i = \frac{\exp(\alpha + \beta_0 + \beta_1 x_i)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_i)}$  and  $\tilde{\pi}_i \sim \beta(\pi_i c, (1 - \pi_i)c)$ , where  $\beta$  stands for the  $\beta$  distribution. The random variable  $\pi_i$  has moments equal to  $E(\tilde{\pi}_i) = \pi_i := \frac{\exp(\alpha + \beta_0 + \beta_1 x_i)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_i)}$ , and  $V(\tilde{\pi}_i) = \pi_i(1 - \pi_i)$  with  $c = (\pi_i^{-1} - 1)$ . In the second layer, the distribution of  $Y_i$  conditionally to  $\tilde{\pi}_i$  is  $B(n_i, \tilde{\pi}_i)$ , the joint distribution of  $(Y_i, \tilde{\pi}_i)$  then is proportional to  $\tilde{\pi}_i^{y_i} (1 - \tilde{\pi}_i)^{n_i - y_i} \tilde{\pi}_i^{\pi_i c - 1} (1 - \tilde{\pi}_i)^{(1 - \pi_i)c - 1}$ . The marginal distribution of  $Y_i$  then is proportional to  $\frac{1}{B(\pi_i c, (1 - \pi_i)c)}$ , where  $B(u, v)$  is the  $\beta$  function at points  $u$  et  $v$ . The marginal distribution of  $Y_i$  then is proportional to  $\frac{B(y_i + \pi_i c, n_i - y_i + (1 - \pi_i)c)}{B(\pi_i c, (1 - \pi_i)c)} = \frac{\Gamma(\pi_i c + (1 - \pi_i)c) \Gamma(y_i + \pi_i c) \Gamma(n_i - y_i + (1 - \pi_i)c)}{\Gamma(\pi_i c) \Gamma((1 - \pi_i)c) \Gamma(n_i + \pi_i c + (1 - \pi_i)c)}$ , where  $\Gamma$  is the gamma function. The log-likelihood term  $\log f(y_i; c, \alpha, \beta_0, \beta_1)$  for individual  $i$  then equals  $(\log(\Gamma(y_i + \pi_i c)) - \log(\Gamma(\pi_i c))) + (\log \Gamma(n_i - y_i + (1 - \pi_i)c) - \log(\Gamma((1 - \pi_i)c))) - \log(\Gamma(n_i + c)) - \log(\Gamma(c))$  up to a constant (depending on  $y_i$  and  $n_i$ ).

To take into account the presence of outliers in the data, a parameter  $v_i$  was added in the probability  $\pi_i$ , in the same fashion as described by Tibshirani and Manning,<sup>27</sup> which becomes  $E(\tilde{\pi}_i) = \frac{\exp(\alpha + \beta_0 + \beta_1 x_i + v_i)}{1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_i + v_i)}$ . To overcome the high dimensionality of our model, we added a lasso penalty.<sup>27</sup> The optimization problem to solve is as follows:  $\min_{c, \alpha, \beta_0, \beta_1, v_1, \dots, v_n} -\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log f(y_i; c, \alpha, \beta_0, \beta_1, v_1) + \lambda \|v\|_1$ . It is performed through a proximal-stochastic gradient descent (see Bertsekas<sup>28</sup>). All algorithms were developed in Python 3.5 and are available on request. The regularization parameter  $\lambda$  in the lasso usually is chosen through cross-validation. However, in our context, this technique does not seem relevant. Hence, cross-validation techniques split the data in training and testing sets, fitting the model on the training set and measure its performance on the testing set, across a grid of tuning parameters to choose the best. The problem here is that we obviously cannot learn the outlyingness of an observation thanks to other observations. In other words, what we learn in the training parts is not useful for the testing parts. Moreover, the result of the

cross-validation would highly depend on how the outliers are distributed in the sets. Therefore, we used a heuristic technique of the L-curve, allowing us to choose a  $\lambda$ , providing us with a high likelihood together with control of the number of outliers. Once the hyperparameters  $\alpha, \beta_0$  and  $\beta_1$  were estimated, Pearson residuals<sup>29</sup> were calculated for each repeat. We then applied the Benjamini Hochberg Yekutieli multitest procedure to detect significantly large residuals. Repeats with detected residuals were finally assigned to the positively selected, respectively the negatively selected when their associated residuals were negative, respectively positive.

**Functional analysis in CRC cell lines and primary colon tumor samples.** To analyze for the enrichment of genes belonging to specific biological processes (Gene ontology), mutated genes that were positively or negatively selected were analyzed using DAVID<sup>30</sup> against the *Homo sapiens* database ( $P < .05$ ; number of genes,  $\geq 5$ ).

CRC cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C supplied with 5% CO<sub>2</sub>. All cell lines were mycoplasma free. Primary tumors and normal colon tissues were obtained from patients with CRC undergoing surgery at the Hospital Saint-Antoine between 2009 and 2014 and after informed patient consent was obtained and approval from the Institutional Review Boards/Ethics Committees of Hospital Saint-Antoine (Paris, France). Patients with CRC (1998–2007) from 6 centers involved in a study of MSI status were described previously.

### Mutation Analysis

Specific primers for exonic coding of DNA repeats of negatively selected gene mutations were designed using AmpliX software (V1.7). PCR amplification was performed on tumor DNA amplified by WGA technology using the Illustra GenomIphi DNA Amplification V2 kit (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Absence of artifactual alteration of microsatellite sequences caused by WGA was validated by comparing Amplified Fragment-Length Polymorphism traces of several long microsatellites before and after WGA on a 3100 GA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Fluorescent PCR products were run on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer with GS400HD ROX size standard and POP-6 polymer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), and Gene mapper software (V4.0, ThermoFisher Scientific) was used to analyze negatively selected mutations in exonic microsatellite traces (Applied Biosystems, Foster City, CA). Oligonucleotide sequences are available on request.

### Transient Gene Silencing by Cell Transfection and Treatments

A total of  $1.25 \times 10^5$  cells were cultured in a 6-well plate for 24 hours. Cells then were transfected with Silencer Select (ThermoFisher Scientific) small interfering RNAs (siRNAs) (2 targets per gene) using Lipofectamine RNAiMax according to the manufacturer's recommendations

(ThermoFisher Scientific). siRNA inhibition was assessed 48 hours after transfection by real-time quantitative PCR (ThermoFisher Scientific). To induce apoptosis, 48 hours after transfection the cells were treated with TRAIL agent (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) for 3 hours at 50 ng/mL (FET) or for 4 hours at 30 ng/mL (HCT116), 100 ng/mL (SW480, RKO, and SW620), and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### *Analysis of Cell Apoptosis*

Apoptosis was analyzed by flow cytometry using an Annexin V–fluorescein isothiocyanate and 7-amino-actinomycin D staining kit (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA) 48 hours after transfection. Cells were detached using StemPro Accutase cell dissociation reagent at room temperature for 10 minutes and stained with reagents according to the manufacturer's recommendations. Each sample was evaluated by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter, Inc). Data were analyzed using Kaluza Flow Analysis Software (Beckman Coulter, Inc).

### *Real-Time Cell Proliferation, Migration Monitoring, and Data Analysis*

HCT116 cells were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/well into E-plate 16 (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA) and monitored on the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual Plate instrument (ACEA Biosciences, Inc) according to the manufacturer's instructions. Cell proliferation was assessed by electrodes in chambers and impedance differences within an electrical circuit were monitored by the RTCA system every 15 minutes for up to 50 hours. Cell migration was assessed using a CIM plate device of the xCELLigence system. The CIM plate consists of 2 chambers separated by a microporous membrane (pore size, 8  $\mu$ m) attached to microelectrodes. In this case, the cell index calculated on the basis of impedance measurements reflects the number of cells that migrate through micropores monitored by the RTCA system every 15 minutes for up to 50 hours. These differences are converted into a cell index. The baseline cell index is determined by subtracting the cell index for a cell-containing well from the cell index of a well with only culture media. The experiments were performed in triplicate and repeated at least 3 times. The cell index was expressed as the means  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments.

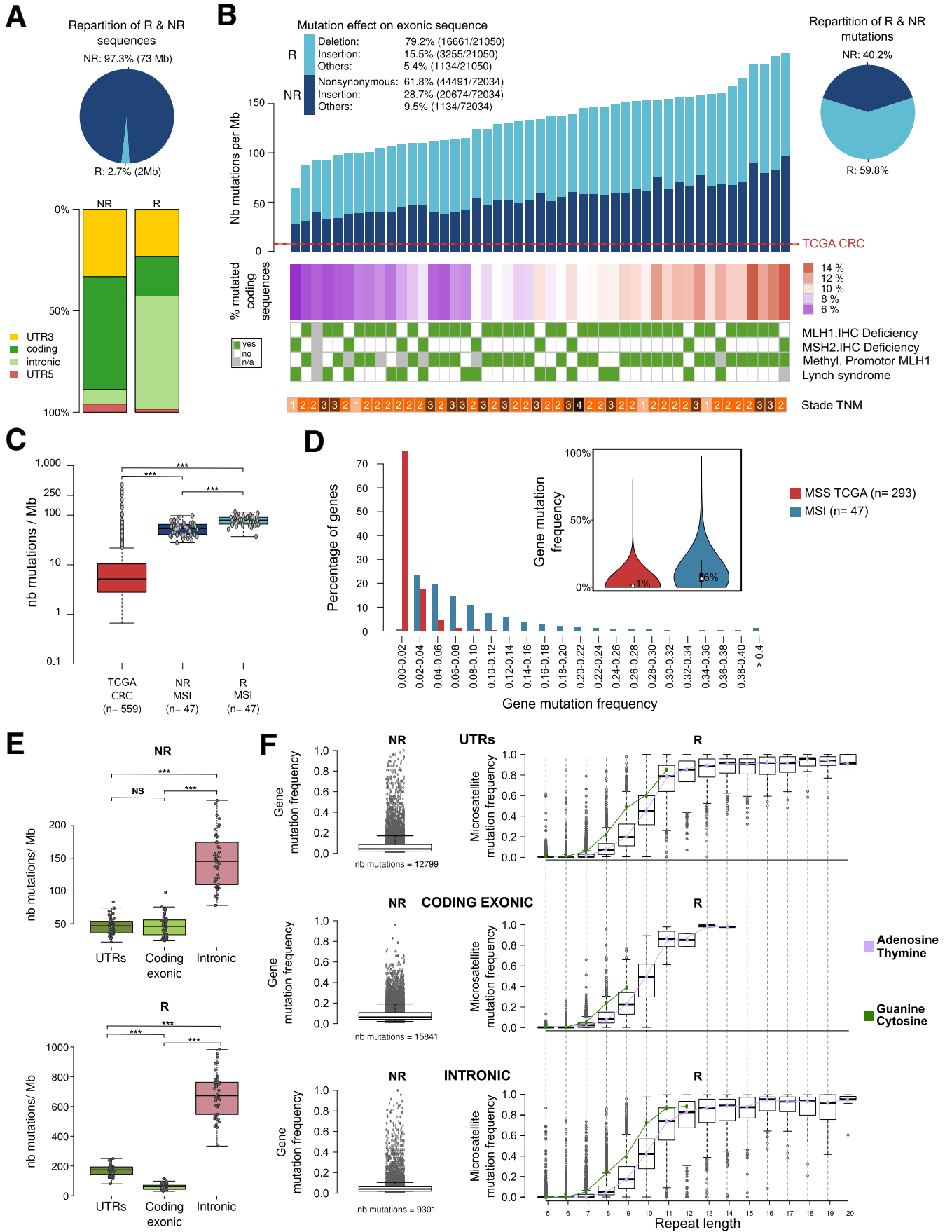
### *Transfection With Short Hairpin RNAs and Xenografts*

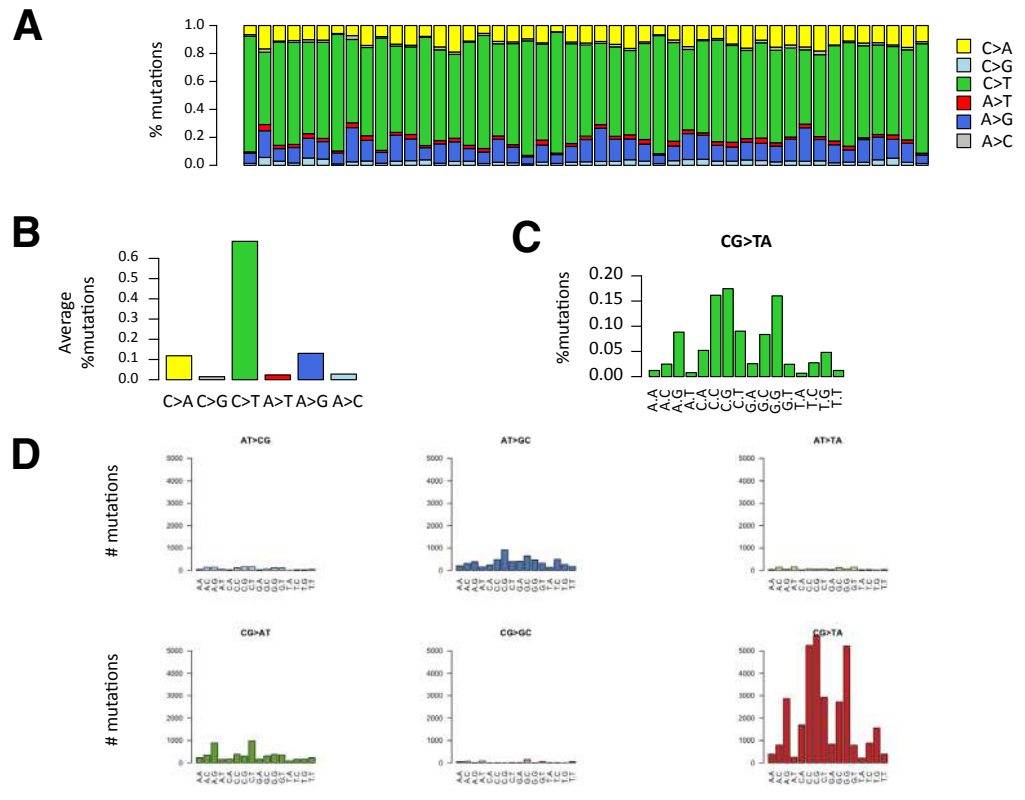
Cloning of the pEBV (Epstein-Barr Virus plasmid) siRNA vectors and establishment of silenced cells were performed as described previously.<sup>31</sup> We used the DSIR program (Designer of Small Interfering RNA) to design short hairpin RNA (shRNA) sequences to target the *WNK1* and *PRRC2C* genes. RNA interference sequences targeting the genes are available on request. Cells carrying the pBD650 plasmid that expressed a scrambled shRNA sequence were used as a control. Cells were plated 24

hours before transfection with Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours later, the cells were trypsinized and seeded in culture medium supplemented with hygromycin (125  $\mu$ g/mL for the HCT116 cell line or 250  $\mu$ g/mL for the SW480 cell line). After 2 weeks, gene silencing was monitored by reverse-transcription quantitative PCR analysis. Ten million HCT116 or SW480 cells transfected with shRNA were injected subcutaneously into the flank of female nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) at 6 weeks of age. Tumor size was measured with a caliper every 2 days over 30 (HCT116 cell line) or 28 (SW480 cell line) days. Mice were killed when the tumors reached 1500 mm<sup>3</sup>. The mice were treated according to guidelines from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). Statistical methods to predetermine sample size in mice experiments were not used and the experiments were not randomized. During experiments and outcome analysis, the animal group allocations were not blinded. All experiments were conducted according to the European Communities Council Directive (2010/63/UE) for the care and use of animals for experimental procedures and complied with the regulations of the French Ethics Committee in Animal Experiment (committee: Charles Darwin) registered at the Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (Ile-de-France, Paris, France). All procedures were approved by this committee. All experiments were supervised by an author (A.C.) and all efforts were made to minimize suffering.

### *Immunohistochemistry*

Briefly, 4- $\mu$ m-thick sections of paraffin-embedded tissue samples were cut onto silane-treated Super Frost slides (CML, Nemours, France) and left to dry at 37°C overnight. Tumor sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in pure ethanol. Before immunostaining, antigen retrieval was performed by immersing sections in citrate buffer, pH 6.0 (WNK1) (15 min at 95°C), washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) for 3 minutes, and treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS for 15 minutes to inhibit endogenous peroxidases. After washing in PBS, slides were saturated for 25 minutes in 3% bovine serum albumin PBS. Sections then were incubated for 1 hour at room temperature with antibody to WNK1 (dilution 1/100; clone ab128858; Abcam, Cambridge, United Kingdom). After washing in PBS, secondary antibody (8114P; Cell Signaling, Danvers, MA) was added for 30 minutes at room temperature. Slides were washed twice for 5 minutes in PBS and shown using the Novared kit (Vector, Burlingame, CA). Slides were washed twice in water for 5 minutes and counterstained with 10% Meyer's hematoxylin. After 1 wash in water, slides were dehydrated in 100% ethanol and in xylene for 30 seconds each. Apoptosis was quantified by counting the number of labeled cells with anti-caspase 3 antibody per 100 tumor cells in the most affected areas.





**Figure 2. NR mutation types.** (A) Distribution of mutation substitution types within the sample. (B) Average proportion across the sample of each transition type. (C) Frequency of C to T mutations according to the flanking base. (D) Distribution of the number of mutations according to the flanking bases for each type of base substitutions.

**Survival Analysis**

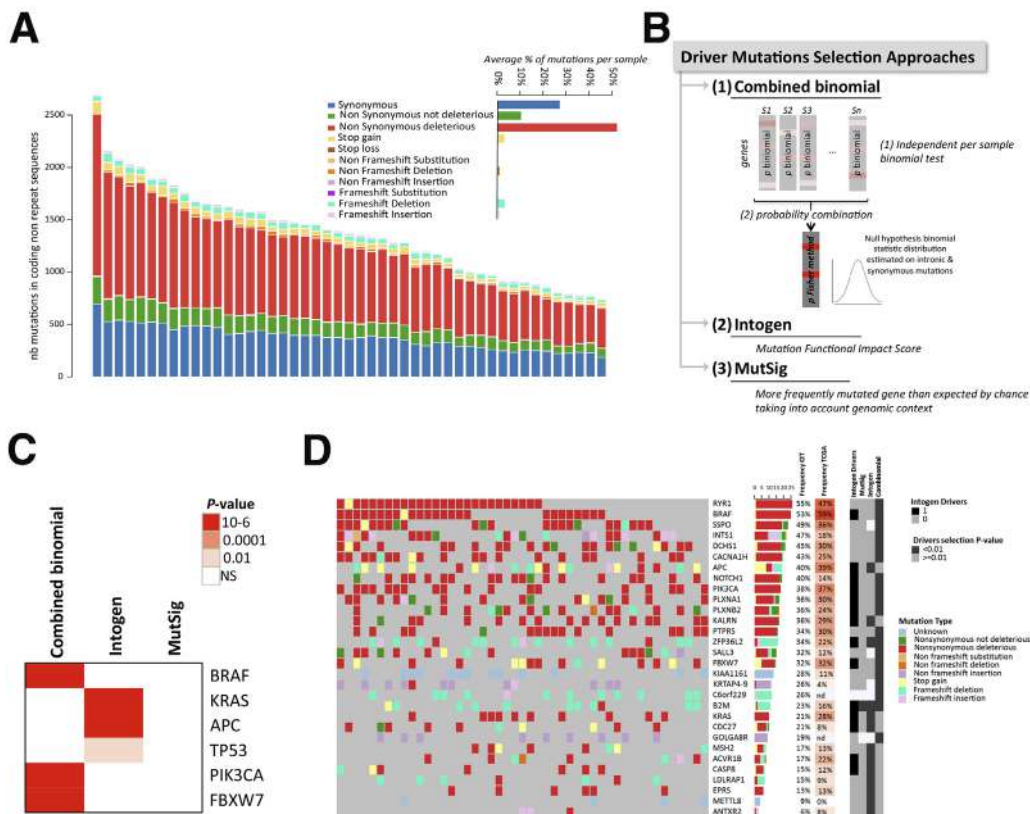
In the cohort of 164 MSI CRC patients, the association between mutations and survival was assessed by multivariate Cox proportional-hazards regression analyses and adjusted by TNM stage. This was performed for 5 negatively selected target MSI mutations. This also was performed for a Boolean mutational index that was calculated from the mutational status of the 5 target genes in each tumor sample. The proportional-hazards assumption was tested using the *cox.zph* function. RFS was used and defined as the time from diagnosis to first relapse time or death from a cancer cause only. The cut-off point for statistical significance was .05.

**Results**

**Exome-Wide Analysis of MMR-Deficient CRC: Genomic Instability at Nonrepetitive and Repetitive DNA Sequences**

We examined WES data from 47 primary MMR-deficient CRCs defined as having MSI according to international criteria.<sup>32,33</sup> The genome fraction covered by WES was 75 MB, including UTR (37%), coding exonic (56%), and intronic (7%) regions. Repetitive DNA sequences represent less than 3% of the genome fraction covered by WES (roughly 2 Mb of 75 Mb), with 56% in intronic, 19% in coding exonic, and 25% in UTR regions (Figure 1A). Computational methods were used to

**Figure 1. (See previous page). Genetic instability in MMR-deficient CRC.** (A) Pie chart represents the portion of R (light blue) and NR (dark blue) sequences. Bar plots represent the distribution of the 5 genomic region types (3' UTR, coding exonic, intronic, 5' UTR) captured by WES in R (light blue) and NR (dark blue) sequences. (B) Bar plot of the number of mutations per captured megabase (Nb mutations/Mb) across the whole exome for 47 MSI tumors in R sequences (light blue) and in NR sequences (dark blue). The median mutation rate in all types of CRC was described previously<sup>25</sup> and is indicated by the red dotted line. The heatmap below shows the percentage of mutated genes in coding R and NR sequences. (C) Box plots show the number of mutations per megabase (log<sub>10</sub> scale) in all types of CRCs from the TCGA colon adenocarcinoma data set (red), in MSI CRC within R sequences (light blue), and in MSI CRC within NR sequences (dark blue). Grey dots indicate the mutation frequencies for each MSI tumor. The results of the *t* test between groups were as follows: \*\*\**P* < .001. (D) Bar plot of the percentage of genes with different mutation frequencies for MSI (blue) and microsatellite stable (MSS) (red) CRCs. (E) Box plots represent the number of mutations per megabase for 3 genomic regions (UTRs, coding exonic, intronic). Grey dots represent the value for individual tumors (n = 47). The results of the *t* test between groups were as follows: \*\*\**P* < .001. (F) The mutation frequencies of 3 gene regions (UTRs, coding exonic, intronic) are shown, where grey dots represent each individual mutation in NR (left) and R (right) sequences. Mutation frequencies in R sequences are shown according to the microsatellite length and nucleotide composition (colored dots and lines). IHC, immunohistochemistry.

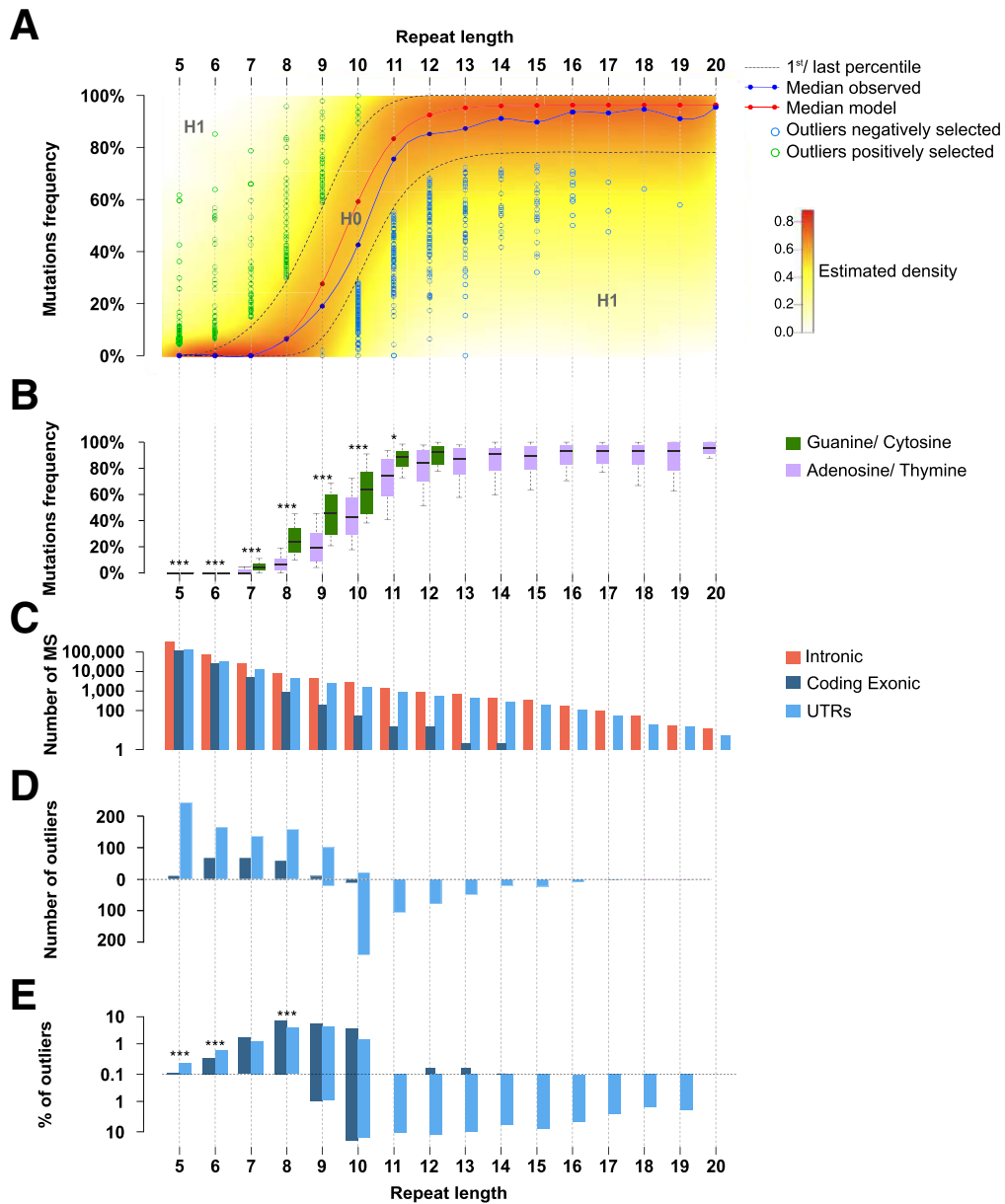


**Figure 3. Identification of candidate driver genes with mutations in NR sequences.** (A) Distribution of mutation types in coding NR regions according to their functional impact (annotation tool Annovar). The functional impact was based on several methods, with a mutation considered as deleterious if at least 1 of those methods estimated it to be deleterious. The average percentage of each mutation type per sample is shown in the *inset*. (B) Schematic representation of the 3 methods (MutSigCV, Intogen, combined binomial) used in this study to identify driver mutations (see the Methods section for details). (C) Heatmap of the significance (q values) of mutated genes commonly described for their functional impact in MSI CRC using Intogen, combined binomial, and MutSigCV analyses. (D) Oncoprint representation of mutations in coding NR sequences within each sample for the 25 top significantly mutated genes (indicated in darker grey for each approach on the side annotation heatmap) and for the 5 significant genes considered as driver genes by Intogen (indicated in black on the side annotation heatmap) across samples. *Top* and *side bar plots* indicate the percentage of each type of mutation within the sample and within the gene, respectively.

identify somatic mutation events at both NR and R DNA sequences (see the [Methods](#) section for further details). Investigations were restricted to mononucleotide R sequences because these are the most frequently affected by somatic mutations in MMR-deficient cells and often are located in coding regions or in noncoding UTR sequences endowed with putative functional activity.<sup>12</sup> Repeats of at least 5 nucleotides in length were considered, in accordance with the definition of DNA microsatellite sequences. Mutations in R and NR sequences occurred in similar proportions, representing on average 60% and 40% of all somatic events, respectively (Figure 1B). These mutations accumulated in parallel in MSI tumor samples (Figure 1B) ( $P = 2.47 \times 10^{-14}$ ;  $R = 0.85$ ). Relative to the fraction of covered genome, the mutation rate observed in R sequences was approximately 24-fold higher than in NR sequences, expectedly. No significant differences were observed between MSI CRC from Lynch syndrome and sporadic cases, or between tumors with different TNM stages (Figure 1B). A much higher number of mutations

was observed in this MSI colon tumor cohort compared with the overall incidence of mutations reported for all CRCs<sup>34</sup> (Figure 1C). This high rate of mutation resulted in a much higher proportion of genes with mutations in coding regions (6% vs 1%) (Figure 1D).

Mutation frequencies also were evaluated in coding, UTR, or intronic regions (Figure 1E and F). For both NR and R sequences, a significantly higher mutation frequency was observed in intronic compared with coding exonic and UTR regions of the tumor genome (Figure 1E), expectedly. We confirmed at the exome scale that both the length and composition amino acid constitution of these DNA repeats (A/T vs C/G) determine their mutational frequency (Figure 1F). There was almost 100% probability of mutation if the microsatellite repeat length was longer than 14 bp, consistent with previous results.<sup>13,14,20</sup> Mutation events also were more frequent in G/C nucleotide repeats compared with A/T repeats. These observations indicated that distinct models are needed to analyze the occurrence of mutations in R and NR sequences in MMR-deficient tumors.



**Figure 4. Positive and negative selection in repetitive sequences in MSI CRC.** (A) Distribution model of mutation frequencies across samples in microsatellites in UTRs or coding exonic regions according to repeat length for A/T nucleotides. The color gradient indicates the density of the  $\beta$ -binomial logistic regression model. The *blue curve* represents the median of observed mutation frequencies, and the *red curve* represents the median obtained from the model. This figure shows the statistical model and outliers for adenosine/thymine. (B) *Box plot* representation of mutation frequency variations according to the nucleotide composition of the microsatellite and to the repeat length. The significant independence of the chi-squared distribution is annotated by asterisks as follows: \* $P < .05$ , and \*\*\* $P < .001$ . (C) Distribution of microsatellite mutations ( $\log_{10}$  scale) in the 3 gene regions (UTRs, coding exonic, and intronic) according to repeat length. (D) Distribution of outlier mutation in microsatellites contained in UTRs and in coding exons. Positively and negatively selected microsatellite mutations are represented above and below the *dotted line*, respectively. (E) Distribution of the percentage of outlier mutations ( $\log_{10}$  scale) according to repeat length. The significant independence of the chi-squared distribution is annotated by asterisks, as follows: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , and \*\*\* $P < .001$ .

*Modeling the Occurrence of Mutations in Coding, Nonrepetitive DNA Sequences Identifies Known and New Actors in MSI Colorectal Tumorigenesis*

As shown in [Figure 1](#), MSI colon tumors accumulate somatic mutations in R and NR DNA sequences at

similar proportions. For NR sequences, the analysis of nucleotide substitutions in MSI tumors is shown in [Figure 2](#). In coding sequences, they mostly consisted of nonsynonymous nucleotide substitutions that probably were deleterious in the majority of cases (>50%) ([Figure 3A](#)). Only a small number of events in NR



sequences were indels (Figure 3A), in line with a previous report.<sup>35</sup>

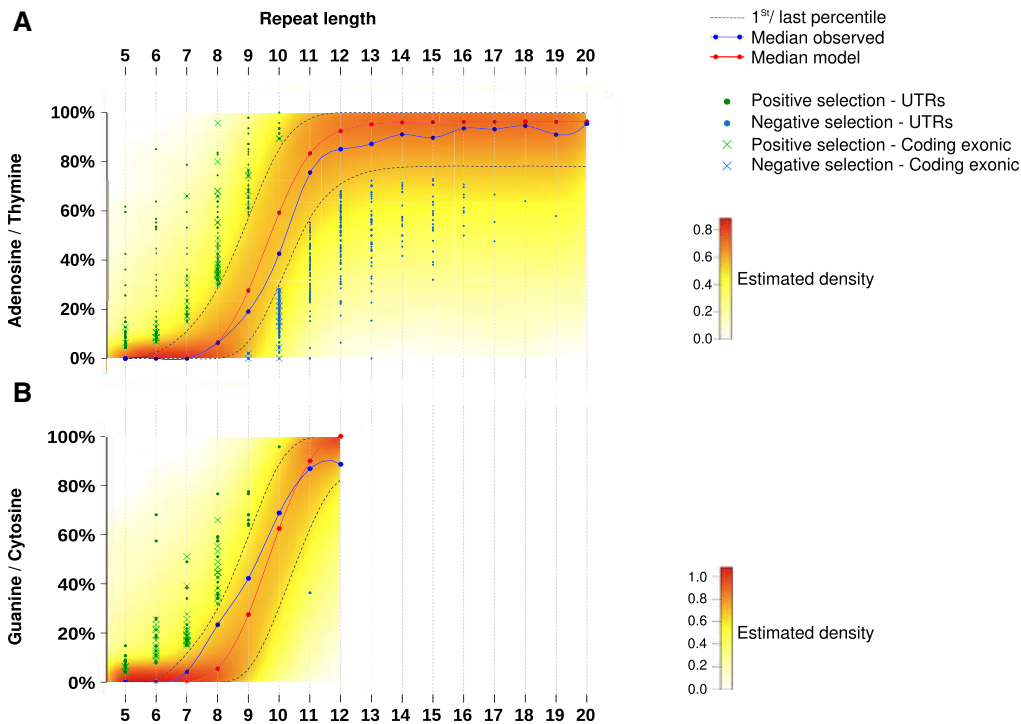
We next aimed to identify mutational events in NR sequences that showed an abnormally high frequency in tumor DNA (ie, positively selected mutational events) (Figure 3B and see the Methods section for details). Overall, we identified the 141 most consensual driver genes of colon tumorigenesis (Figure 3C and Supplementary Table 1). The top 30 driver mutated gene list is shown in Figure 3D and Supplementary Table 2, and includes recognized master genes in colorectal oncogenesis such as *BRAF*, *APC*, *KRAS*, and *PIK3CA* (Figure 3C).

### Modeling the Occurrence of Mutations in Repetitive Sequences Shows Positively and Negatively Selected Events in the MSI Tumor Genome

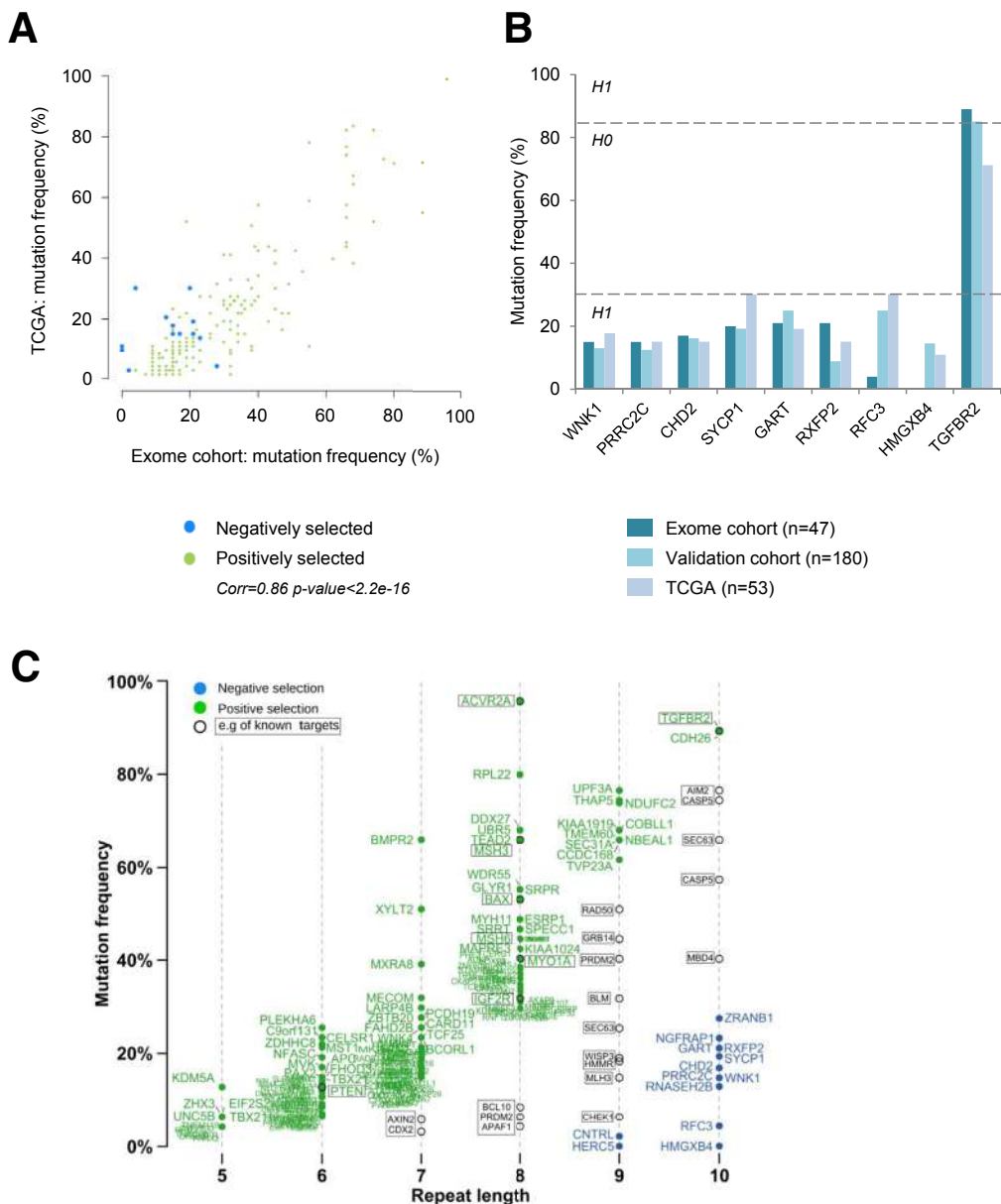
In cancer cells, somatic mutations occur randomly (mutational background) across the genome. In MSI tumor cells, DNA microsatellites constitute natural hot spots for these somatic events and the MSI tumor type is characterized by a high background of instability in repeat sequences. The mutability of DNA repeats within MSI tumors depends on functional and structural factors, as well perhaps on other as yet unidentified factors. Taking into account these previously described structural criteria,<sup>13</sup> that is, repeat length and nucleotide composition (adenosine/thymine vs guanine/cytosine) (Figure 1), we developed a statistical model (see Methods for further details) that discriminated 3 functional categories of MSI-linked somatic mutations

occurring at DNA repeats: the first category is positively selected events that confer benefits to the MSI tumor cells in which they occur because they have an oncogenic impact. These are believed to be positive drivers of the MSI-driven tumorigenic process and their mutation frequencies are higher than expected by chance in the model. The second category is negatively selected events that are deleterious for the tumor cells in which they occur because they have an anticancer impact. These are believed to be negative drivers of the MSI-driven tumorigenic process and their mutation frequencies are lower than expected by chance in the model. The third category is MSI-linked mutational events owing to background that do not confer benefits or have any oncogenic impact. Their mutation frequencies are found within the background level for MSI by the model. Although such neutral events are not thought to play a role during tumor progression, some gene alterations could have functional significance when they occur together.

Most allelic shifts were deletions and/or insertions of 1 bp, or more rarely 2 bp (data not shown). These were considered equally as mutant alleles in the genomic analysis of instability at mononucleotide repeats. A similar pattern was observed for dinucleotide repeats (data not shown). To build the model, only MSI-related events that occurred in mononucleotide R sequences were considered because these largely predominate over others such as in dinucleotide repeats<sup>8,12</sup> (see the Methods section for further details). Repeat length was used as an input parameter for the model and 2 models were fitted: one for A/T composition and the other for G/C composition (Figures 4B and 5). The density of the model for A/T



**Figure 5. Outliers identification and visualization.** Distribution of mutation frequencies of microsatellites according to repeat length. *Green dots* and *blue dots* represent microsatellites positively and negatively selected outlier mutations, respectively, in MSI tumors. Coding exonic outliers are indicated by a *x* and UTR outliers are indicated by a *circle*. This figure shows the statistical model and outliers for (A) adenosine/thymine and (B) guanine/cytosine.

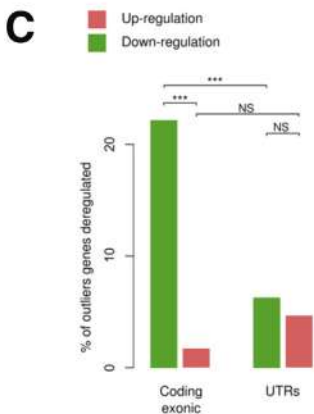
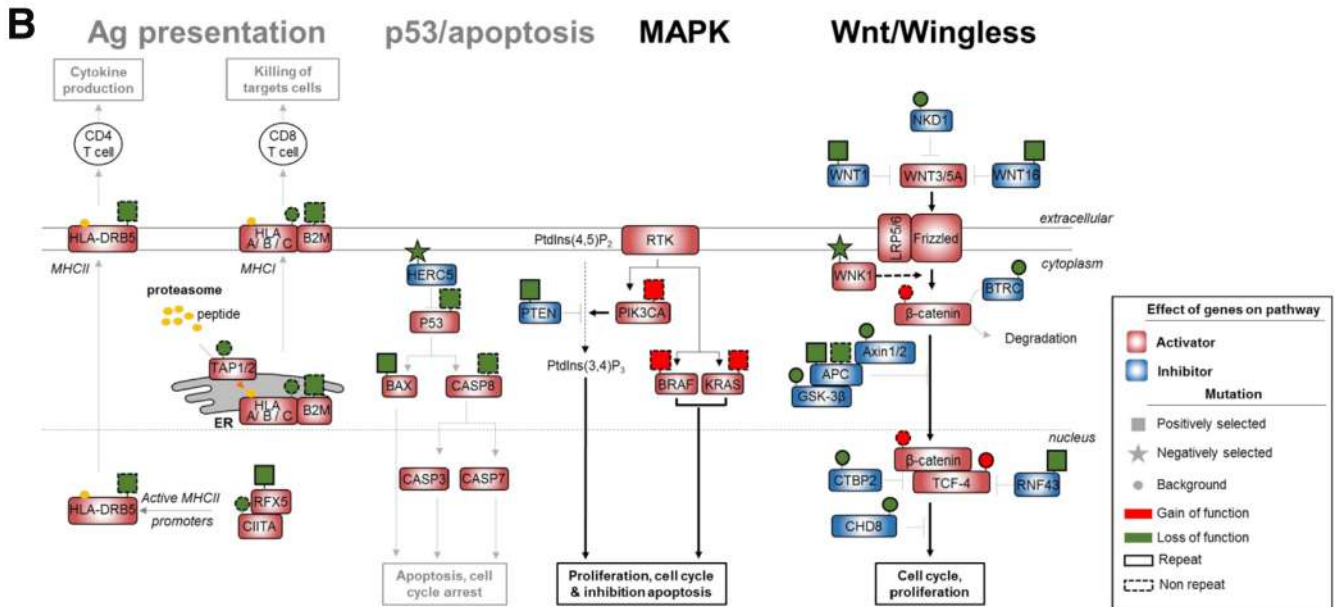
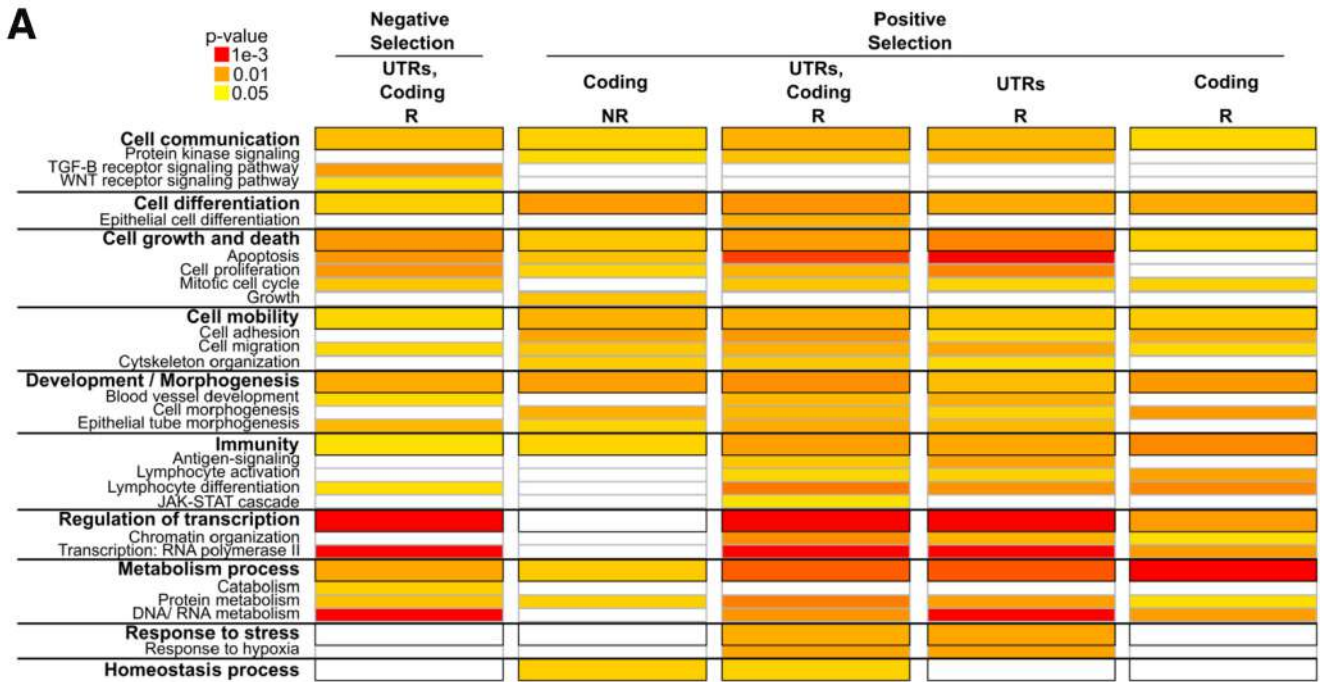


**Figure 6. Mutation frequency validation and redefinition of true MSI target genes.** (A) Mutation frequency of outlier mutations observed in the present exome cohort and in the TCGA cohort. (B) Mutation frequency for the 9 outlier mutations coding microsatellites contained in the putative target genes for MSI in a large independent cohort of colon tumors (n = 180) and the TCGA cohort (n = 53). (C) Distribution of mutation frequencies in coding microsatellites according to repeat length (x-axis). Genes with coding exonic outlier mutations identified in this study are indicated in green (positively selected) and blue (negatively selected). Genes with background mutation rates (unselected according to the model) are indicated in black. Examples of published targets for MSI are shown within *rectangles*, and those not subject to selection are indicated in *black text*.

composition of repeats is shown in Figure 4A. Microsatellites that were shown within our model, abnormally high or low mutation frequency within UTRs, or coding exonic regions are indicated (Figure 4A and Supplementary Table 3). Overall, we identified 1050 and 561 outlier events showing aberrant positive and negative selection in MSI CRC, respectively. These included 1376 mutations in UTR sequences (828 and 548 showing positive or negative selection, respectively) and 235 mutations in coding sequences (222 and 13 showing positive or

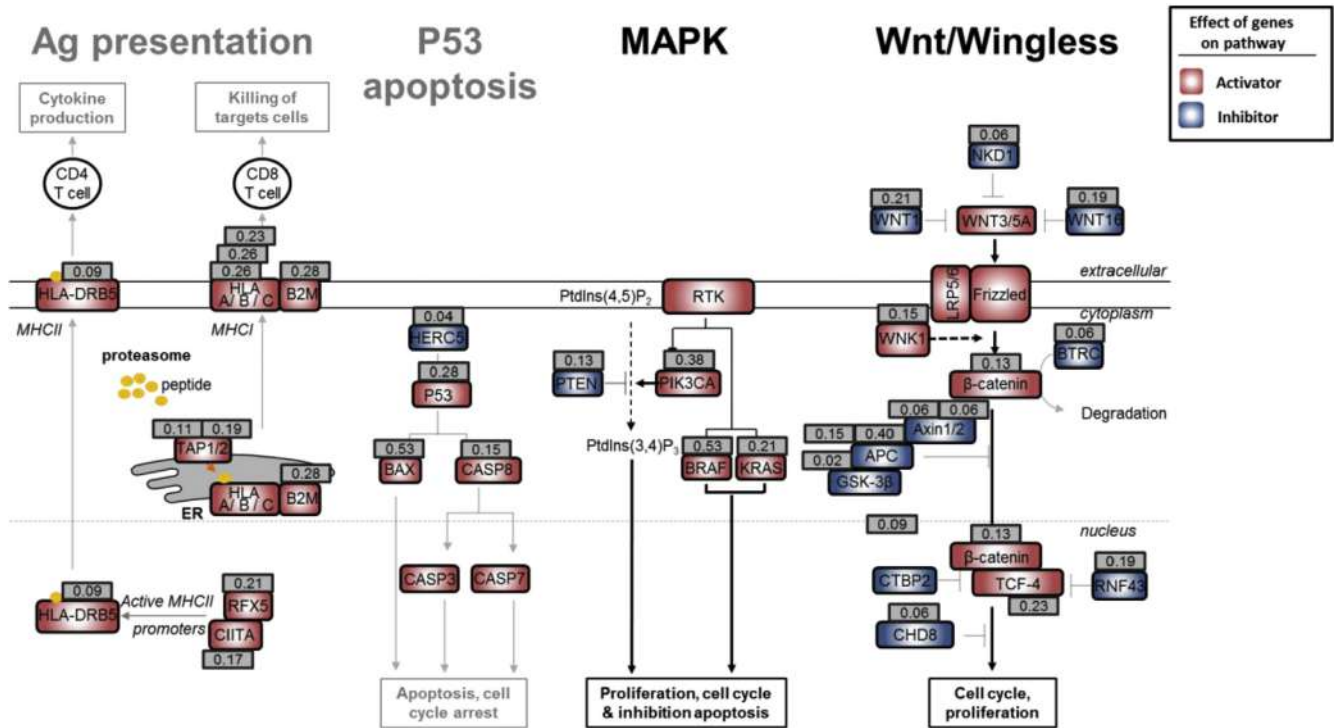
negative selection, respectively). With the exception of these 13 frameshift mutations that affected coding DNA sequences (see later), negatively selected events were observed almost exclusively in noncoding microsatellites (UTRs). In contrast, positively selected mutations were observed in both coding and noncoding DNA repeats (Figure 4C–E).

According to our model, we could only identify negative selection at long DNA repeats, that is, those at least 9 bp in length (Figures 4A and 5). Because these long DNA



**D**

Selection	Log2(fc)	Functional annotation	Gene Name	Genomic Region
Positive	-1.1	TGF signalling	TGFBR2	Coding Exonic
Positive	-0.9	Tumor suppressor	RUNX3	UTRs
Positive	-0.8	DNA mismatch repair	MSH3	Coding Exonic
Positive	-0.7	Induction apoptosis	BAX	Coding Exonic
Positive	-0.7	Tumor suppressor	BCL11B	UTRs
Positive	-0.5	DNA mismatch repair	MSH6	Coding Exonic
Positive	-0.4/-0.5	Co-activator T-cell	IGF2R	UTRs/ Coding Exonic
Positive	-0.3	TGF signalling	BMPR2	Coding Exonic
Positive	-0.1/-0.1	Tumor suppressor	DCC	UTRs/ UTRs
Negative	0.4	Inhibition proliferation	CUL5	UTRs
Negative	0.4	Inhibition proliferation	IRF6	UTRs
Negative	0.5	Inhibition proliferation	MFN2	UTRs
Positive	0.5	Proto-oncogene	WIPF1	UTRs
Positive	0.8	Cell proliferation	FGF9	UTRs
Negative	-0.9	Inhibits interleukin-1	IL1RN	UTRs
Negative	-0.5	Cell proliferation	ELK4	UTRs
Negative	-0.3	Cell migration	DOCK4	UTRs
Negative	-0.3	Cell proliferation	IGF1	UTRs
Negative	-0.2/-0.1	Cell proliferation	AR	UTRs/ UTRs
Negative	-0.1/-0.1	TGF signalling	SMAD4	UTRs/ UTRs



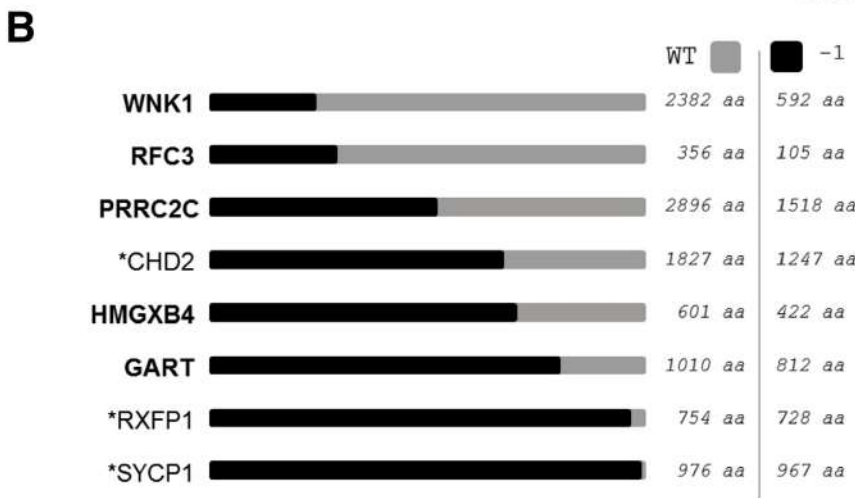
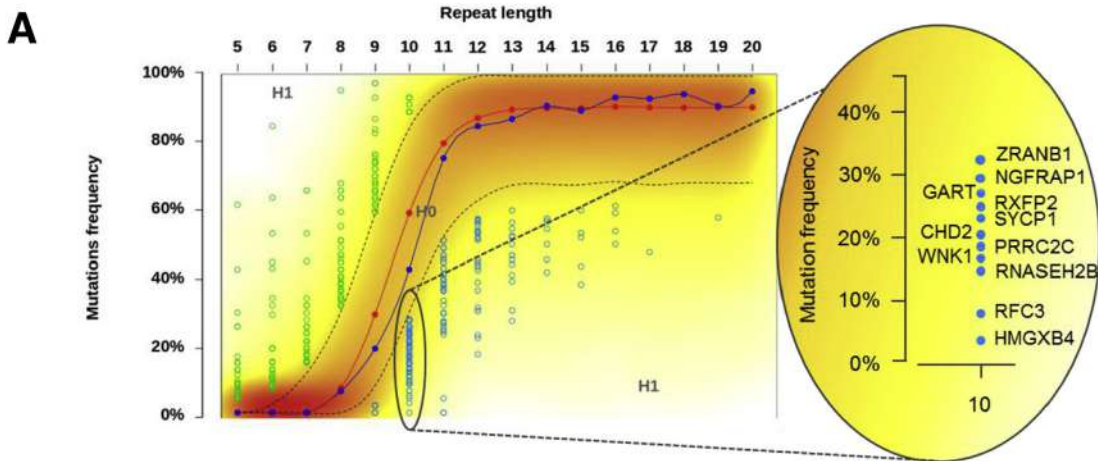
**Figure 8. Mutation frequency of selected pathways.** For each gene that belongs to a specific biological pathway, the mutation frequency is indicated in a *grey square*. Ag, Antigen; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinases.

repeats are mainly noncoding and located in UTR parts of human genes (5404 UTR candidates vs 248 in the coding DNA), the great majority of negatively selected mutations consequently were identified within UTR DNA repeats. However, when the number of negatively selected events was normalized by taking into account the overall number of microsatellites in coding and UTR regions (Figure 4C–E), no significant enrichment for negative selection in UTR vs coding repeats was observed in MSI CRC (13 of 267 [4.9%] vs 548 of 7030 [7.9%], respectively). Overall, our analysis of MSI through exome sequencing led us to identify 563 mutations that were negatively selected in MSI CRC, representing <10% of the candidate coding and UTR DNA repeats with a size  $\geq 9$  bp as described earlier.

**Validation of Exome-Wide Analysis of MSI and Refining the List of MSI Target Genes in MSI CRC**

We next compared our results with those of the TCGA consortium, which used MuTect2 caller in 53 MSI CRC. The mutation frequencies observed at microsatellite loci were highly similar in both cohorts ( $R = 0.86$ ;  $P < 2.10^{-16}$ ) (Figure 6A). Instability at 9 microsatellite loci also was investigated using PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism in an independent cohort of 180 MSI CRCs. By using this manual gold standard method, very similar mutation frequencies were observed for these 9 coding repeat sequences in the 2 cohorts with the 2 methods, including 8 in which we validated the low mutation frequency (Figure 6B).

**Figure 7. (See previous page). Participation of positively and negatively selected events in cancer-related pathways.** (A) Significant gene ontology terms enriched in outlier mutations compared with their abundance in all genes in the genome. Details of all gene ontology terms are available in Supplementary Table 4. (B) Interactions between mutations in R (continuous outlines) and NR sequences (dotted outlines) result in a coordinated effect on 4 signaling pathways. The effects of mutations that are unselected (circles), positively selected (rectangle), or negatively selected (stars) are indicated above the genes by a color code (red for gain of function and green for loss of function). Prediction of the global effect of mutations is represented by bold font for activation of the pathway and light grey font for inhibition. Genes known to be positive regulators (activators) of signaling pathways are indicated by a red rectangle and negative regulators (inhibitors) are indicated by a blue rectangle. (C) Percentage of outlier mutations in R sequences located in coding exons and in UTRs leading to significant dysregulation of mRNA expression level (comparison of mutated and wild-type tumors in each case). Upper: Proportion of microsatellite mutations leading to up-regulation of gene expression (in brown); lower: Down-regulation (in green). The significant independence of the chi-squared distribution is annotated by asterisks, as follows:  $***P < .001$ . (D) List of MS candidate outliers that may contribute to the MSI tumor phenotype because of their biological functions, the effect of mutations on the level of gene expression, and the selective pressure at which the MS is constrained (positive or negative selection). Log2(fold change (Log2(fc))) indicates the log base 2 of mRNA expression between the MS mutant allele vs MS wild type. For each gene, the selective pressure, biological function, gene name, and the gene region of the MS are indicated.

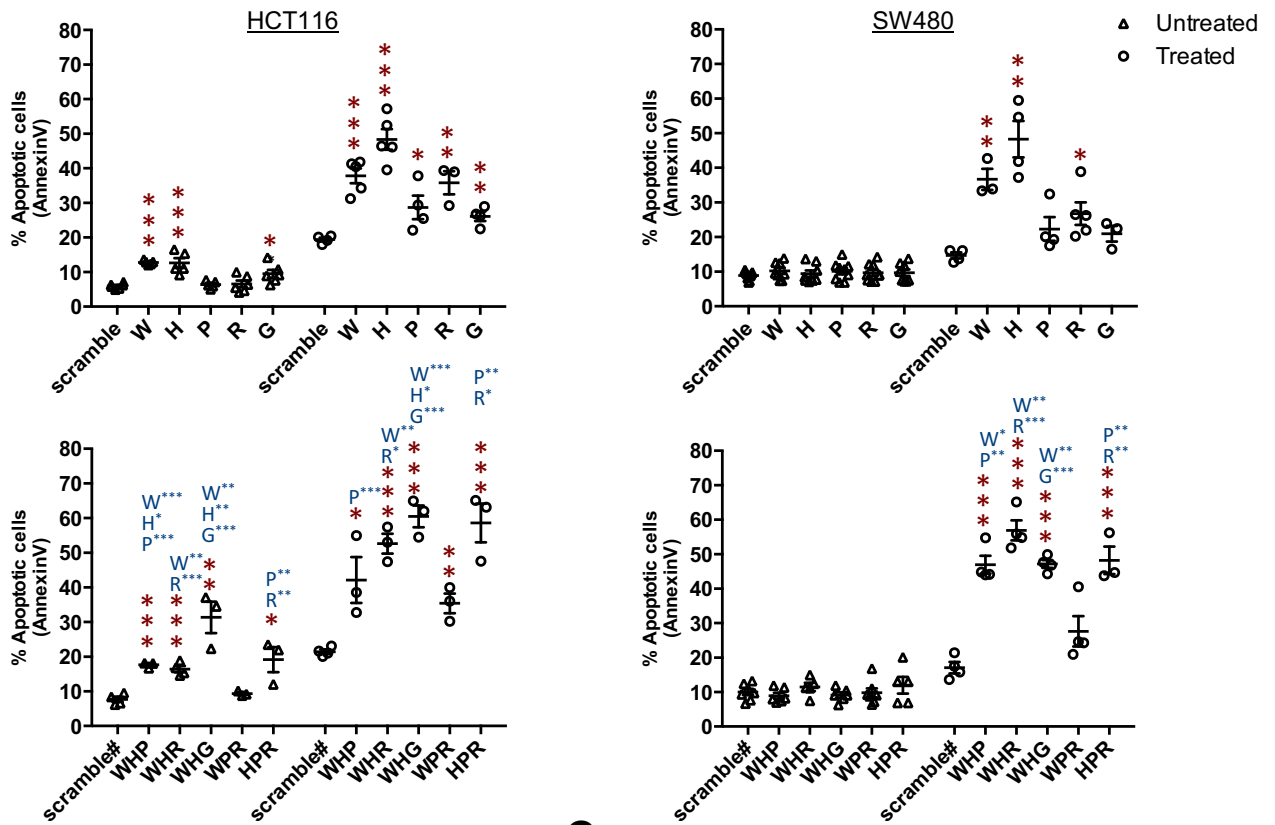


**C**

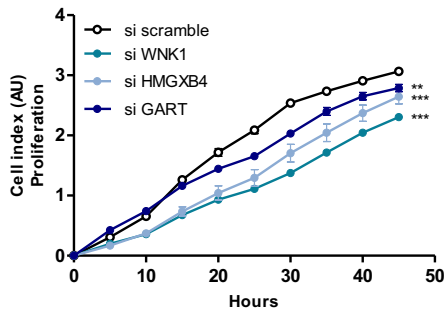
Symbol	Gene symbol	Gene name	Function	Cellular function	Reported roles in cancer Expression correlated with:
W	<i>WNK1</i>	With-no-lysine kinase 1	Serine/threonine kinase	Pleiotropic	Cell migration and invasive potential in breast cancer and in glioma
H	<i>HMGXB4</i>	HMG box domain containing 4	DNA chaperone	DNA accessibility	--
P	<i>PRRC2C</i>	Proline-rich coiled-coil 2C	-	-	Cell proliferation in lung cancer
R	<i>RFC3</i>	Replication factor C	DNA clamp loader	DNA replication	Cell proliferation in esophageal adenocarcinoma and invasiveness in ovarian cancer
G	<i>GART</i>	Phosphoribosylglyc inamide synthetase	Ligase transferase	Purine synthesis	Cell proliferation in glioma and hepatocellular carcinoma

**Figure 9. Exonic outlier mutation genes: mutation positions and negative selection validation.** (A) Negatively selected coding exonic outliers identified in this study (repeat length: 10). (B) Schematic structure of wild-type (in grey) or mutant (in black) proteins of the 9 outlier mutation genes in which mutations were negatively selected in MSI tumors. \*Genes that are not investigated in the present study because mutations do not match with putative loss of function (RXFP1, SYCP1, RNASEH2B) or because gene silencing was not successful (CHD2). (C) Table of the 5 outlier mutations negatively selected in MSI tumors identified from exome sequencing data and investigated here by functional analysis. Four of the 5 genes have a literature-documented role that supports negative selection of their mutations because of the tumorigenic implication.

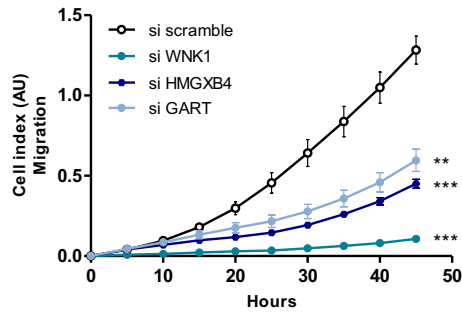
**A**



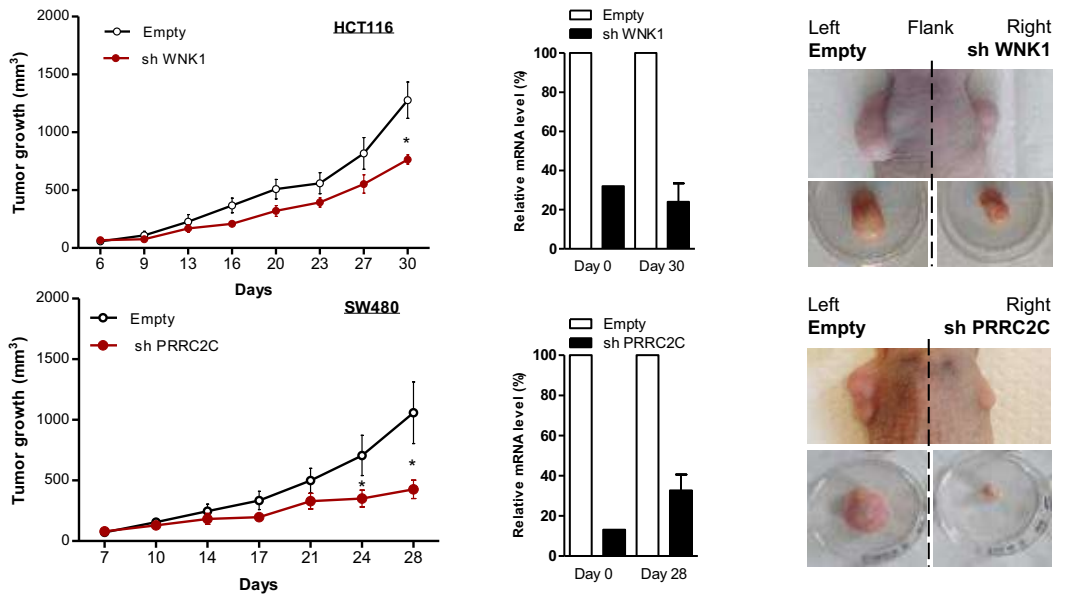
**B**



**C**



**D**



According to the published literature, the majority of known and extensively analyzed target gene mutations in MSI CRCs were found here in MMR-deficient CRCs. These included *AXIN2*, *CDX2*, *BCL10*, *APAF1*, *CHCK1*, *PLH3*, *BLM*, *RAD50*, *WIP3*, *MBD4*, *CASP5*, and *AIM2* (Figure 6C). However, *TGFBR2*, *ACVR2A*, *BAX*, *MSH3*, *MSH6*, *IGF2R*, and several others remained in the group of genes with positively selected mutations in MSI tumors. Interestingly, this group mostly contained a small coding repeat (5–7 bp in length) whose mutation frequency was not high but nevertheless was subjected to strong positive selection pressures according to our model (eg, *UNC5B*, *PTEN*, and *APC*). Finally, our signature also contained a small number of target genes with a long coding repeat (9 or 10 bp in length) whose mutations were negatively selected in MSI tumors (Figure 6C) and in which we further assessed the functional impact (see later).

### Investigating the Interplay Between MSI, Changes in Gene Expression Level, and Cancer-Related Pathways

We next tested the hypothesis that both positively and negatively selected outlier mutations in R sequences constitute major events in MSI tumorigenesis that result in pro-oncogenic or anti-oncogenic impacts, respectively. To do this we assessed gene ontology terms associated with these mutations and found several to be enriched significantly in such events (Figure 7A and Supplementary Table 4). These outlier mutations were observed in cancer-related pathways known to play an important role in tumor development (eg, *Wnt/Wingless* and *RAF/RAS/MAPK* signaling), or with antitumor immunity. Their positive or negative selection in MSI tumors were likely to accord with their expected positive or negative impact, respectively, on the activity of these pathways in CRC (Figures 7B and 8).

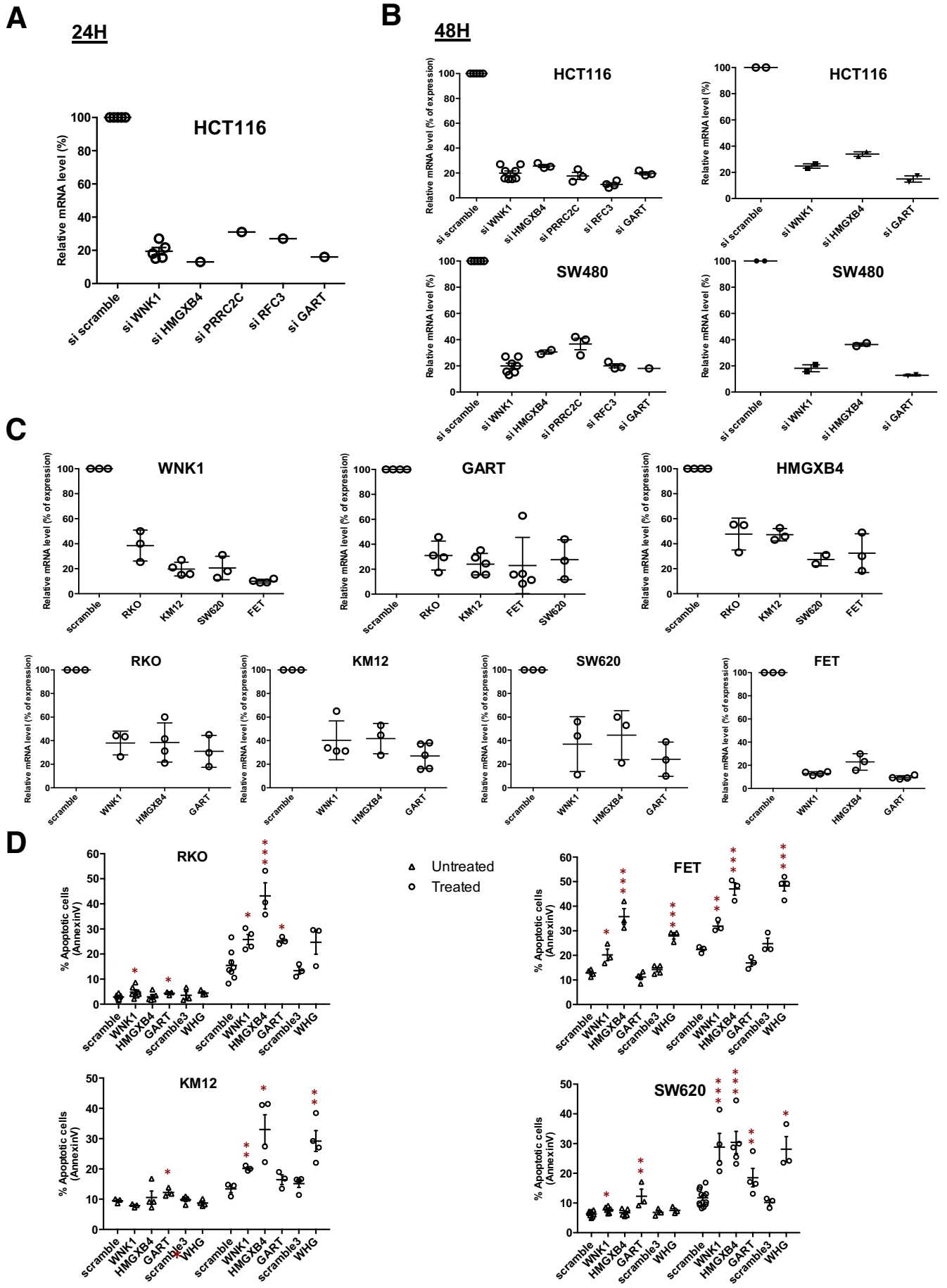
We then assessed whether these outlier mutations influenced the expression level of the corresponding target gene in MSI tumors. Several mutations in coding regions

and in UTRs were associated with significantly altered gene expression when assessed at the messenger RNA (mRNA) level using transcriptome data from 30 MSI CRC samples (Figure 7C). Because of nonsense-mediated mRNA decay,<sup>36</sup> we mostly observed down-regulation of mutated transcripts from coding regions, as expected. The overall impact of outlier events in UTR tracts was mixed, with down-regulation or up-regulation of a few target genes in MSI CRCs. Based on these results, a list of outlier mutations expected to play an important role in MSI tumor development was proposed (Figure 7D). In line with a protumorigenic effect, positively selected outlier events may inactivate tumor-suppressor functions by down-regulating mRNA expression or activate oncogene functions by up-regulating mRNA expression. Acting in opposition, the negatively selected outlier events could activate tumor-suppressor functions by up-regulating mRNA expression or inactivate oncogene functions by down-regulating mRNA expression, thereby slowing down MSI tumorigenesis.

### Functional Validation of the Deleterious Impact of Negatively Selected Coding Mutations on CRC Cells

In MSI tumors, mutations observed in repetitive coding sequences are frameshifts (indels) and generally lead to truncation of the corresponding aberrant protein. Although these events are usually loss-of-function mutations, nonsense-mediated mRNA decay acts to degrade mutant mRNAs that may encode proteins with residual functional activity because these transcripts contain a premature termination codon. We therefore hypothesized that negatively selected mutational events identified in the genomic screen shown in Figure 6 could be deleterious for MSI tumor cells. As stated earlier, only a few of these events were in coding regions and led to truncation of the respective proteins (eg, *WNK1*, *PRRC2C*, *CHD2*, *SYCP1*, *GART*, *RXFP2*, *RFC3*, and *HMGXB4*) (Figure 9). Five of these target genes (*WNK1*, *HMGXB4*, *PRRC2C*, *RFC3*, and *GART*) were selected

**Figure 10.** (See previous page). Validation of the deleterious effects of 5 outlier mutations on CRC cell lines. (A) Flow cytometry analysis of the apoptosis (Annexin V) of untreated (*triangle*) or TRAIL-treated (*circle*) HCT116 (MSI, left panel) and SW480 (microsatellite stable, right panel) CRC cell lines transfected with either a single specific siRNA gene (*WNK1*, *HMGXB4*, *GART*, *RFC3*, and/or *PRRC2C*), or with scrambled siRNA (*upper panels*). *Lower panels*: Simultaneous down-regulation of 3 genes are shown, leading to an additive effect in increasing the percentage of apoptotic cells in some cases. Data represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments for single specific siRNA, and 2 independent experiments for simultaneous down-regulation performed in triplicate. *t* test: \**P* < .05, \*\**P* < .01 and \*\*\**P* < .001 of the indicated silencing condition compared with control (si scramble in black; single siRNA indicated gene in blue). All data from fluorescence-activated cell sorter analysis are shown in Figure 12. (A and C) To evaluate the effect of silencing of the 5 genes with outlier mutations on the proliferation and migration rate of HCT116 cell lines, real-time monitoring of (B) cell growth and (C) cell migration using the xCELLigence system was performed. With this instrument, silencing of the *WNK1*, *HMGXB4*, and *GART* genes was shown to attenuate cell proliferation and migration significantly, whereas silencing of *PRRC2C* and *RFC3* did not (Figure 13). The cell index for proliferation and migration are presented as means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in quadruplicate. Two-way analysis of variance using the Bonferroni post hoc test: \**P* < .05, \*\**P* < .01, and \*\*\**P* < .001. (D) Expression of *WNK1* or *PRRC2C* shRNA in CRC cells leads to decreased tumor growth. *Left panels*: Comparative analysis of tumor growth (mean tumor volumes) in xenografts derived from HCT116 and SW480 cell lines transfected with *WNK1* or *PRRC2C* shRNA, respectively, and compared with cells containing a scrambled shRNA. There were 7 mice in the *WNK1* group and 10 in the *PRRC2C* group. Data represent means  $\pm$  SEM, *t* test: \**P* < .05. *Middle panels*: *WNK1* and/or *PRRC2C* mRNA reverse-transcription quantitative PCR expression analysis at 2 time points (at day 0 from transfected cells before injection and at day 28 or 30 from tumor xenograft). *Right panels*: Macroscopic picture of xenograft before and after tumor excision from HCT116 and SW480 stably transfected cells.





according to their documented role as reported in the literature (Figure 9). To test the hypothesis that truncation of these candidate proteins resulting from MSI was responsible for their inactivation, we investigated the functional consequences of their silencing using siRNA and/or shRNA in CRC cell lines in vitro and in vivo using xenograft models (Figures 10–13). Depending on the target gene, their inactivation in CRC cells led to deleterious effects on apoptosis, proliferation, and/or cell migration (Figures 10A–C, and 11–13). Of note, the deleterious effects were greatly enhanced when several of the targets were silenced concomitantly in the same cellular models, indicating additive effects for these events in CRC cells (Figures 10–12). In additional experiments, the prolonged silencing of some of these targets led to strong inhibition of tumor growth in HCT116 (MSI) and/or SW480 (microsatellite stable) xenografts (Figures 10D and 13).

### Negatively Selected Events Are Associated With Worse Survival of MSI CRC Patients

We next evaluated whether negatively selected coding sequence mutations that were associated with deleterious effects in CRC cells (eg, microsatellites located in coding regions of *WNK1*, *HMGXB4*, *PRRC2C*, *RFC3*, or *GART*) also may be clinically relevant. An additional cohort of 164 MSI CRC patients originating from 3 clinical centers in France was analyzed by Cox survival models adjusted for TNM stage. In the overall cohort, mutated *WNK1* (hazard ratio [HR], 3.1; 95% CI, 1.2–8;  $P = .02$ ) and *PRRC2C* (HR, 2.9; 95% CI, 1–8.1;  $P = .04$ ) were associated with worse RFS (Figure 14). The *HMGXB4* mutation also showed a trend for association with worse RFS (HR, 2.5; 95% CI, 0.78–7.8;  $P = .12$ ) (Figure 14).

To examine the overall relationship between the 5 negatively selected target gene mutations and patient survival, a mutational index value was computed to summarize this MSI target gene category. Cox modeling based on this representation was associated with significantly worse survival, suggesting an overall negative impact of these mutational events on patient outcome (HR, 3; 95% CI, 1.1–7.9;  $P = .03$ ) (Figure 14).

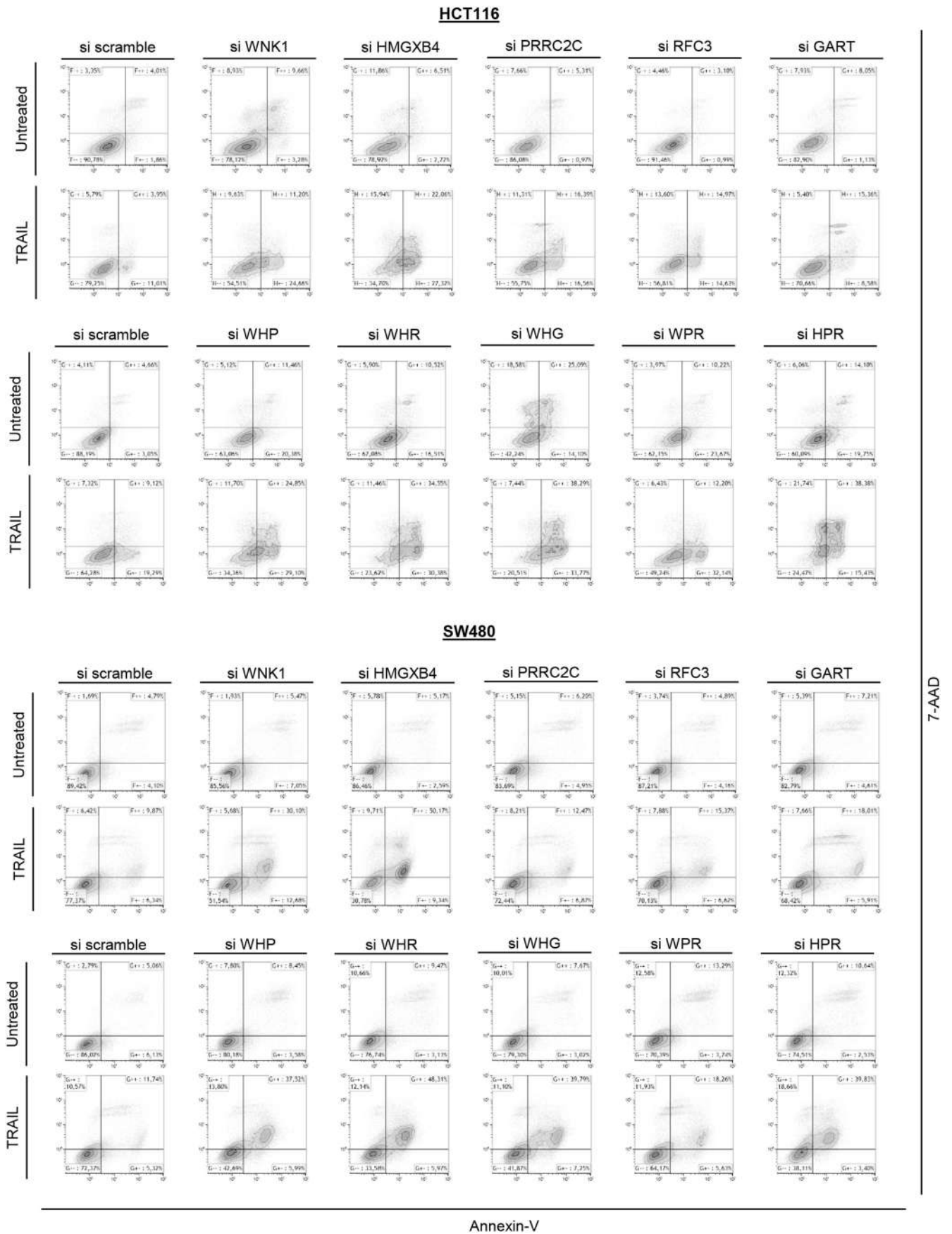
## Discussion

MSI tumors represent a distinctive phenotype characterized by a high background of nucleotidic instability. The

present work indicates that, expectedly, in such an MMR-deficient context,<sup>8,9,13,37</sup> genomic instability generates positively selected somatic mutations in both R and NR DNA sequences that are likely to contribute to the tumorigenic process. In addition, it also suggests that MSI tumors must deal with frequent somatic mutational events that are deleterious for the MSI tumor cells and result in a tumor-suppressor effect. Among these mutational events, some should be lethal and therefore not detected in tumor DNA whereas other negatively selected could be deleterious for tumor cells without being lethal, depending on the mutational landscape and other factors. These events represent a weakness of the MSI-driven tumorigenic process. The present results shed new light on MMR-deficient tumorigenesis and suggest that genomic instability in MSI CRC plays a dual role in achieving tumor cell transformation.

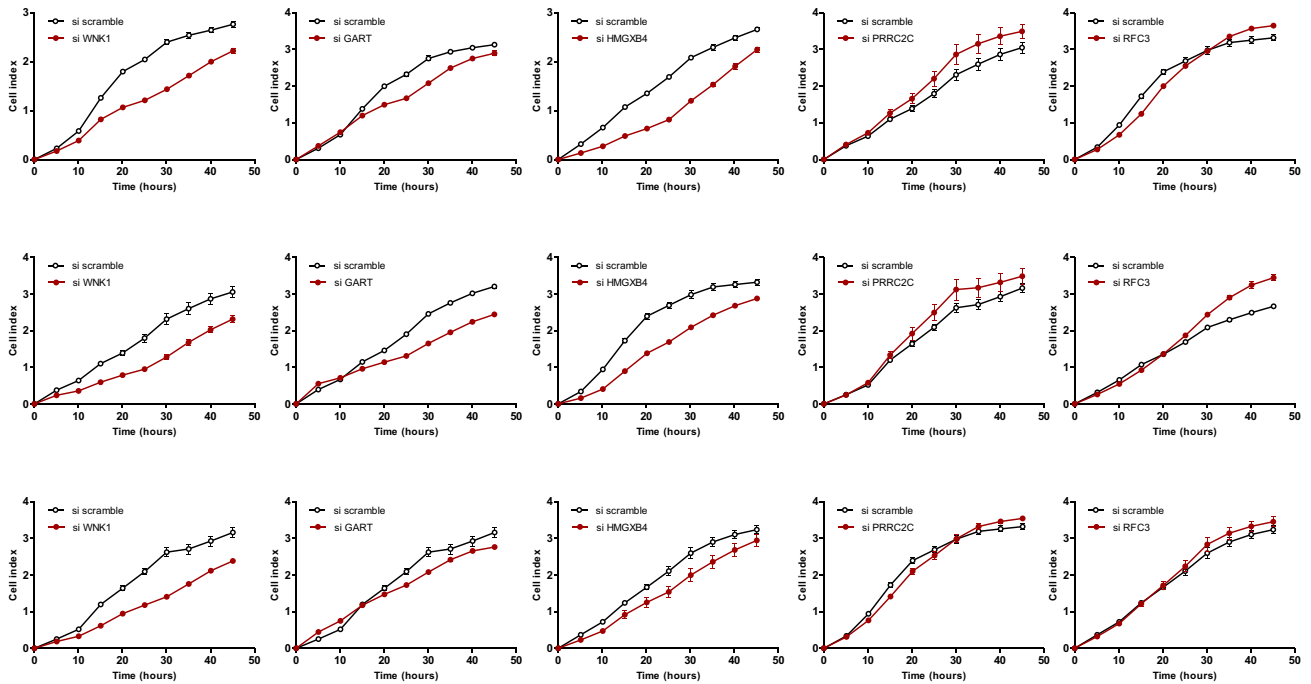
Frameshift gene mutations owing to MSI in coding repeats are likely to result in inactivation of the corresponding truncated mutant protein, provided the mutant transcript is not degraded by nonsense-mediated mRNA decay.<sup>10</sup> The clearly deleterious consequences of 5 negatively selected coding mutations we report here in both MSI and microsatellite stable tumor cells is of interest. Their frequent somatic inactivation in MSI CRC can impede the progress of cell transformation and lead to the regression of clones in which they occur. A major example of this was *WNK1*, which codes for a positive regulator of canonical Wnt/-catenin signaling and whose inactivation in different tumor types is deleterious,<sup>38,39</sup> other mutations occurring in *HMGXB4*, *GART*,<sup>40,41</sup> *RFC3*,<sup>42,43</sup> or *PRRC2C*, and the silencing of this latter candidate decreased cell proliferation in lung cancer.<sup>44</sup> In line with our results, a recent study also found that silencing of some of these targets (*WNK1*, *RFC3*, and *GART*) was lethal in haploid human tumor cells.<sup>45</sup> Although the MMR-deficient tumor cells in which these mutations occurred were eliminated from the bulk of most MSI colon tumors through negative selection, our results also showed that, strikingly, the few tumors in which at least one of these mutations was detected was associated with worse patient prognosis. This suggests the anticancer impact of such mutations should be counterbalanced by other oncogenic processes that remain to be identified and were responsible for the poor prognosis. This clinical observation on patient outcome is intriguing and will require further investigation in larger cohorts. It was difficult to address with the present cohort because of the low

**Figure 11.** (See previous page). Validation of gene abrogation by the siRNA approach and validation of the deleterious impact of 5 outlier mutations genes in RKO, KM12, FET, and SW620 CRC cell lines. Gene expression (mRNA level) of outlier mutation-related genes after knock-down by single siRNA was assessed at (A) 24 or (B, left panel) 48 hours after transfection by real-time quantitative PCR. Data represent the means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. (B, right panel) Gene expression (mRNA level) of outlier mutation-related genes after simultaneous down-regulation of 3 genes in HCT116 (upper panel) and SW480 (lower panel) cell lines. (C) Gene expression (mRNA level) of outlier mutation genes after knock-down by siRNA in 4 cell lines (MSI: RKO, KM12; and microsatellite stable: FET, SW620) was assessed 48 hours after transfection by real-time quantitative PCR. Data represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (D) Flow cytometry analysis of apoptosis (Annexin V) of untreated (triangle) or TRAIL-treated (circle) MSI (RKO and KM12, left panel) and microsatellite stable (FET and SW620, right panel) CRC cell lines transfected either with a single specific siRNA gene (*WNK1*, *HMGXB4*, and/or *GART*) or with scrambled siRNA. Data represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.  $t$  test: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$  of indicated silencing condition compared with control.

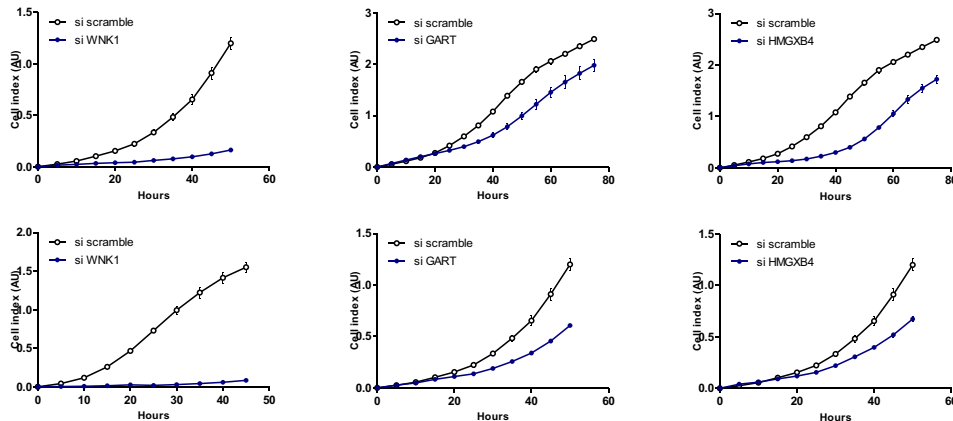


**Figure 12. Flow cytometry data.** Flow cytometry analysis of early (Annexin V–positive and 7-amino-actinomycin D [7-AAD]–negative cells) and late (Annexin V– and 7-AAD–positive cells) apoptosis of untreated or TRAIL-treated HCT116 (MSI, upper panel) and SW480 (microsatellite stable, lower panel) CRC cell lines transfected either with a single specific siRNA gene (*WNK1*, *HMGXB4*, *GART*, *RFC3*, and/or *PRRC2C*) or with scrambled siRNA. One experiment of the 3 performed is shown.

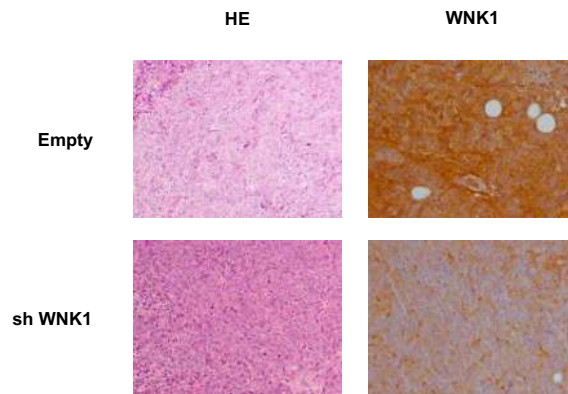
**A**



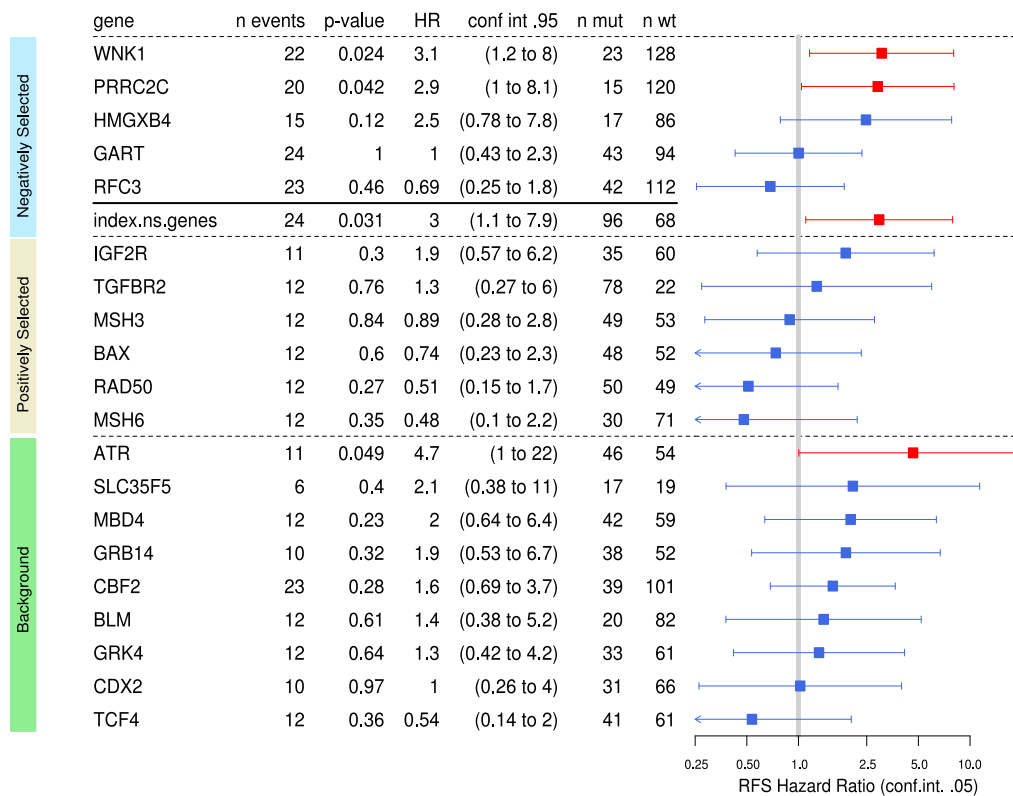
**B**



**C**



**Figure 13. Experimental data of cell growth and cell migration analysis.** Real-time monitoring of (A) cell growth and (B) cell migration using the xCELLigence system (HCT116 CRC MSI cell line). This system allows estimation of the cell index in real time—the parameter based on impedance measurement and reflecting the number of cells attached to the surface of the experimental chambers. Quadruplicates of 3 independent experiments are shown. (C) H&E stain, and WNK1 marker expression by immunohistochemistry in tumor xenografts at day 30 is shown (see Figure 10D).



**Figure 14. Clinical relevance of MSI-driven coding region mutations in target genes in CRC patients.** The association of 5 negatively selected MSI-driven mutational events with RFS was calculated in the cohort of 164 MSI CRC patients with survival data available. The association of the Boolean mutational index (see the Materials and Methods section) was calculated from the mutational status of the above 5 target genes (WNK1, PRRC2C, HMGXB4, GART, RFC3) in each tumor sample (status 0, no mutation observed; status 1, at least 1 mutation observed) with RFS also is shown. Also reported is the association with RFS of a series of 15 other frequent MSI mutations (6 positively selected and 9 background events) that we investigated previously in the same MSI CRC samples and published.<sup>16</sup> Forest plot of RFS HRs of independent univariate Cox analyses are shown. *Squares* represent the HRs and *horizontal bars* represent the 95% CIs. Red indicates a *P* value of less than 5% (worse prognosis) and blue indicates more than 5%.

frequencies of negatively selected events and the small number of relapses in MSI CRC patients.

Aside from the small number of deleterious mutations found in coding sequences, negatively selected mutational events were found mostly in long noncoding repeats located in the 5' or 3' UTR. Although approximately 10% of these somatic mutations were found to alter gene expression at the RNA level, their possible functional impact requires further investigation. We did not perform a functional analysis to show a deleterious impact in MSI CRC cells, as performed for negatively selected events in coding regions. However, these outlier mutations were located in genes with a role in several cancer-related processes, as shown in the pathway enrichment analysis. This indicates their negative selection in MSI CRC cells was not a chance event. Interestingly, some of the negatively selected mutations identified here were found to up-regulate tumor-suppressor functions during MSI tumor development, whereas others were observed to down-regulate oncogene functions. This is in accordance with their paradoxical activation or inactivation, respectively, during the tumorigenic process. Together, these findings highlight that MSI in noncoding UTRs could have an

important antitumor impact during MMR-deficient tumor development.

Our analysis of the MSI colon tumor exome confirmed the majority of known target gene mutations for MSI. These and many other mutations in 8- to 10-bp repeats reported previously in the literature are thought to be key events in MSI-driven tumorigenesis (for review see Hamelin et al<sup>37</sup>). Although these mutations may have functional significance in particular contexts, we showed that the frequency of most of these microsatellite mutations was not different from the background frequency expected for their length, suggesting their overall impact on tumor development may be limited, if any. In contrast, we identified several mutations in smaller coding and noncoding DNA repeats of 5–7 bp in length that showed a high positive selection in MSI CRC. We postulate these new candidate genes for MSI tumor progression that contain relatively short repeats represent important oncogenic driver events in MMR-deficient CRC and may be much more relevant for tumorigenesis than many of the MSI-related mutations reported in the past.

Although almost all sporadic MSI CRC arise because of MLH1 deficiency after epigenetic silencing, Lynch-related MSI CRC is associated with germline mutations in *MLH1*

(45% of cases), *MSH2* (45%), *MSH6* (~10%), or *PMS2* (~1%). Although *MLH1*- and *MSH2*-deficient MSI tumors show similar levels of nucleotide instability, including overall MSI as confirmed here, significantly lower mutation frequencies of R and NR sequences are observed in *MSH6*- and *PMS2*-deficient MSI tumors. The present cohort was designed to investigate the most common MMR-deficient genotypes in CRC (ie, *MLH1*- and *MSH2*-deficient tumors). Only 1 *MSH6*-deficient CRC was included, as mentioned. Future studies could aim to analyze genomic instability in the rare MSI CRC showing *MSH6* or *PMS2* deficiency that could show a lower mutation burden at both R and NR sequences.

There is no contradiction between the findings of this study and the literature in the field. Recent data obtained from analysis of thousands of tumors from different primary sites show that, unlike species evolution, positive selection outweighs the negative selection of somatic mutational events during tumor progression. However, these investigations were concerned with alterations at NR sequences and did not take into account mutations in R sequences. In contrast, R sequences (microsatellites) have very high physiopathologic relevance in the tumor model investigated in the present study, namely MSI tumors. We did not observe negative selection of NR sequences in MSI CRC, in line with the prevailing dogma. However, our results show the existence of both positive and negative selection of R sequences during tumor progression, as well as highlighting the dual role for MSI in this important tumor model.

The limitations of our work relate mainly to the analysis of a limited series of MSI CRC using WES, even if it represents a large series of such tumors investigated by this approach. Further studies are required to confirm our results using larger cohorts of MSI CRC, thus allowing the identification of a more robust signature of target genes for MSI that undergo positive or negative selection. Important pro- and anti-cancer genes for MSI tumorigenesis are likely to be included in these genomic signatures. The pathophysiological relevance and opposing functional effects of such MSI-driven events should allow major advances in the understanding of MSI tumorigenesis and in the development of personalized treatments for patients with MMR-deficient tumors.

## References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306–313.
- Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, Dawson KJ, Haase K, Van Loo P, Davies H, Stratton MR, Campbell PJ. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell* 2017;171:1029–1041 e21.
- Bakhoun SF, Landau DA. Cancer evolution: no room for negative selection. *Cell* 2017;171:987–989.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Zhang GJ, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Jarvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215–1225.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816–819.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–561.
- Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 2017;8:15180.
- Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22:1342–1350.
- Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447–2454.
- Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Hamelin R, Seruca R, Schwartz S Jr. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene* 2003;22:9192–9196.
- Kim TM, Laird PW, Park PJ. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* 2013;155:858–868.
- Duval A, Reperant M, Compoin A, Seruca R, Ranzani GN, Iacopetta B, Hamelin R. Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res* 2002;62:1609–1612.
- Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M, Bork P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D682–D689.
- Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, Jegou G, Wanherdrick K, Joly AL, Buhard O, Gobbo J, Penard-Lacronique V, Zouali H, Tubacher E, Kirzin S, Selves J, Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Bengrine-Lefevre L, Louvet C, Tournigand C, Lefevre JH, Parc Y, Tiret E, Flejou JF, Gaub MP, Garrido C, Duval A. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283–1289.
- Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloux A, Wanherdrick K, Dorard C, Taieb A, Saget A, Loh M, Soong R, Zeps N, Platell C, Mews A, Iacopetta B, De Thonel A, Seigneuric R, Marcion G, Chapusot C, Lepage C, Bouvier AM, Gaub MP, Milano G, Selves J, Senet P, Delarue P, Arzouk H, Lacoste C, Coquelle A, Bengrine-Lefevre L, Tournigand C, Lefevre JH, Parc Y, Biard DS, Flejou JF, Garrido C, Duval A. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large

- deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401–411 e1.
17. Berthenet K, Boudesco C, Collura A, Svrcek M, Richaud S, Hammann A, Causse S, Yousfi N, Wanherdrick K, Duplomb L, Duval A, Garrido C, Jego G. Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2016;5:e1170264.
  18. Berthenet K, Bokhari A, Lagrange A, Marcion G, Boudesco C, Causse S, De Thonel A, Svrcek M, Goloudina AR, Dumont S, Hammann A, Biard DS, Demidov ON, Seigneuric R, Duval A, Collura A, Jego G, Garrido C. HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. *Oncogene* 2017;36:2328–2336.
  19. Sagher D, Hsu A, Strauss B. Stabilization of the intermediate in frameshift mutation. *Mutat Res* 1999;423:73–77.
  20. Duval A, Rolland S, Compoin A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 2001;10:513–518.
  21. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* 2015;89:899–921.
  22. Kondelin J, Gylfe AE, Lundgren S, Tanskanen T, Hamberg J, Aavikko M, Palin K, Ristolainen H, Katainen R, Kaasinen E, Taipale M, Taipale J, Renkonen-Sinisalo L, Jarvinen H, Bohm J, Mecklin JP, Vahteristo P, Tuupanen S, Aaltonen LA, Pitkanen E. Comprehensive evaluation of protein coding mononucleotide microsatellites in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res* 2017;77:4078–4088.
  23. Marisa L, de Reynies A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenet D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Flejou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013;10:e1001453.
  24. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, Rene-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papatomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libe R, de Reynies A, Bertherat J. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* 2014;46:607–612.
  25. Niu B, Ye K, Zhang Q, Lu C, Xie M, McLellan MD, Wendl MC, Ding L. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:1015–1016.
  26. Williams DA. Extra binomial variation in logistic linear models. *Appl Statist* 1982;31:144–148.
  27. Tibshirani J, Manning CD. Robust logistic regression using shift parameters. *ACL* 2014;2:124–129.
  28. Bertsekas DP. Incremental proximal methods for large scale convex optimization. *Math Program* 2011;129:163.
  29. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. Boca Raton, FL: CRC Press 1989;37.
  30. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009;37:1–13.
  31. Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 2005;3:519–529.
  32. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–5257.
  33. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241–251.
  34. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Consortium IBC, Consortium IM-S, PedBrain I, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–421.
  35. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339:1546–1558.
  36. El-Bchiri J, Buhard O, Penard-Lacronique V, Thomas G, Hamelin R, Duval A. Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 2005;14:2435–2442.
  37. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanen A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Flejou JF, Duval A. [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bull Cancer* 2008;95:121–132.
  38. Rodan AR, Jenny A. WNK kinases in development and disease. *Curr Top Dev Biol* 2017;123:1–47.

39. Serysheva E, Mlodzik M, Jenny A. WNKs in Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Cycle* 2014;13:173–174.
40. Cong X, Lu C, Huang X, Yang D, Cui X, Cai J, Lv L, He S, Zhang Y, Ni R. Increased expression of glycinamide ribonucleotide transformylase is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma, and it promotes liver cancer cell proliferation. *Hum Pathol* 2014;45:1370–1378.
41. Liu X, Ding Z, Liu Y, Zhang J, Liu F, Wang X, He X, Cui G, Wang D. Glycinamide ribonucleotide formyl transferase is frequently overexpressed in glioma and critically regulates the proliferation of glioma cells. *Pathol Res Pract* 2014;210:256–263.
42. He ZY, Wu SG, Peng F, Zhang Q, Luo Y, Chen M, Bao Y. Up-Regulation of RFC3 promotes triple negative breast cancer metastasis and is associated with poor prognosis via EMT. *Transl Oncol* 2017;10:1–9.
43. Shen H, Cai M, Zhao S, Wang H, Li M, Yao S, Jiang N. Overexpression of RFC3 is correlated with ovarian tumor development and poor prognosis. *Tumour Biol* 2014;35:10259–10266.
44. de Miguel FJ, Sharma RD, Pajares MJ, Montuenga LM, Rubio A, Pio R. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer. *Cancer Res* 2014;74:1105–1115.
45. Blomen VA, Majek P, Jae LT, Bigenzahn JW, Nieuwenhuis J, Staring J, Sacco R, van Diemen FR, Olk N, Stukalov A, Marceau C, Janssen H, Carette JE, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G, Brummelkamp TR. Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science* 2015;350:1092–1096.

---

Received January 30, 2018. Accepted June 5, 2018.

#### Correspondence

Address correspondence to: Alex Duval, MD, PhD, Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, Inserm, UMR938, Equipe Instabilité Des Microsatellites et Cancer, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France. e-mail: alex.duval@inserm.fr; fax: (33) 149284603.

#### Acknowledgments

We thank Dr Barry Iacopetta for critical reading of the manuscript. The present work has benefited from the animal facility of Saint-Antoine Research Center (PHEA, Mrs Tatiana Ledent), and the core facility of UMS30-LUMIC, CISA (Cytometry and Imagery Saint Antoine, Mrs Annie Munier), Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France.

#### Author contributions

Alex Duval, Ada Collura, Aurélien de Reyniès, Anastasia Goloudina, Laetitia Marisa, and Vincent Jonchere were responsible for the study conceptualization; Agathe Guilloux, Aurélien de Reyniès, Laetitia Marisa, Vincent Jonchere, Alex Duval, Alain Virouleau, and Ada Collura were responsible for the methodology; Ada Collura, Malorie Greene, Olivier Buhard, Romane Bertrand, Magali Svrcek, Samuel Landman, Toky Ratovomanana, Pascale Cervera, Alex Duval, Jérémie H. Lefèvre, Erell Guillerm, Florence Coulet, Mira Ayadi, Thierry André, Jean-François Fléjou, Lucile Armenoult, Sylvie Job, Fatiha Merabtene, Sylvie Dumont, Yann Parc, and Nabila Elarouci performed the investigation; Alex Duval, Vincent Jonchere, Laetitia Marisa, Ada Collura, Agathe Guilloux, and Aurélien de Reyniès wrote the original draft; and Alex Duval was responsible for supervision.

#### Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

#### Funding

This work was supported by grants Institut National Du Cancer, Programme de Recherche Translationnelle en Cancérologie “MicroSplicoter”, sites de recherche intégrée sur le cancer (SIRIC) and Heterogeneity of Tumors & Ecosystem (HTECoLi) from the Institut National du Cancer (A.D.), the Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer (A.C.), and the Canceropole Ile de France (A.C.). This work is part of the Cartes d’Identité des Tumeurs research program, which was funded and developed by the Ligue Nationale Contre le Cancer.

### 6.1.2 Article 4: Glande surrénale, un site sanctuaire pour l'immunothérapie

Adrenal gland as a sanctuary site for immunotherapy in patients with microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer

Romain Cohen<sup>1,2</sup>, Vincent Jonchère<sup>2</sup>, Christelle De La Fouchardière<sup>3</sup>, **Toky Ratovomanana**<sup>2</sup>, Quentin Letourneur<sup>2</sup>, Mira Ayadi<sup>4</sup>, Lucile Armenoult<sup>4</sup>, Adrien Buisson<sup>5</sup>, Matthieu Sarabi<sup>3</sup>, Anna Pellat<sup>1</sup>, Raphael Colle<sup>1</sup>, Francois Paye<sup>6</sup>, Pierre Meeus<sup>7</sup>, Magali Svrcek<sup>2,8</sup>, Alex Duval<sup>2</sup>, Thierry Andre<sup>1,2</sup>

Soumis pour publication



# Adrenal gland as a sanctuary site for immunotherapy in patients with microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer

Romain Cohen <sup>1,2</sup>, Vincent Jonchère <sup>2</sup>, Christelle De La Fouchardière,<sup>3</sup> Toky Ratovomanana,<sup>2</sup> Quentin Letourneur,<sup>2</sup> Mira Ayadi,<sup>4</sup> Lucile Armenoult,<sup>4</sup> Adrien Buisson,<sup>5</sup> Matthieu Sarabi,<sup>3</sup> Anna Pellat,<sup>1</sup> Raphael Colle,<sup>1</sup> Francois Paye,<sup>6</sup> Pierre Meeus,<sup>7</sup> Magali Svrcek,<sup>2,8</sup> Alex Duval,<sup>2</sup> Thierry Andre <sup>1,2</sup>

**To cite:** Cohen R, Jonchère V, De La Fouchardière C, *et al*. Adrenal gland as a sanctuary site for immunotherapy in patients with microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2021;9:e001903. doi:10.1136/jitc-2020-001903

► Prepublication history and additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-001903>).

RC and VJ contributed equally.

Accepted 10 January 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

## Correspondence to

Dr Romain Cohen;  
romain.cohen@aphp.fr

## ABSTRACT

Metastatic colorectal cancers (mCRC) harboring microsatellite instability (MSI) are sensitive to immune checkpoint inhibitors (ICIs), but the mechanisms of resistance to ICIs remain unclear. Dissociated responses in patients with ICI-treated cancer suggest that certain organs may serve as sanctuary sites due to the tumor microenvironment. This case series describes five patients with ICI-treated MSI mCRC with disease progression limited to the adrenal glands. At ICI initiation, three patients were free of metastasis in the adrenal glands. Four patients experienced objective response per RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) while treated with ICI. ICI treatment was discontinued due to progressive disease limited to the adrenal glands (n=3) or toxicity (n=2). The time between ICI initiation and progression in the adrenal glands ranged from 11 to 39 months. Adrenalectomy (n=3) and stereotactic body radiation therapy (n=2) were performed. At the last follow-up, all patients were alive and progression free. Molecular analyses were performed in one patient. A significant impairment of the antigen presentation pathway was observed in the ICI-resistant lesion of the adrenal gland, which could be explained by the presence of glucocorticoids in the adrenal gland microenvironment. We also detected an overexpression of *TSC22D3*, a glucocorticoid-target gene that functions as a mediator of anti-inflammation and immunosuppression. This case series suggests that the adrenal glands may be the sanctuary sites for ICI-treated MSI mCRC through the glucocorticoid-induced impairment of the antigen presentation machinery.

## INTRODUCTION

Microsatellite instability (MSI) is a tumor phenotype resulting from a deficient mismatch repair system (dMMR). It is observed in approximately 5% of patients with metastatic colorectal cancers (mCRC). Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have changed the treatment of patients with MSI/dMMR mCRC, with an objective response

(OR) rate ranging from 30% to 60% and a 1-year overall survival rate ranging from 72% to 85% in heavily pretreated patients.<sup>1</sup> Recently, first-line pembrolizumab has been associated with clinically meaningful and statistically significant improvement of progression-free survival compared with standard of care chemotherapy with or without bevacizumab or cetuximab.<sup>2</sup> However, up to 50% of patients with MSI/dMMR mCRC exhibit primary resistance to ICIs. Besides, 5%–25% of responders might develop acquired resistance to these treatments, knowing this estimation might increase with longer follow-up.<sup>1</sup> Mechanisms underlying *de novo* and acquired resistance to ICIs in MSI/dMMR cancer are barely known. Besides, dissociated responses have been reported in approximately 8% of patients with metastatic solid tumors treated with ICIs, suggesting potential site-specific patterns of response.<sup>3,4</sup> MSI/dMMR mCRC are associated with a specific metastatic pattern, reflected in high rates of peritoneal carcinomatosis and distant lymph node metastasis. Contrarily, adrenal glands metastases are rarely found in mCRC.

Here we report a case series of five patients with MSI/dMMR mCRC treated with ICI who experienced progression of adrenal gland metastases despite OR or disease stability of other metastatic sites, suggesting potential site-specific resistance to ICI. Translational analyses were performed for one patient, seeking for potential site-specific mechanisms of resistance.

## RESULTS

The five patients of this case series represent 2.5% of the entire population of patients with ICI-treated MSI/dMMR in our institutions. **Table 1** summarizes the disease history of these five ICI-treated mCRC cases. The age of patients ranged from 44 to 77 years. Three patients had germline MMR gene mutation. Two patients had an adrenal gland metastasis at the ICI initiation. Other metastatic sites were distant lymph nodes (4/5), liver (3/5), peritoneum and lung (1/5). Four patients were treated with a combination of an anti-PD1 monoclonal antibody and an anti-CTLA4 antibody, one received an anti-PD1 alone. Four patients experienced OR, with three partial responses and one complete response. Reasons of treatment discontinuation were progression limited to the adrenal glands (n=3) and toxicity (n=2). All five patients experienced a significant disease progression limited to the adrenal gland, with three of them being newly defined target lesions (online supplemental figure S1). The time from ICI initiation to the date of disease progression in the adrenal gland ranged from 11 to 39 months. The progressive adrenal metastases were treated with adrenalectomy (n=3) or stereotactic body radiation therapy (n=2). No other systemic anticancer treatments was initiated. At the last follow-up visit (the time from local treatment date to the last patient visit: 3–47 months), all patients were alive and free of progression.

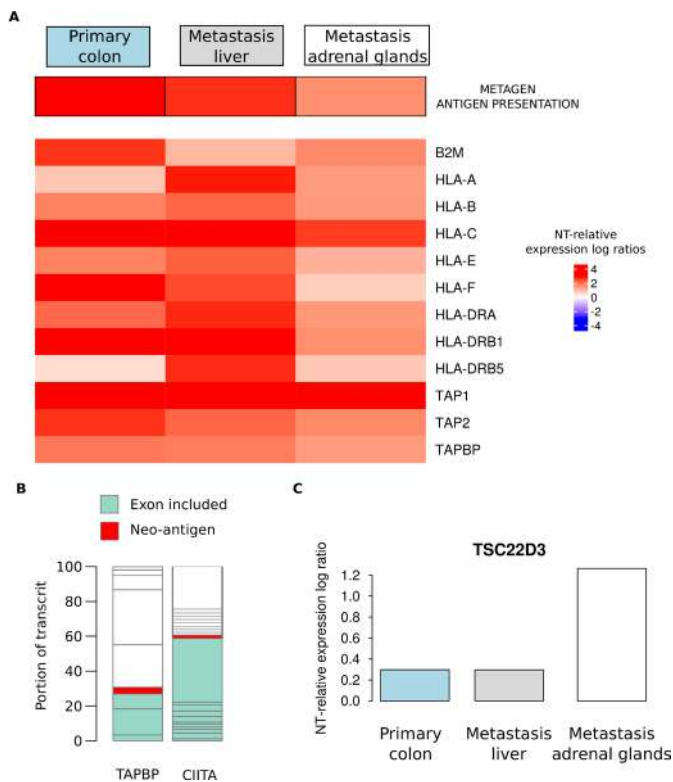
Tumor tissue samples from patient #1 were investigated to identify the potential resistance mechanisms. Paired tumor-normal tissue samples from the progressive adrenal gland, the primary tumor, and liver metastasis resected before ICI initiation were analyzed using whole-exome sequencing and RNA sequencing (Supplementary methods). All three metastatic disease sites displayed the hypermutator phenotype (online supplemental figure S2A and S3) in repetitive (43.9, 43.9, 51.7 mutations/Mb) and non-repetitive DNA sequences (29.1, 27.5, 32.0 mutations/M for the colon, liver, and adrenal tumors, respectively). All sites exhibited an MSI phenotype (online supplemental figure S2B; 34.5, 32.4, 37.0) MSI sensor score for the colon, liver and adrenal tumors, respectively).

We hypothesized that adrenal tumors could decrease their antigen presentation, leading to immune escape. For the majority of the antigen presenting genes (*HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-DRA*, *HLA-DRB1*, *TAP1*, *TAP2*, *TAPBP*) a decrease expression in the adrenal tumor was observed (figure 1A). This loss of expression might be related to the presence of glucocorticoids, which inhibit *NF-κB* gene, controlling the HLA-class I expression (online supplemental figure S4). This might be also explained by adrenal-specific mutation(s) in antigen presentation pathway. In line, we identified two candidate's mutations, namely *TAPBP* and *CIITA* (figure 1B), which are essential for the signaling pathway (online supplemental figure S4). We also detected an overexpression of *TSC22D3* (figure 1C), a glucocorticoid-target gene, which functions

Table 1 Patient clinical characteristics

Patient	Age (year), gender	Germline status	Tumor profile	Number of prior lines of chemotherapy	Metastatic sites at ICI initiation	ICI	First and last infusion of ICI	Reason of ICI discontinuation	Overall best response	Best response of adrenal gland metastasis	PD of adrenal gland metastasis (date)	Treatment of adrenal gland progression (date)	PD on other metastatic sites (date)	The last follow-up visit (status)
#1	61, F	Sporadic case	MSI, MLH1-neg, BRAFmt	1	Liver, lymph nodes	Anti-PD1 +anti-CTLA4	06/2015 to 07/2015	Necrotizing myositis	PR	NA (not present at baseline)	03/2016	Adrenalectomy (08/2016)	No	07/2020 (free of progression)
#2	44, M	Lynch syndrome	MSI, MSH2-neg, RAS/RAF-wt	2	Adrenal gland, liver, lymph nodes,	Anti-PD1 +anti-CTLA4	05/2016 to 03/2018	PD (adrenal gland)	PR	SD	03/2018	SBRT (06/2018)	No	06/2020 (free of progression)
#3	45, M	Lynch syndrome	MSI, MSH2-neg, KRAS-mt	3	Adrenal gland, liver, lymph nodes	Anti-PD1 +anti-CTLA4	09/2016 to 11/2019	PD (adrenal gland)	PR	SD	12/2019	SBRT (03/2020)	No	06/2020 (free of progression)
#4	52, M	Lynch syndrome	MSI, MSH6-neg, MSH6-neg	0	Peritoneum	Anti-PD1	07/2017 To 02/2019	Grade 3 colitis	CR	NA (not present at baseline)	12/2019	Adrenalectomy (03/2020)	No	06/2020 (free of progression)
#5	77, F	Unknown	MLH1-neg, PMS2-neg, βcatenine-mt	3	Lung, lymph nodes	Anti-PD1 +anti-CTLA4	01/2019 To 01/2020	PD (adrenal gland)	SD	NA (not present at baseline)	12/2019	Adrenalectomy (03/2020)	No	06/2020 (free of progression)

CR, complete response; ICI, immune checkpoint inhibitor; MSI, microsatellite instability; mt, mutated; neg, negative; PD, progressive disease; PR, partial response; SBRT, stereotactic body radiation therapy; SD, stable disease; wt, wild type.



**Figure 1** Potential resistance mechanism. The heatmap shows the percentage of nucleotide (NT) relative expression ratios at three tumor sites for key genes from the antigen presentation pathway. (A) Biological consequence of two microsatellite mutations on two key genes of the antigen presentation pathway. (B) Box plot represents NT relative expression ratio across tumor sites for *TSC22D3* gene (C).

as a mediator of anti-inflammation and immunosuppression and has been shown to abolish the therapeutic benefit of PD-1 blockade in mouse models of cancers.<sup>5</sup> Our analysis of the tumor microenvironment using Microenvironment Cell Populations-counter (MCP-counter) did not show significant differences in cell populations according to the tumor site. There were no significant differences for expressions of gene (*PDCD1*, *PDCD1LG2*, *CTLA4*, and *HAVCR2*) encoding for checkpoint proteins (PD1, PDL2, CTLA4, and TIM3, respectively; data not shown).

## DISCUSSION

We report here a case series of five patients with MSI/dMMR mCRC who experienced disease progression limited to the adrenal gland while on ICIs. To our knowledge, this is the first report suggesting the site-specific resistance to ICIs of MSI/dMMR tumors. Molecular analysis of one patient showed a significant decrease of expression of the antigen presentation pathway genes in the ICI-resistant adrenal gland.

The concept of the sanctuary sites, such as the brain, ovary, or testis is well known in the context of cytotoxic chemotherapy. In the era of immunotherapy it is supported by the existence of dissociated tumor responses.<sup>4</sup> Besides, retrospective studies suggest that the

sensitivity to ICIs may depend on the metastatic site, with lung lesions being more likely to achieve OR than other sites such as liver metastases.<sup>6</sup> The differential responses to treatment observed according to the site of metastasis suggest that the tumor microenvironment is involved in the intrapatient heterogeneity of tumor response.

Few clinical case reports of ICI-treated solid tumors and surgical series of patients with melanoma suggest that adrenal glands might be a sanctuary for tumor cells.<sup>7</sup> No warning signal has been reported for patients with lung cancer, though.<sup>3</sup> Our case series with five tumor progressions limited to the adrenal glands in patients with MSI/dMMR mCRC is striking since CRC involving adrenal glands is uncommon. The fact that these cases had no PD in other metastatic sites after local treatment (surgery or stereotactic body radiation therapy) supports the use of local therapies in case of progression limited to the adrenal glands. One unresolved question is whether ICI should be maintained beyond progression limited to a sanctuary site.

The systemic administration of synthetic glucocorticoids such as dexamethasone and prednisolone has been associated with poorer outcomes in patients with ICI-treated cancer.<sup>8</sup> It has been shown that both synthetic and endogenous glucocorticoids can inhibit anticancer immune response through an impairment of the antigen presentation by dendritic cells or the activation of T-cells.<sup>9</sup> Given that endogenous glucocorticoids is produced by the adrenal glands, one might hypothesize the adrenal gland microenvironment might be immunosuppressive and acts as a sanctuary site for ICI-treated neoplasms tumor cells.

From the molecular data of one analyzed patient, we conclude that the mechanism underlying the acquired resistance of the tumor to ICI was not related to a loss of the MSI phenotype. All tumor samples of this single patient (the primary colon tumor, liver metastasis, and refractory adrenal gland lesion) presented an MSI phenotype associated with high mutation burden. A defect in the antigen presentation processing was likely to be involved and we hypothesize therefore that this may act synergistically with local immunosuppression for the adrenal gland metastasis resistance in this patient. This hypothesis is strengthened by the work of Yang *et al*<sup>5</sup> who showed in mouse models that *TSC22D3* abolishes the therapeutic effect of PD-1 blockade. Since an antigen presentation is known as a mechanism of acquired resistance to ICIs,<sup>10</sup> we hypothesize that the adrenal gland might be a sanctuary of ICI-treated cancer through the glucocorticoid-induced impairment of the antigen presentation machinery.

We acknowledge some limitations of our work. Only one patient has his tumor samples analyzed with the adrenal gland sample collected at the time of disease progression when on ICI and the primary tumor and the liver metastasis samples before the ICI initiation. Another limitation was the lack a control group to evaluate the relationship between dissociated tumor responses and the adrenal gland involvement. Therefore, the interpretation of our

results, which deserve confirmation in larger studies, should be interpreted with caution. Molecular investigations of ICI-resistant MSI/dMMR mCRC metastases (from adrenal glands and other sites) are urgently needed to decipher microenvironment-related mechanisms of resistance to ICI and, eventually, identify other sanctuary sites.

In conclusion, our case series highlights the importance of giving attention to the adrenal glands in patients treated with ICIs for MSI/dMMR mCRC.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Sorbonne Université; Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

<sup>2</sup>Sorbonne Université, INSERM UMRS 938, Équipe Instabilité des Microsatellites et Cancer, Équipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer et SIRIC CURAMUS, Centre de recherche Saint Antoine, Paris, France

<sup>3</sup>Medical Oncology Department, Centre Leon Berard, Lyon I University, Lyon, France

<sup>4</sup>Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, Paris, France

<sup>5</sup>Centre Léon Berard, Department of Biopathology, Lyon, Paris

<sup>6</sup>Sorbonne Université; Department of Digestive Surgery, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

<sup>7</sup>Centre Leon Berard, Department of Surgery, Lyon, France

<sup>8</sup>Sorbonne Université; Department of Pathology, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

**Acknowledgements** The authors thank Magdalena Benetkiewicz, Sc.D, for editorial assistance.

**Contributors** Data collection: RC, CDLF, MS, TA. Translational analysis: VJ, TR, QL, MA, LA, AD. Data interpretation: RC, VJ, CDLF, TR, QL, MA, LA, AB, MS, AP, RC, FP, PM, MS, AD, TA. Manuscript drafting: RC, VJ, AD, TA. Manuscript reviewing: RC, VJ, CDLF, TR, QL, MA, LA, AB, MS, AP, RC, FP, PM, MS, AD, TA.

**Funding** The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

**Competing interests** Dr André reports consulting/advisory role and or received honoraria from Amgen, Bristol-Myers Squibb, Chugai, Clovis, GlaxoSmithKline, Gristone oncology, HaliuDx, MSD Oncology, Pierre Fabre, Roche/Ventana, Sanofi, Servier and Tesaro and has received travel, accommodations, and expenses from Roche/Genentech, MSD Oncology, and Bristol-Myers Squibb. Dr Cohen reports honoraria from MSD Oncology, and research grant from Servier Institute. Dr Pellat reports honoraria from Servier and travel fees from Ipsen. Dr Svrcek reports consulting/advisory role and or received honoraria from Bristol-Myers Squibb, Astellas, MSD Oncology, Sanofi, and has received travel, accommodations, and expenses from Bristol-Myers Squibb and Ventana/Roche. The other authors did not report any conflict of interest.

**Patient consent for publication** Obtained.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Supplemental material** This content has been supplied by the author(s). It has not been vetted by BMJ Publishing Group Limited (BMJ) and may not have been

peer-reviewed. Any opinions or recommendations discussed are solely those of the author(s) and are not endorsed by BMJ. BMJ disclaims all liability and responsibility arising from any reliance placed on the content. Where the content includes any translated material, BMJ does not warrant the accuracy and reliability of the translations (including but not limited to local regulations, clinical guidelines, terminology, drug names and drug dosages), and is not responsible for any error and/or omissions arising from translation and adaptation or otherwise.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

#### ORCID iDs

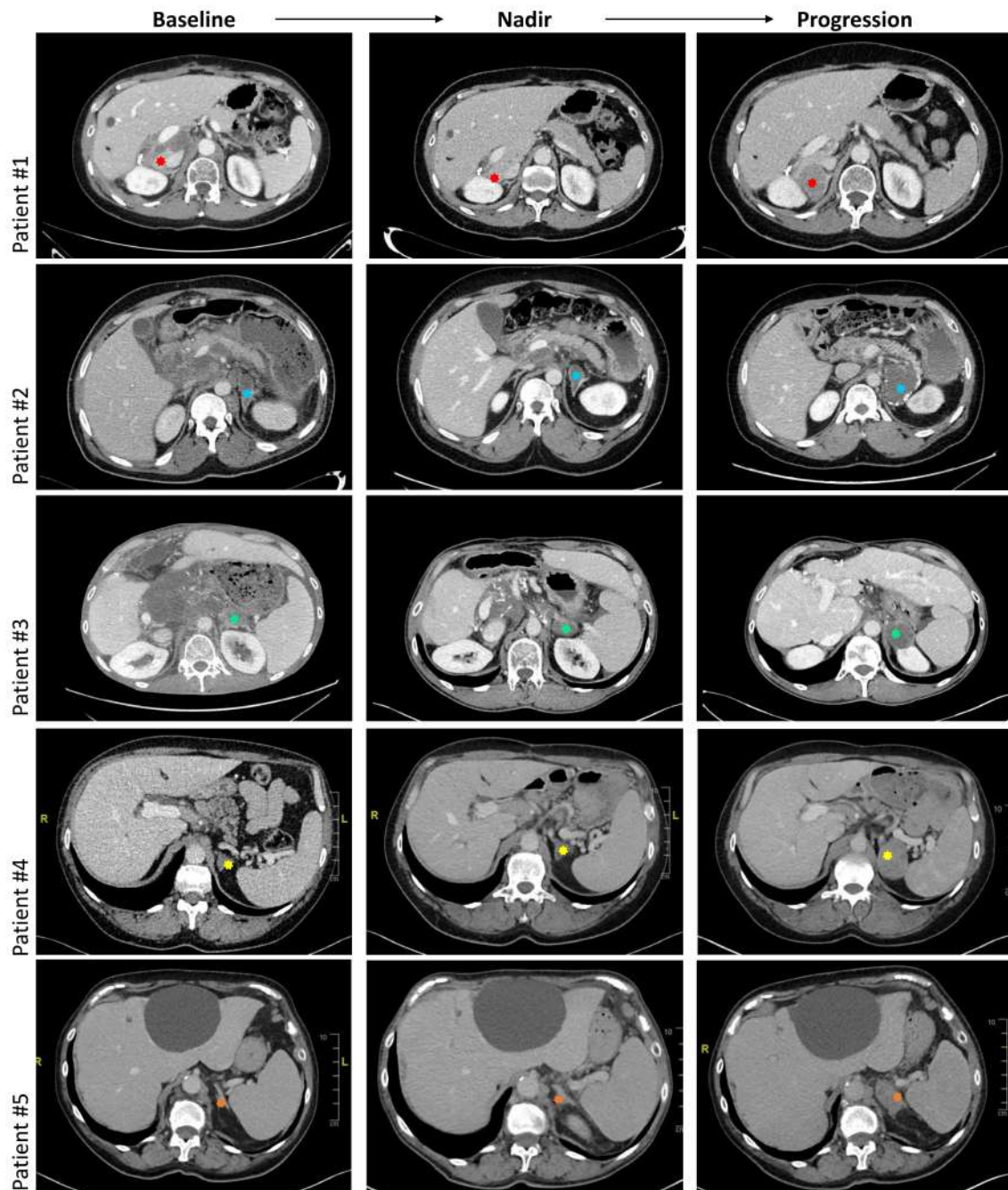
Romain Cohen <http://orcid.org/0000-0001-9602-5162>

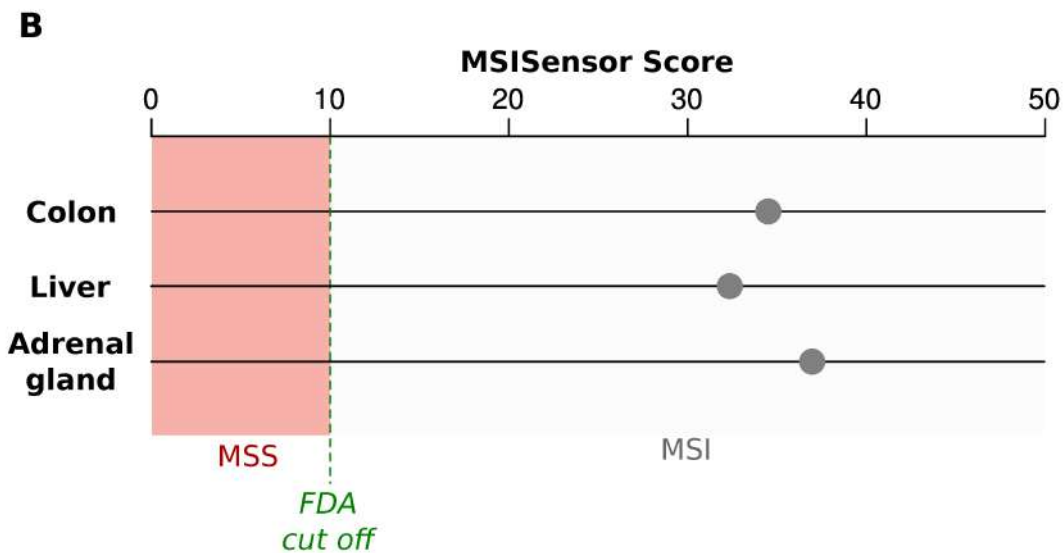
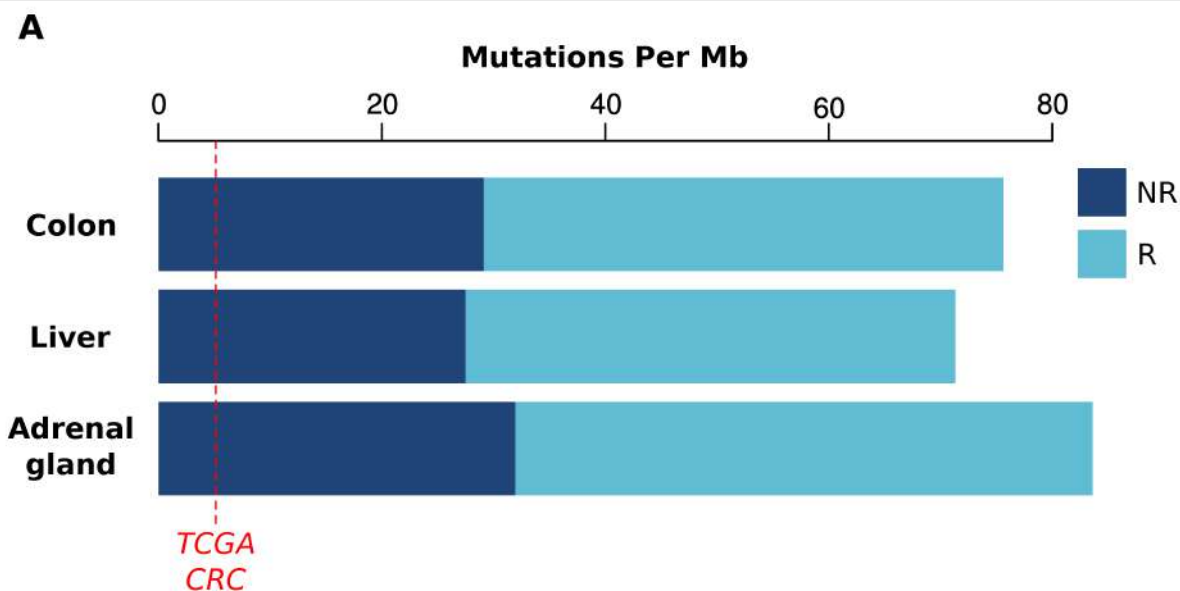
Vincent Jonchère <http://orcid.org/0000-0002-1925-6650>

Thierry Andre <http://orcid.org/0000-0002-5103-7095>

#### REFERENCES

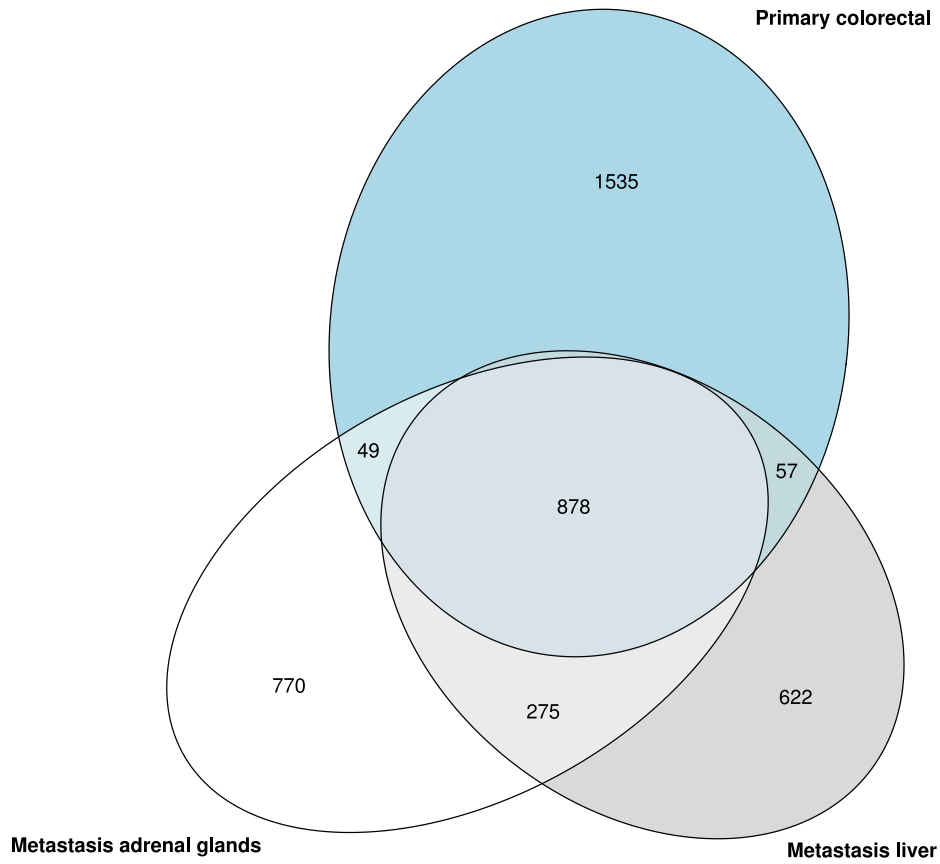
- Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, *et al*. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:773–9.
- Andre T, Shiu K-K, Kim TW, *et al*. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: the phase 3 KEYNOTE-177 study. *JCO* 2020;38:LBA4.
- Tazdait M, Mezquita L, Lahmar J, *et al*. Patterns of responses in metastatic NSCLC during PD-1 or PDL-1 inhibitor therapy: comparison of RECIST 1.1, irRECIST and iRECIST criteria. *Eur J Cancer* 2018;88:38–47.
- Vaflard P, Paoletti X, Servois V, *et al*. Dissociated responses in patients with metastatic solid tumours treated with immunotherapy. *Annals of Oncology* 2019;30:v521.
- Yang H, Xia L, Chen J, *et al*. Stress-glucocorticoid-TSC2D3 axis compromises therapy-induced antitumor immunity. *Nat Med* 2019;25:1428–41.
- Pires da Silva I, Lo S, Quek C, *et al*. Site-Specific response patterns, pseudoprogression, and acquired resistance in patients with melanoma treated with ipilimumab combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer* 2020;126:86–97.
- Nguyen MC, Shah MH, Liebner DA, *et al*. The adrenal gland as a sanctuary site of metastases after pembrolizumab treatment: a case series. *J Natl Compr Canc Netw* 2018;16:1279–83.
- Petrelli F, Signorelli D, Ghidini M, *et al*. Association of steroids use with survival in patients treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Cancers* 2020;12. doi:10.3390/cancers12030546. [Epub ahead of print: 27 Feb 2020].
- Falcón-Beas C, Tittarelli A, Mora-Bau G, *et al*. Dexamethasone turns tumor antigen-presenting cells into tolerogenic dendritic cells with T cell inhibitory functions. *Immunobiology* 2019;224:697–705.
- Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, *et al*. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun* 2017;8:1136.





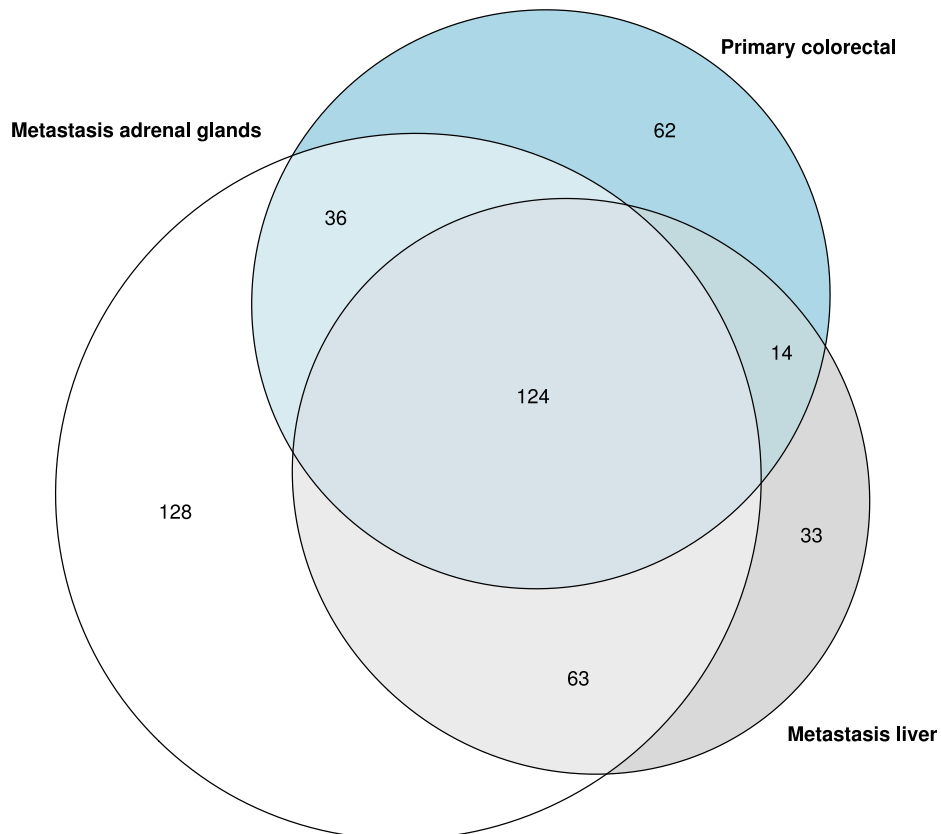
**A**

**Non Repeat**

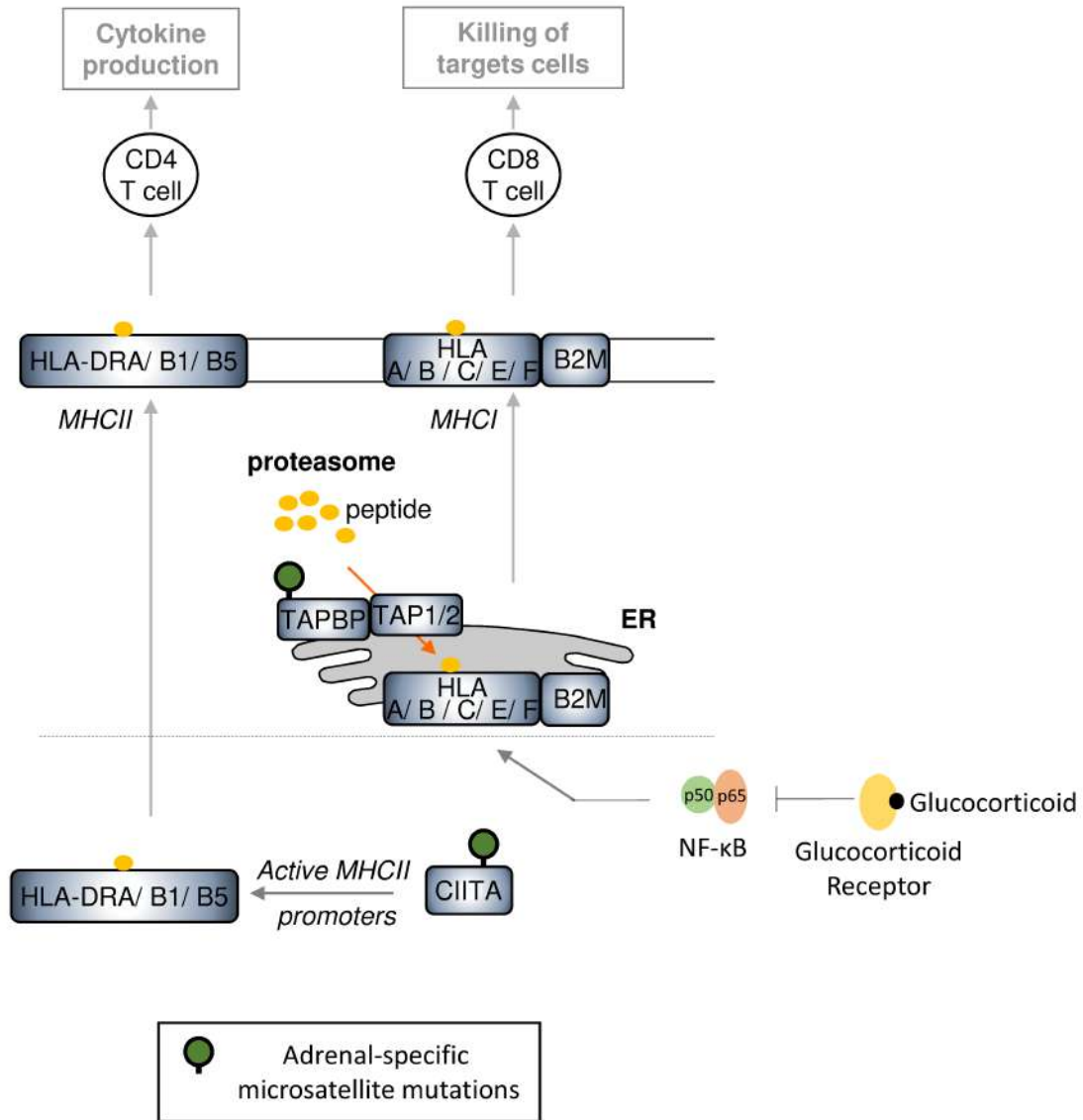


**B**

**Repeat**



# Ag presentation





## **SUPPLEMENTARY METHODS**

### Data collection

Informed consent was obtained for all patients included in the study. Patients' medical and pathological records were analyzed for demographic and clinical characteristics, treatments received, and survival.

### Whole exome and RNA sequencing

For the patient #1, DNA and RNA have been simultaneously purified with AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit for frozen tissue and AllPrep DNA/RNA FFPE Kit for FFPE cores, according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Their concentrations were determined by the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer at 260/280 nm (NanoDrop Technologies, Inc.). The nucleic acids quality and integrity were analyzed with the Agilent TapeStation 2200 system.

The whole exome sequencing procedure was performed following the manufacturer's recommendations (SureSelect Human Exon Kit v5, 75 MB; Agilent) as previously described [1]. The generated reads were mapped to reference genome hg38 (GRCh38). Identification of SNVs (Single Nucleotide Variations) and small insertions/deletions was performed via the Broad Institute's MuTect tool 2.0 for somatic DNA [2]. The somatic mutations were filtered as follows: Total Reads > 10, Somatic score > 3, Mutated Allele Frequency in Tumor tissue  $\geq$  5%, Mutated Allele Count in Tumor tissue  $\geq$  3, Mutated Allele Frequency in Constitutional tissue < 4%. Somatic repetitive mutations were identified using the MSICare program (<https://github.com/MSI.CRSA/MSICare>). The Next Generation Sequencing (NGS) MSI status was determined using the MSISensor program [3].

RNA sequencing procedure was performed following the manufacturer's recommendations (quantseq-3mrna-sequencing; Lexogen). The generated reads were mapped using STAR [4] to the reference genome hg38 (GRCh38) and normalized using the DESeq2 normalization method

[5]. Immune infiltrate and stromal cells were estimated using MCP-counter [6]. Immune checkpoint and modulator genes were selected from our previous publication [7].

#### Supplementary references

1. Jonchere V, Marisa L, Greene M, Virouleau A, Buhard O, Bertrand R, et al. Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6:277–300.
2. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013;31:213–9.
3. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn*. 2015;17:251–64.
4. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15–21.
5. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550.
6. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol*. 2016;17:218.
7. Marisa L, Svrcek M, Collura A, Becht E, Cervera P, Wanherdrick K, et al. The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110.

**SUPPLEMENTARY FIGURES**

**Supplementary Figure S1:** Radiological evolution of the adrenal glands under immune checkpoint inhibition

**Supplementary Figure S2:** Progressive adrenal, colon or liver tumors displaying the microsatellite instability phenotype

(A) Bar plots represent the number of mutations per megabase (Nb mutations/Mb) across the whole exome for 3 tumor sites of patient #1 in repetitive DNA sequences (R, light blue) and in non-repetitive DNA sequences (NR, dark blue). The median mutation rate in all types of CRC was described previously [25] and is indicated by the red dotted line.

(B) Distribution of MSISensor scores. Dots represent the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from whole exome sequencing of 3 tumor sites of patient #1. The cutoff of MSISensor score at 10 (FDA recommendation) was used to differentiate MSS from MSI tumors (green dotted line).

**Supplementary Figure S3:** Overlapping mutational signature. Venn diagram showing the overlap between colon, liver, and adrenal tumors in DNA non-repetitive (A) and repetitive DNA sequences (B) of patient #1.

**Supplementary Figure S4:** Schematic diagram illustrating the potential mechanism of immune escape of antigen presentation pathways genes in the adrenal tumors of patient #1.

### **6.1.3 Article 5: Impact du statut HSP110 T17 chez les patients atteints d'un cancer MSI gastrique résécable**

HSP110 T17 Mutation Status Predicts Prognosis and Treatment Response in Patients with Resectable Gastric Cancer with Microsatellite Instability

\*L'intégralité de l'article sera ajouté avant la soutenance de ma thèse

# 1 ORIGINAL INVESTIGATION

## 2 HSP110 T17 Mutation Status Predicts Prognosis and Treatment 3 Effectiveness in Patients with Resectable Gastric Adenocarcinoma with 4 Microsatellite Instability

5 Florence Renaud, MD, PhD, 1, 2 ^, Olivier Buhard, 1 ^, Vincent Jonchère, PhD, 1 ^, Aurelie Siret, 1, Pierre  
6 Bourgoin, 1, Pascale Cervera, MD, PhD, 1, 3, Magali Svrcek, MD, PhD 1, 3, Jean-François Fléjou, MD, PhD,  
7 1, Kathleen Noël, 1, Toky Ratovomanana, 1, Quentin Letourneur, 1, Coralie Dorard, 1, PhD, Lucie  
8 Delattre, 4, Thibault Voron, MD, 5, Jérémie H Lefevre, MD, PhD, 1, 5, Yann Parc, MD, PhD, 1, 5, Raphaël  
9 Colle, MD, 1, 6, Romain Cohen, MD, PHD, 1, 6, Thierry Andre, MD, 1, 6, Philippe Le Rouzic, PhD, 1,  
10 Alexandre Perrier, MD, 1, 7, Erell Guillerm, PharmD, 1, 7, Florence Coulet, PharmD, PhD, 1, 7, Arzu  
11 Ensari, MD, PhD, 8, Franco Roviello, MD, PhD, 9, Giovanni Corso, PhD, 9, Raquel Seruca, MD, PhD, 10,  
12 Benoit Terris, MD, PhD, 11, Meike Kohlruss, MD, 12, Gisela Keller, PhD, 12, Antoine Adenis, MD, PhD, 13,  
13 Clarisse Eveno, MD, PhD, 14, Guillaume Piessen, MD, PhD, 14, 15 Marie-Pierre Buisine, PharmD, PhD, 4,  
14 15 Ada Collura, PhD, 1 \*, Alex Duval, MD, PhD, 1, 7 \*\*

15 \* Co-leaders

16 ^ Co-first authors

17 1- Sorbonne Université, INSERM, Unité Mixte de Recherche Scientifique 938 and SIRIC  
18 CURAMUS, Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe Instabilité des Microsatellites et  
19 Cancer, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, F-75012 Paris, France

20 2- CHU Lille, Institut de Pathologie, Lille F-59000, France

21 3- Sorbonne Université, Department of Pathology, AP-HP, hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris,  
22 France

23 4- Molecular Oncogenetics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lille University  
24 Hospital, F-59000 Lille, France

- 25 5- Sorbonne Université, Department of Digestive Surgery, AP-HP, hôpital Saint-Antoine, F-75012  
26 Paris, France
- 27 6- Sorbonne Université, Department of Medical Oncology, AP-HP, hôpital Saint-Antoine, F-75012  
28 Paris, France
- 29 7- Sorbonne Université, Department of Molecular Biology and Genetics, AP-HP, Hospital Pitié-  
30 Salpêtrière, F-75012 Paris, France
- 31 8- Ankara University School of Medicine, Department of Pathology, Ankara, Turkey
- 32 9- Department of Medicine, Surgery and Neurosciences, Unit of Surgical Oncology, University of  
33 Siena, 53100, Siena, Italy
- 34 10- Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP),  
35 Porto, Portugal
- 36 11- Department of Pathology, Cochin Institute, Paris, France
- 37 12- Institute of Pathology, TUM School of Medicine, Technical University of Munich, 81675  
38 Munich, Germany
- 39 13- IRCM, Inserm, Montpellier University, ICM, Montpellier, France
- 40 14- University Lille, Department of Digestive and Oncological Surgery, Claude Huriez University  
41 Hospital, F-59000 Lille, France
- 42 15- Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 CANTHER - Cancer Heterogeneity  
43 Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

44 **Acknowledgments:** A.D. group has the label “La Ligue Contre le Cancer” and the label SIRIC. This work  
45 was supported by grants from the Institut National du Cancer and DGOS (to SIRIC CURAMUS). F.R. was  
46 a recipient of a grant from the foundation Nuovo Soldati. T. R. was a recipient of a grant from the  
47 Region Ile-de-France (PhD Student bursary). K.N. was a recipient of a grant from the French Ministry of  
48 Research and French National League Against Cancer (PhD Student Bursary). No funding bodies had  
49 any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the  
50 manuscript. All authors have declared no conflicts of interest.

51 **KEY POINTS (75–100 words)**

52 **Question:** What are the determinants of primary resistance in resectable gastric adenocarcinoma  
53 (ResGA) with microsatellite instability (MSI)/mismatch repair deficiency (dMMR) that have been  
54 reported to not benefit from neoadjuvant and/or adjuvant chemotherapy?

55 **Findings:** MSI ResGA patients are divided into two distinct groups based on clinical outcomes  
56 regardless of the treatment modalities due to the presence or absence of frequent inactivating  
57 mutations affecting the oncogenic chaperone HSP110 in tumor DNA (LT17M).

58 **Meaning:** Together with MSI, the determination of HSP110 LT17M mutation status is required in  
59 future clinical trials conducted to improve the response of MSI ResGA patients to treatment.

60

## 6.2 Brevet: Méthode de diagnostic des cancers MSI

EP21305121 / EB20020: METHOD TO DIAGNOSE MSI CANCER

### Résumé du brevet:

Au cours de ma thèse, un brevet a été déposé dont je suis co-inventeur. Il est relatif au travail dont les résultats sont publiés dans la revue Gastroenterology. L'invention repose sur la conception et la validation du nouvel algorithme diagnostique nommé MSICare que nous avons proposé comme nouvel outil pour l'identification du phénotype MSI d'une tumeur par NGS à partir de l'analyse de l'ADN tumoral en comparaison du tissu sain. L'inventivité de la méthode repose sur plusieurs critères, en particulier (i) le choix des microsatellites d'intérêt pour identifier l'instabilité microsatellitaire dans l'ADN tumoral ; (ii) la manière d'intégrer le signal d'instabilité dans ces séquences d'intérêt en comparaison du tissu sain, en tenant compte de la nature de ce signal et de sa dilution dans un signal contaminant le tissu tumoral de manière connue. La haute précision de MSICare pour la détection des MSI dans les tumeurs CCR et non CCR devrait lui permettre de devenir un futur test de référence pour évaluer le statut MSI en pan-cancer. Des analyses sont en cours pour améliorer la méthode MSICare, afin de la rendre encore plus affine pour détecter MSI en pan-Cancer, en l'absence de référence à l'ADN normal pairé, et en particulier dans des biopsies liquides (ADN tumoral circulant).





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000501101	
Application number	EP21305121.2	
File No. to be used for priority declarations	EP21305121	
Date of receipt	29 January 2021	
Your reference	DUVAL20020NC	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	METHOD TO DIAGNOSE MSI CANCER	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\text_20020 EP.pdf (40 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\Drawings_20020 EP.pdf (12 p.)
Submitted by	CN=Alexis Fialkovsky 61969	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	29 January 2021, 15:03:19 (CET)	
Official Digest of Submission	51:08:5E:E5:EB:4C:E5:29:ED:9E:DC:4B:F1:C1:B1:72:D3:1F:97:E1	

/INPI, section dépôt/

## METHOD TO DIAGNOSE MSI CANCER

---

### FIELD OF THE INVENTION:

5           The present invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising notably extracting and sequencing DNA from a tumoral sample and if available from a normal sample and operate an analyse of MNRs.

### BACKGROUND OF THE INVENTION:

10           The human tumor phenotype referred to as microsatellite instability (MSI) is associated with inactivating alterations in mismatch repair (MMR) genes. MSI was first reported in inherited tumors associated with Lynch syndrome. This is one of the most frequent cancer predisposition syndromes in humans and requires specific care and genetic counseling. MSI was later observed in sporadic colorectal cancer (CRC) and more rarely in other primary tumors  
15 (1-4). Tumors with MSI generally show a dense infiltration with cytotoxic T-cell lymphocytes (5). Recently, it was reported that MSI tumors and notably MSI CRC resist this hostile immune microenvironment by overexpressing immune checkpoint (ICK)-related proteins to allow immune-escape (6, 7). Furthermore, MSI status was shown to predict clinical benefit from ICK inhibitors (ICI) in patients with metastatic CRC (mCRC) (8-11). These observations have led  
20 to international guidelines recommending universal MSI/dMMR screening of all newly diagnosed CRC (12). There is also increasing evidence to support the evaluation of MSI status in all human tumors, regardless of the primary tissue of origin.

          Several specialized cancer centers, including ours, have aimed to standardize and validate the accepted reference methods for testing MSI and dMMR in CRC, i.e. polymerase  
25 chain reaction (PCR)-based methods for MSI (13-15) and immunohistochemistry (IHC) for dMMR (see also 16 for review). In mCRC, we recently highlighted that misinterpretation of the results for MSI and/or MMR testing using these gold standard methods could account for most cases showing primary resistance to ICI (17). In the meantime, an alternative FDA-approved method based on next generation sequencing (NGS) technology was reported for MSI  
30 screening in pan-cancer, including CRC (18). This was based on the use of an algorithm, namely MSISensor, that analyzes sequence reads at designated microsatellite regions in tumor and paired normal samples and reports the percentage of unstable loci as a cumulative score in the tumor (19). However, the diagnostic performance of MSISensor has yet to be evaluated in patient cohorts where the MSI/dMMR status was already been established using the reference

IHC and MSI-PCR methods, notably in the prospective setting of mCRC patients treated with ICI.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION:**

5 In the present work, the aim of the inventors was therefore to evaluate the performance of MSISensor for the detection of MSI in dMMR/MSI mCRC from multicenter, prospective patients involved in clinical trials with ICI (NCT02840604 and NCT033501260). To avoid misdiagnoses, they have previously reassessed dMMR and MSI status in all CRC samples in an expert center using IHC and MSI-PCR. To further evaluate the results obtained with  
10 MSISensor in human cancers, they also analyzed a retrospective, multicenter series of mCRC and non-metastatic CRC (nmCRC), as well as a publicly available series of CRC and other primary tumor types that frequently display MSI. The present findings demonstrate that the FDA-approved NGS-based diagnostic test for identifying MSI in mCRC and nmCRC gave inaccurate results when compared with the gold standard reference methods. Importantly, this  
15 misdiagnosis included 3 mCRC patients that showed a positive response to ICI but would not have been treated if MSISensor alone had been used for MSI screening without reference to the IHC and MSI PCR methods. Consequently, whole exome sequencing (WES) data from all samples was further analyzed to improve detection of the MSI genomic signal in CRC and other primary tumor types. This allowed them to identify the weaknesses and limits of MSISensor  
20 and then to design and validate a newly optimized algorithm, namely MSICare. The high accuracy of MSICare for the detection of MSI in CRC and non-CRC tumors should allow it to become a future reference test for assessing MSI in pan-cancer.

Thus, the present invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising notably extracting and sequencing DNA from a tumoral sample and  
25 if available from a normal sample and operate an analyse of MNRs. Particularly, the invention is defined by its claims.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:**

The inventors have therefore developed a method which can be used when a tumoral  
30 sample from a patient is available and optionally when a normal sample from said patient is also available.

Thus, the invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample and if available from a normal sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats

(MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal sample of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral sample of said patient or sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR depending if the normal sample is available or not, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, vii) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.

In a particular aspect, the inventing relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample and if available from a normal sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal sample of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral sample of said patient or sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR depending if the normal sample is available or not, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted thanks to the TP calculated in the iv), vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, vii) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.

When a tumoral sample and a normal sample are available from a patient, the method of the invention is described as below.

Thus, a first embodiment of the invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral and normal samples obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR

and, vii) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.

In this particular embodiment, the invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral and normal samples obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted thanks to the TP calculated in the iv), vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, vii) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.

According to the first embodiment of the invention, “sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients” denotes that for this method, only the MNR having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of the patient will be considered but for the tumoral samples, the corresponding MNR will be sequenced whatever their size. For example, for a specific locus, a MNR of 12 nucleic acids in the normal samples will be sequenced and in the tumoral samples, the corresponding MNR which will be also sequenced could have a length of 11 nucleic acids or 10 acids nucleic acids for example depending of the mutations.

According to the first embodiment of the invention, the number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples will be taken into account in the method according to the invention if these repeats are covered by at least 20 mapping reads in both normal and tumoral samples.

As used herein, the term “ $\Delta$ Ratio” denotes the estimation of the number of reads in the tumoral sample compared to the normal sample and is calculated as following: for each MNR, the normalized number of reads in normal tissue is subtracted from the normalized number of reads in tumor tissue [ $\Delta$ Ratio = %Tumor-%Normal] for each MNR. For example, for a specific locus, if the read is 98 for a MNR of 20 A and 2 for a MNR of 19 A in a normal sample and 90

for a MNR of 20 A and 10 for a MNR of 19 A for a tumoral sample, the  $\Delta$ Ratio will be:  $10 - 2 = 8$  for the MNR 19 A.

Then, for all the loci, the MSI index will be the sum of the  $\Delta$ Ratio of each MNR.

As used herein, the “MSI index” or “MSI signal” or “MSIg” corresponding to the sum  
5 of  $\Delta$ Ratio values for all candidate MNR.

As used herein, the term “tumour purity (TP) for the tumour sample” denotes the estimation of the percentage of contamination for the tumour by normal tissue and is calculated according to the first embodiment of the as following: doing the median of the MSI index  
10 obtained for the MNRs equal or superior to 14 in the normal sample (= equal or superior to a length of 14 acids nucleic) and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients and covered by at least 20 reads in normal tissue and 30 reads for the tumor samples.

According to the invention, the MNR equal or superior of 14 can be in this loci:  
15 chr7:121099908-121099923, chr2:119647053-119647067, chr2:44318095-44318110, chr1:100267651-100267665, chr1:214653467-214653482.

As use herein, the term “ $\Delta$ Ratio adjusted” means the normalisation of the  $\Delta$ Ratio thanks to the TP and is calculated as following:  $\Delta$ Ratio -adjusted =  $\Delta$ Ratio x Estimated TP for the  
20 tumor sample for a specific MNR. When the  $\Delta$ Ratio -adjusted for the MNR is  $< 50\%$  that’s means that the MNR is wild type and when the  $\Delta$ Ratio adjusted is  $\geq 50\%$  that’s mean that the MNR is mutated.

As used herein, the term “MSIcare score” denotes the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR (=  $\Delta$ Ratio adjusted  
25 mutated and (+)  $\Delta$ Ratio adjusted not mutated). The result is a number between 0 and 100 (percentage). Depending of the number of analyses, the MSIcare cut-off for a MSI colorectal cancer can be between 17% and 25% and more particularly is of 21%. According to the invention and for a colorectal cancer, when the MSIcare score will be below 21, the colorectal cancer will not be a MSI colorectal cancer and when the MSIcare score will be above 21, the  
30 colorectal cancer will be a MSI colorectal cancer.

In a second embodiment of the invention, in the diagnostic of MSI cancer, the healthcare professionals may be faced with the fact that they do not have a normal sample available from the patient to perform the method of the invention. They can just have the tumoral sample from

the patient suspected to have a MSI cancer. In this case, an identification of a normal polymorphic zone of the repeats can be done thanks to free database for each repeat. Then, from the tumoral sample, only mutated repeats observed outside this normal polymorphic zone will be considered. Outside this polymorphic zone, the number of reads in the normal sample will be considered equal to zero. In this context, the several steps of the method of the invention, can be done taking this into account.

Thus, in a second embodiment, the invention also relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) evaluating the normal polymorphic zones for the MNR, iv) evaluating the mutated MNR appearing in the tumor sample only outside the normal polymorphic zone of each MNR; v) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR obtained from the tumoral sample; vi) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, vii) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, viii) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, ix) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step viii) is superior than a calculated threshold value.

In this particular embodiment, the invention also relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) evaluating the normal polymorphic zones for the MNR, iv) evaluating the mutated MNR appearing in the tumor sample only outside the normal polymorphic zone of each MNR; v) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR obtained from the tumoral sample taking into account that the normalized number of reads in normal tissue is equal to zero outside each polymorphic zone; vi) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, vii) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, viii) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, ix) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step viii) is superior than a calculated threshold value.

In this particular embodiment, the invention also relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in

the tumoral sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) evaluating the normal polymorphic zones for the MNR, iv) evaluating the mutated MNR appearing in the tumor sample only outside the normal polymorphic zone of each MNR; v) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR obtained from the tumoral sample taking into account that the normalized number of reads in normal tissue is equal to zero outside each polymorphic zone; vi) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, vii) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted thanks to the TP calculated in the vi), viii) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, ix) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step viii) is superior than a calculated threshold value.

As used herein, the information concerning the “corresponding normal sample” or “analogous normal sample” is obtained from data base and particularly free data base referencing repeats of the genome.

15

As used herein, the term “repeat” denotes the number of nucleic acids (or nucleic bases) repeated for a specific locus. So the term “repeat” denotes a length of nucleic acids. For example, if the repeat is 12 for the nucleic acids A (adenine), this means that the nucleic acids A is repeated 12 time consecutively in a specific locus. According to the invention, as used herein, the term “repeat” as the same meaning than “microsatellite”.

20

As used herein, the term “mutated repeat” (or “mutated MNR”) denotes that the repeat is mutated (deletion or addition of one or several nucleic acids) compared to the normal repeat (find in normal sample). A repeat is mutated in a context of MSI cancer for example.

25

As used herein, the term “non-mutated repeat” (or “non-mutated MNR”) denotes that the repeat has no mutation (deletion or addition of one or several nucleic acids) compared to the normal repeat (find in normal sample).

As used herein, the term “polymorph” or “polymorphic repeat” denotes the different size of repeat that we can find in a sample. Thus, a “polymorphic zone” denotes the different repeats that we can find in a sample and a “normal polymorphic zone” denotes the different repeats that we can find in a normal sample (not mutated). For example, in a normal context (or MSS context), for a given repeat, said repeat could have a size of 15 or 16 nucleic acids. In a MSI context, the same repeat could have a size of 13, 14, 15 or 16 nucleic acids. Thus, in this example, the normal polymorphic zone for the normal sample will be between 15 and 16 and

30



thus all repeat of 13 or 14 nucleic acids will be considered as mutated repeats and thus will be considered according to the second aspect of the invention. Thus and according to the second embodiment, the  $\Delta$ Ratio is calculated thanks to the same method describe above. For example, for the mutations which will be identified outside the polymorphic zone, the %Normal can be equal to zero (0) and thus the  $\Delta$ Ratio can be equal to %Tumor as described above.

According to the second embodiment of the invention, the number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples will be taking to account in the method according to the invention if these repeats are covered by at least 20 mapping reads only in the tumor samples.

According to the second embodiment of the invention, the tumour purity is calculated as following: doing the median of the MSI index obtained for the MNRs equal or superior to 14 (= equal or superior to a length of 14 acids nucleic) in the normal sample (obtained thanks to a database for example) and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients and covered by at least 30 reads for the tumor samples.

As used herein, the term “mononucleotide repeats (MNR) denotes that the repeat have just a repetition of a unique nucleic acid. For example, a mononucleotide repeat for the nucleic acid A and having a length of 12 means a repetition of the nucleic acid A 12 times consecutively.

As used herein, the term “the number of repeat” denotes the number of time when a “repeat” of a specific length (for example 14 consecutive nucleic acids A) for a specific locus is repeated. Thus, “the number of repeat” also denotes the number of loci containing a given repeat.

As used the term “read” denotes a DNA fragment produced by a sequencer instrument which are exact copies of the locus to be sequenced and are used to determine the content and sequential order of its nucleic acids.

As used herein, the term “N” denotes the number maximal of repeat of one specific sequencing assay which also corresponds to the number of loci tested. This number can begin to 1 up to a large number.

As used herein the term “sample” refers to any biological sample obtained from the patient that is liable to contain DNA, particularly germinal DNA and particularly cancerous DNA (DNA from cancerous cell). Typically, samples include but are not limited to body fluid samples, such as blood, plasma or serum. In a particular embodiment, the sample is the peripheral blood mononuclear cell (PBMC), primary blood cells (PBCs) or tumor circulating

cells. In a particular embodiment, germinal DNA obtained from PBMCs or PBCs will be used to diagnose MSI cancer. In a particular embodiment, the sample can be frozen or not and the sample can come from primary tumor or metastatic tumor. According to the invention, “normal sample” means also “healthy sample” or “wild-type sample” that is to say a sample without mutations, obtained from non-cancerous cell or cancerous-cell (MSS cancer) compared to a tumoral sample which will contain mutagens (MSI cancer).

As used herein, the term “MSI cancer” denotes that an instability is detected in at least 2 microsatellite markers. On the contrary, if instability is detected in one or no microsatellite marker, then said cancer is a “MSS cancer” This definition is valuable only if the diagnostic is done by the pentaplex method (see for example Suraweera N et al., Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology. 2002 or Buhard O et al., Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. J Clin Oncol.2006). A “MSS cancer” denotes to a cancer having stable microsatellite. A “MSI cancer” refers to a cancer having microsatellite instable.

Particularly, the method of the invention is useful to distinguish a MSI cancer than a MSS cancer.

As used herein, the term “patient” or ‘subject” denotes a mammal. Typically, a patient according to the invention refers to any subject (particularly human) afflicted with a MSI cancer.

According to the methods of the invention, the sequencing of the mononucleotide repeats (MNR) can be done on the Whole Exome (WE) or in particular loci. For example, the loci which can be sequenced can be chr2:119647053-119647067, chr8:102275622-102275635, chr2:32465041-32465053 and chr5:14485052-14485065.

As used herein the term “nucleic acid” or “nucleic base” has its general meaning in the art and refers to a coding or non-coding nucleic sequence. Nucleic acids include DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA (ribonucleic acid) nucleic acids. Example of nucleic acid thus include but are not limited to DNA, mRNA, tRNA, rRNA, tmRNA, miRNA, piRNA, snoRNA, and snRNA. Nucleic acids thus encompass coding and non-coding region of a genome (i.e. nuclear or mitochondrial).

In a particular embodiment, the sequencing according to the invention is done to a number of loci between 10 and 10000, particularly, between 100 and 10000 and more particularly between 100 and 1000.

In a particular embodiment, the reads counts per locus after sequencing is between 10 and 4000, particularly between 100 and 4000, particularly between 1000 and 3000 and more particularly between 1500 and 2500. Particularly, the reads counts per locus after sequencing is 50, 100, 150, 200, 250; 300, 350 or 400.

5 In a particular embodiment, the lengths (x) (or number) of nucleic acids in a specific repeat is between 12 and 30 and particularly 12 and 18. According to the invention the lengths (x) (or number) of nucleic acids in a specific repeat can be 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 or 30.

As used herein, the term "cancer" has its general meaning in the art and includes, but is not limited to, solid tumors and blood borne tumors. The term cancer includes diseases of the skin, tissues, organs, bone, cartilage, blood and vessels. The term "cancer" further encompasses both primary and metastatic cancers. Examples of cancers include, but are not limited to, cancer cells from the bladder, blood, bone, bone marrow, brain, breast, colon, esophagus, gastrointestinal, gum, head, kidney, liver, lung, nasopharynx, neck, ovary, prostate, skin, stomach, testis, tongue, or uterus. In addition, the cancer may specifically be of the following histological type, though it is not limited to these: neoplasm, malignant; carcinoma; carcinoma, undifferentiated; giant and spindle cell carcinoma; small cell carcinoma; papillary carcinoma; squamous cell carcinoma; lymphoepithelial carcinoma; basal cell carcinoma; pilomatrix carcinoma; transitional cell carcinoma; papillary transitional cell carcinoma; adenocarcinoma; gastrinoma, malignant; cholangiocarcinoma; hepatocellular carcinoma; combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma; trabecular adenocarcinoma; adenoid cystic carcinoma; adenocarcinoma in adenomatous polyp; adenocarcinoma, familial polyposis coli; solid carcinoma; carcinoid tumor, malignant; branchiolo-alveolar adenocarcinoma; papillary adenocarcinoma; chromophobe carcinoma; acidophil carcinoma; oxyphilic adenocarcinoma; basophil carcinoma; clear cell adenocarcinoma; granular cell carcinoma; follicular adenocarcinoma; papillary and follicular adenocarcinoma; nonencapsulating sclerosing carcinoma; adrenal cortical carcinoma; endometrioid carcinoma; skin appendage carcinoma; apocrine adenocarcinoma; sebaceous adenocarcinoma; ceruminous; adenocarcinoma; mucoepidermoid carcinoma; cystadenocarcinoma; papillary cystadenocarcinoma; papillary serous cystadenocarcinoma; mucinous cystadenocarcinoma; mucinous adenocarcinoma; signet ring cell carcinoma; infiltrating duct carcinoma; medullary carcinoma; lobular carcinoma; inflammatory carcinoma; paget's disease, mammary; acinar cell carcinoma; adenosquamous carcinoma; adenocarcinoma w/squamous metaplasia; thymoma, malignant; ovarian stromal tumor, malignant; thecoma, malignant; granulosa cell tumor, malignant; and roblastoma,

malignant; Sertoli cell carcinoma; leydig cell tumor, malignant; lipid cell tumor, malignant; paraganglioma, malignant; extra-mammary paraganglioma, malignant; pheochromocytoma; glomangiosarcoma; malignant melanoma; amelanotic melanoma; superficial spreading melanoma; malig melanoma in giant pigmented nevus; epithelioid cell melanoma; blue nevus, malignant; sarcoma; fibrosarcoma; fibrous histiocytoma, malignant; myxosarcoma; liposarcoma; leiomyosarcoma; rhabdomyosarcoma; embryonal rhabdomyosarcoma; alveolar rhabdomyosarcoma; stromal sarcoma; mixed tumor, malignant; mullerian mixed tumor; nephroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenchymoma, malignant; brenner tumor, malignant; phyllodes tumor, malignant; synovial sarcoma; mesothelioma, malignant; dysgerminoma; embryonal carcinoma; teratoma, malignant; struma ovarii, malignant; choriocarcinoma; mesonephroma, malignant; hemangiosarcoma; hemangioendothelioma, malignant; kaposi's sarcoma; hemangiopericytoma, malignant; lymphangiosarcoma; osteosarcoma; juxtacortical osteosarcoma; chondrosarcoma; chondroblastoma, malignant; mesenchymal chondrosarcoma; giant cell tumor of bone; ewing's sarcoma; odontogenic tumor, malignant; ameloblastic odontosarcoma; ameloblastoma, malignant; ameloblastic fibrosarcoma; pinealoma, malignant; chordoma; glioma, malignant; ependymoma; astrocytoma; protoplasmic astrocytoma; fibrillary astrocytoma; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; primitive neuroectodermal; cerebellar sarcoma; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; olfactory neurogenic tumor; meningioma, malignant; neurofibrosarcoma; neurilemmoma, malignant; granular cell tumor, malignant; malignant lymphoma; Hodgkin's disease; Hodgkin's lymphoma; paragranuloma; malignant lymphoma, small lymphocytic; malignant lymphoma, large cell, diffuse; malignant lymphoma, follicular; mycosis fungoides; other specified non-Hodgkin's lymphomas; malignant histiocytosis; multiple myeloma; mast cell sarcoma; immunoproliferative small intestinal disease; leukemia; lymphoid leukemia; plasma cell leukemia; erythroleukemia; lymphosarcoma cell leukemia; myeloid leukemia; basophilic leukemia; eosinophilic leukemia; monocytic leukemia; mast cell leukemia; megakaryoblastic leukemia; myeloid sarcoma; and hairy cell leukemia. In some embodiments, the patient suffers from a colorectal cancer, more particularly a metastatic colorectal cancer.

30 In a particular embodiment, the cancer is a metastatic cancer.

In a particular embodiment, the cancer is a colorectal cancer, a gastric cancer or an endometrial cancer.

In a particular embodiment, the cancer is a metastatic colorectal cancer, a metastatic gastric cancer or a metastatic endometrial cancer.

In one embodiment, a further step of communicating the result to the patient may be added to the methods of the invention.

In a particular embodiment, the methods as described above allows to distinguish a MSS cancer to a MSI cancer

5 According to the invention, the methods are ex-vivo methods or in-vitro methods.

The MSICare of the present invention can be performed by one or more programmable processors executing one or more computer programs to perform functions by operating on input data and generating output. The algorithm can also be performed by, and apparatus can  
10 also be implemented as, special purpose logic circuitry, e.g., an FPGA (field programmable gate array) or an ASIC (application-specific integrated circuit). Processors suitable for the execution of a computer program include, by way of example, both general and special purpose microprocessors, and any one or more processors of any kind of digital computer. Generally, a processor will receive instructions and data from a read-only memory or a random access  
15 memory or both. The essential elements of a computer are a processor for performing instructions and one or more memory devices for storing instructions and data. Generally, a computer will also include, or be operatively coupled to receive data from or transfer data to, or both, one or more mass storage devices for storing data, e.g., magnetic, magneto-optical disks, or optical disks. However, a computer need not have such devices. Moreover, a computer  
20 can be embedded in another device. Computer-readable media suitable for storing computer program instructions and data include all forms of non-volatile memory, media and memory devices, including by way of example semiconductor memory devices, e.g., EPROM, EEPROM, and flash memory devices; magnetic disks, e.g., internal hard disks or removable disks; magneto-optical disks; and CD-ROM and DVD-ROM disks. The processor and the  
25 memory can be supplemented by, or incorporated in, special purpose logic circuitry. To provide for interaction with a user, embodiments of the invention can be implemented on a computer having a display device, e.g., in non-limiting examples, a CRT (cathode ray tube) or LCD (liquid crystal display) monitor, for displaying information to the user and a keyboard and a pointing device, e.g., a mouse or a trackball, by which the user can provide input to the  
30 computer. Other kinds of devices can be used to provide for interaction with a user as well; for example, feedback provided to the user can be any form of sensory feedback, e.g., visual feedback, auditory feedback, or tactile feedback; and input from the user can be received in any form, including acoustic, speech, or tactile input. Accordingly, in some embodiments, the algorithm can be implemented in a computing system that includes a back-end component, e.g.,

as a data server, or that includes a middleware component, e.g., an application server, or that includes a front-end component, e.g., a client computer having a graphical user interface or a Web browser through which a user can interact with an implementation of the invention, or any combination of one or more such back-end, middleware, or front-end components. The components of the system can be interconnected by any form or medium of digital data communication, e.g., a communication network. Examples of communication networks include a local area network (“LAN”) and a wide area network (“WAN”), e.g., the Internet. The computing system can include clients and servers. A client and server are generally remote from each other and typically interact through a communication network. The relationship of client and server arises by virtue of computer programs running on the respective computers and having a client-server relationship to each other.

Another object of the present invention is a computer-program product comprising code instructions for executing the method described above, when it is implemented by a computer.

Predetermined reference values used for comparison of the MSIcare score may comprise “cut-off” or “threshold” values that may be determined as described herein. Each reference (“cut-off”) value for MSIcare score level may be, for example, predetermined by carrying out a method comprising the steps of:

- a) providing a collection of samples from patients suffering of a cancer;
- b) determining the MSIcare score for each sample contained in the collection provided at step a);
- c) ranking the tumor tissue samples according to said level
- d) classifying said samples in pairs of subsets of increasing, respectively decreasing, number of members ranked according to their expression level,
- e) providing, for each sample provided at step a), information relating to the actual clinical outcome for the corresponding cancer patient;
- f) for each pair of subsets of samples, obtaining a Kaplan Meier percentage of survival curve;
- g) for each pair of subsets of samples calculating the statistical significance (p value) between both subsets
- h) selecting as reference value for the level, the value of level for which the p value is the smallest.

For example the MSIcare score has been assessed for 100 pancreatic cancer samples of 100 patients. The 100 samples are ranked according to their expression level. Sample 1 has the

best expression level and sample 100 has the worst expression level. A first grouping provides two subsets: on one side sample Nr 1 and on the other side the 99 other samples. The next grouping provides on one side samples 1 and 2 and on the other side the 98 remaining samples etc., until the last grouping: on one side samples 1 to 99 and on the other side sample Nr 100.

5 According to the information relating to the actual clinical outcome for the corresponding pancreatic cancer patient, Kaplan Meier curves are prepared for each of the 99 groups of two subsets. Also for each of the 99 groups, the p value between both subsets was calculated.

10 The reference value is selected such as the discrimination based on the criterion of the minimum p value is the strongest. In other terms, the expression level corresponding to the boundary between both subsets for which the p value is minimum is considered as the reference value. It should be noted that the reference value is not necessarily the median value of expression levels.

In routine work, the reference value (cut-off value) may be used in the present method to discriminate pancreatic cancer samples and therefore the corresponding patients.

15 Kaplan–Meier curves of percentage of survival as a function of time are commonly used to measure the fraction of patients living for a certain amount of time after treatment and are well known by the man skilled in the art.

20 The man skilled in the art also understands that the same technique of assessment of the expression level of a protein should of course be used for obtaining the reference value and thereafter for assessment of the expression level of a protein of a patient subjected to the method of the invention.

25 According to the invention, the MSICare cut-off was determined in an initiation cohort by choosing the rounded value where the maximum of the sum of sensitivity and specificity is obtained (Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis). Depending of the number of analyses, the MSICare cut-off for the MSI colorectal cancer can be between 17% and 25% and more particularly is of 21%. To do this, among the different usable methods the inventors applied the ‘**cutpointr**’ package (<https://github.com/thiele/cutpointr>) which estimate cutpoints that optimize a specified metric in binary classification tasks and validate performance using bootstrapping. As used herein, « specific metric » denotes the sum of sensitivity and specificity.

30

Another aspect of the invention relates to a method of diagnosing a mutation in a MNR in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumor and normal samples obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said

patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted and vi) concluding that the MNR is wild type when the  $\Delta$ Ratio -adjusted is  $< 50\%$  concluding that the MNR is mutated when the  $\Delta$ Ratio adjusted is  $\geq 50\%$ .

According to this particular aspect, of the invention also relates to a method of diagnosing a mutation in a MNR in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumor and normal samples obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted thanks to the TP calculated in the iv) and vi) concluding that the MNR is wild type when the  $\Delta$ Ratio -adjusted is  $< 50\%$  concluding that the MNR is mutated when the  $\Delta$ Ratio adjusted is  $\geq 50\%$ .

According to this method, a mutation is responsible of the apparition a cancerous cell.

In one embodiment, the mutation is a repeat or a microsatellite responsible of the apparition of an MSI cancer.

#### ***Sequencing methods:***

According to the invention, the sequencing step may be accomplished by any method, including without limitation chemical sequencing, using the Maxam-Gilbert method (Methods in Enzymology 65, 499-560 (1980)); by enzymatic sequencing, using the Sanger method Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-67 (1977)).; mass spectrometry sequencing; sequencing using a chip-based technology; and real-time quantitative PCR.

In the chemical sequencing, base specific modifications result in a base specific cleavage of the radioactive or fluorescently labeled DNA fragment. With the four separate base specific cleavage reactions, four sets of nested fragments are produced which are separated according to length by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After autoradiography, the sequence can be read directly since each band (fragment) in the gel originates from a base specific cleavage event. Thus, the fragment lengths in the four "ladders" directly translate into a specific position in the DNA sequence.

In the enzymatic sequencing, the four base specific sets of DNA fragments are formed by starting with a primer/template system elongating the primer into the unknown DNA sequence area and thereby copying the template and synthesizing a complementary strand by





induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

The term "chemotherapeutic agent" refers to chemical compounds that are effective in inhibiting tumor growth. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); a carnptothecin (including the synthetic analogue topotecan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estrarnustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimus tine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g. calicheamicin, especially calicheamicin (11 and calicheamicin 211, see, e.g., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromomophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabycin,

canninomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idanrbicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalarnycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptomgrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptapurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiothane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophospharnide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pento statin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK®; razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogennanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylarnine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridinA and anguidine); urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobromtol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-1 1 ; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; capecitabine; and phannaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are antihormonal agents that act to regulate or inhibit honnone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and phannaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

When it is concluded that the patient has a MSI cancer then the physician can take the choice to administer the patient with a targeted therapy.

5 Targeted cancer therapies are drugs or other substances that block the growth and spread of cancer by interfering with specific molecules ("molecular targets") that are involved in the growth, progression, and spread of cancer. Targeted cancer therapies are sometimes called "molecularly targeted drugs," "molecularly targeted therapies," "precision medicines," or similar names.

10 In some embodiments, the targeted therapy consists of administering the subject with a tyrosine kinase inhibitor. The term "tyrosine kinase inhibitor" refers to any of a variety of therapeutic agents or drugs that act as selective or non-selective inhibitors of receptor and/or non-receptor tyrosine kinases. Tyrosine kinase inhibitors and related compounds are well known in the art and described in U.S Patent Publication 2007/0254295, which is incorporated by reference herein in its entirety. It will be appreciated by one of skill in the art that a compound related to a tyrosine kinase inhibitor will recapitulate the effect of the tyrosine kinase inhibitor, e.g., the related compound will act on a different member of the tyrosine kinase signaling pathway to produce the same effect as would a tyrosine kinase inhibitor of that tyrosine kinase. Examples of tyrosine kinase inhibitors and related compounds suitable for use in methods of 15 embodiments of the present invention include, but are not limited to, dasatinib (BMS-354825), PP2, BEZ235, saracatinib, gefitinib (Iressa), sunitinib (Sutent; SU11248), erlotinib (Tarceva; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec; STI571), leflunomide (SU101), vandetanib (Zactima; ZD6474), MK-2206 (8-[4-aminocyclobutyl]phenyl]-9-phenyl-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naphthyridin-3(2H)-one hydrochloride) derivatives thereof, analogs thereof, and combinations thereof. Additional 25 tyrosine kinase inhibitors and related compounds suitable for use in the present invention are described in, for example, U.S Patent Publication 2007/0254295, U.S. Pat. Nos. 5,618,829, 5,639,757, 5,728,868, 5,804,396, 6,100,254, 6,127,374, 6,245,759, 6,306,874, 6,313,138, 6,316,444, 6,329,380, 6,344,459, 6,420,382, 6,479,512, 6,498,165, 6,544,988, 6,562,818, 6,586,423, 6,586,424, 6,740,665, 6,794,393, 6,875,767, 6,927,293, and 6,958,340, all of which 30 are incorporated by reference herein in their entirety. In certain embodiments, the tyrosine kinase inhibitor is a small molecule kinase inhibitor that has been orally administered and that has been the subject of at least one Phase I clinical trial, more preferably at least one Phase II clinical, even more preferably at least one Phase III clinical trial, and most preferably approved by the FDA for at least one hematological or oncological indication. Examples of such

inhibitors include, but are not limited to, Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Canertinib, BMS-599626 (AC-480), Neratinib, KRN-633, CEP-11981, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, AZM-475271, CP-724714, TAK-165, Sunitinib, Vatalanib, CP-547632, Vandetanib, Bosutinib, Lestaurtinib, Tandutinib, Midostaurin, Enzastaurin, AEE-788, Pazopanib, Axitinib, Motasenib, OSI-930, Cediranib, KRN-951, Dovitinib, Seliciclib, SNS-032, PD-0332991, MKC-I (Ro-317453; R-440), Sorafenib, ABT-869, Brivanib (BMS-582664), SU-14813, Telatinib, SU-6668, (TSU-68), L-21649, MLN-8054, AEW-541, and PD-0325901.

When it is concluded that the patient has a MSI cancer then the physician can take the choice to administer the patient with an immunotherapeutic agent.

The term "immunotherapeutic agent," as used herein, refers to a compound, composition or treatment that indirectly or directly enhances, stimulates or increases the body's immune response against cancer cells and/or that decreases the side effects of other anticancer therapies. Immunotherapy is thus a therapy that directly or indirectly stimulates or enhances the immune system's responses to cancer cells and/or lessens the side effects that may have been caused by other anti-cancer agents. Immunotherapy is also referred to in the art as immunologic therapy, biological therapy biological response modifier therapy and biotherapy. Examples of common immunotherapeutic agents known in the art include, but are not limited to, cytokines, cancer vaccines, monoclonal antibodies and non-cytokine adjuvants. Alternatively the immunotherapeutic treatment may consist of administering the patient with an amount of immune cells (T cells, NK, cells, dendritic cells, B cells...).

Immunotherapeutic agents can be non-specific, i.e. boost the immune system generally so that the human body becomes more effective in fighting the growth and/or spread of cancer cells, or they can be specific, i.e. targeted to the cancer cells themselves immunotherapy regimens may combine the use of non-specific and specific immunotherapeutic agents.

Non-specific immunotherapeutic agents are substances that stimulate or indirectly improve the immune system. Non-specific immunotherapeutic agents have been used alone as a main therapy for the treatment of cancer, as well as in addition to a main therapy, in which case the non-specific immunotherapeutic agent functions as an adjuvant to enhance the effectiveness of other therapies (e.g. cancer vaccines). Non-specific immunotherapeutic agents can also function in this latter context to reduce the side effects of other therapies, for example, bone marrow suppression induced by certain chemotherapeutic agents. Non-specific immunotherapeutic agents can act on key immune system cells and cause secondary responses, such as increased production of cytokines and immunoglobulins. Alternatively, the agents can

themselves comprise cytokines. Non-specific immunotherapeutic agents are generally classified as cytokines or non-cytokine adjuvants.

5 A number of cytokines have found application in the treatment of cancer either as general non-specific immunotherapies designed to boost the immune system, or as adjuvants provided with other therapies. Suitable cytokines include, but are not limited to, interferons, interleukins and colony-stimulating factors.

10 Interferons (IFNs) contemplated by the present invention include the common types of IFNs, IFN-alpha (IFN-a), IFN-beta (IFN-beta) and IFN-gamma (IFN-y). IFNs can act directly on cancer cells, for example, by slowing their growth, promoting their development into cells with more normal behaviour and/or increasing their production of antigens thus making the cancer cells easier for the immune system to recognise and destroy. IFNs can also act indirectly on cancer cells, for example, by slowing down angiogenesis, boosting the immune system and/or stimulating natural killer (NK) cells, T cells and macrophages. Recombinant IFN-alpha is available commercially as Roferon (Roche Pharmaceuticals) and Intron A (Schering Corporation). The use of IFN-alpha, alone or in combination with other immunotherapeutics or with chemotherapeutics, has shown efficacy in the treatment of various cancers including melanoma (including metastatic melanoma), renal cancer (including metastatic renal cancer), breast cancer, prostate cancer, and cervical cancer (including metastatic cervical cancer).

20 Interleukins contemplated by the present invention include IL-2, IL-4, IL-11 and IL-12. Examples of commercially available recombinant interleukins include Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) and Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Wash.) is currently testing a recombinant form of IL-21, which is also contemplated for use in the combinations of the present invention. Interleukins, alone or in combination with other immunotherapeutics or with chemotherapeutics, have shown efficacy in the treatment of various cancers including renal cancer (including metastatic renal cancer), melanoma (including metastatic melanoma), ovarian cancer (including recurrent ovarian cancer), cervical cancer (including metastatic cervical cancer), breast cancer, colorectal cancer, lung cancer, brain cancer, and prostate cancer.

30 Interleukins have also shown good activity in combination with IFN-alpha in the treatment of various cancers (Negrier et al., *Ann Oncol.* 2002 13(9):1460-8; Tourani et al., *J. Clin. Oncol.* 2003 21(21):3987-94).

Colony-stimulating factors (CSFs) contemplated by the present invention include granulocyte colony stimulating factor (G-CSF or filgrastim), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF or sargramostim) and erythropoietin (epoetin alfa, darbepoietin).

Treatment with one or more growth factors can help to stimulate the generation of new blood cells in subjects undergoing traditional chemotherapy. Accordingly, treatment with CSFs can be helpful in decreasing the side effects associated with chemotherapy and can allow for higher doses of chemotherapeutic agents to be used. Various-recombinant colony stimulating factors are available commercially, for example, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (erythropoietin; Ortho Biotech), Epogen (erythropoietin; Amgen), Arnesp (erythropoietin). Colony stimulating factors have shown efficacy in the treatment of cancer, including melanoma, colorectal cancer (including metastatic colorectal cancer), and lung cancer.

10 Non-cytokine adjuvants suitable for use in the combinations of the present invention include, but are not limited to, Levamisole, alum hydroxide (alum), Calmette-Guerin bacillus (ACG), incomplete Freund's Adjuvant (IFA), QS-21, DETOX, Keyhole limpet hemocyanin (KLH) and dinitrophenyl (DNP). Non-cytokine adjuvants in combination with other immuno- and/or chemotherapeutics have demonstrated efficacy against various cancers including, for  
15 example, colon cancer and colorectal cancer (Levamisole); melanoma (BCG and QS-21); renal cancer and bladder cancer (BCG).

In addition to having specific or non-specific targets, immunotherapeutic agents can be active, i.e. stimulate the body's own immune response, or they can be passive, i.e. comprise immune system components that were generated external to the body.

20 Passive specific immunotherapy typically involves the use of one or more monoclonal antibodies that are specific for a particular antigen found on the surface of a cancer cell or that are specific for a particular cell growth factor. Monoclonal antibodies may be used in the treatment of cancer in a number of ways, for example, to enhance a subject's immune response to a specific type of cancer, to interfere with the growth of cancer cells by targeting specific cell  
25 growth factors, such as those involved in angiogenesis, or by enhancing the delivery of other anticancer agents to cancer cells when linked or conjugated to agents such as chemotherapeutic agents, radioactive particles or toxins.

Monoclonal antibodies currently used as cancer immunotherapeutic agents that are suitable for inclusion in the combinations of the present invention include, but are not limited  
30 to, rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), and BL22. Monoclonal antibodies are used in the treatment of a wide range of cancers including breast cancer (including advanced metastatic breast cancer), colorectal cancer (including advanced and/or

metastatic colorectal cancer), ovarian cancer, lung cancer, prostate cancer, cervical cancer, melanoma and brain tumours. Other examples include anti-CTLA4 antibodies (e.g. Ipilimumab), anti-PD1 antibodies, anti-PDL1 antibodies, anti-TIMP3 antibodies, anti-LAG3 antibodies, anti-B7H3 antibodies, anti-B7H4 antibodies or anti-B7H6 antibodies.

5           Particularly, a patient diagnosed as having a CMMRD or a MSI leukemia/lymphoma according to the invention can be treated by immunotherapy like immune checkpoint blockade involving anti-CTLA4, anti-PD1, anti-PD-L1 alone or in combination, or anti-cancer vaccines or dendritic cells vaccines based on tumour specific antigens.

10           Active specific immunotherapy typically involves the use of cancer vaccines. Cancer vaccines have been developed that comprise whole cancer cells, parts of cancer cells or one or more antigens derived from cancer cells. Cancer vaccines, alone or in combination with one or more immuno- or chemotherapeutic agents are being investigated in the treatment of several types of cancer including melanoma, renal cancer, ovarian cancer, breast cancer, colorectal cancer, and lung cancer. Non-specific immunotherapeutics are useful in combination with  
15 cancer vaccines in order to enhance the body's immune response.

          The immunotherapeutic treatment may consist of an adoptive immunotherapy as described by Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg “Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012). In adoptive immunotherapy, the subject’s circulating lymphocytes, or  
20 tumor infiltrated lymphocytes, are isolated in vitro, activated by lymphokines such as IL-2 or transduced with genes for tumor necrosis, and readministered (Rosenberg et al., 1988; 1989). The activated lymphocytes are most preferably be the subject’s own cells that were earlier isolated from a blood or tumor sample and activated (or “expanded”) in vitro. This form of immunotherapy has produced several cases of regression of melanoma and renal carcinoma.

25           When it is concluded that the patient has a MSI cancer then the physician can take the choice to administer the patient with a radiotherapeutic agent.

          The term "radiotherapeutic agent" as used herein, is intended to refer to any radiotherapeutic agent known to one of skill in the art to be effective to treat or ameliorate cancer, without limitation. For instance, the radiotherapeutic agent can be an agent such as those  
30 administered in brachytherapy or radionuclide therapy. Such methods can optionally further comprise the administration of one or more additional cancer therapies, such as, but not limited to, chemotherapies, and/or another radiotherapy.

***Kits or devices of the present invention:***



A further object of the present invention relates to a kit or device for performing the methods of the present invention, comprising means for extracting and sequencing DNA from a sample.

5 In some embodiments, the kit or device comprises at least one couple of primer per locus.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

10

### FIGURES:

**Figure 1. Background and Study Design.** FDA, Food and Drug Administration; MSI, microsatellite instable; CRC, colorectal cancer; mCRC, metastatic colorectal cancer; nmCRC, non-metastatic colorectal cancer; WES, whole exome sequencing; ICI, immune checkpoint inhibitors; IHC, Immunohistochemistry.

15

**Figure 2. Reassessment of MSI using MSISensor in prospective and retrospective cohorts of metastatic and non-metastatic CRC whose MSI/dMMR or MSS/pMMR status had been previously assessed with gold standard reference methods.**

A) Boxplots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 25 MSI (red) and 77 MSS (blue) patients with metastatic CRC from a prospective cohort (Cohort 1, C1).

20

B) Boxplots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 88 MSI patients with non-metastatic CRC (left) and 25 MSI patients with metastatic CRC (right) from a retrospective cohort (Cohort 2, C2).

25

C) Boxplots show the percentage of mutated microsatellites (MSISensor score) obtained from WES of 118 TCGA patients, including 51 MSI, 14 MSI-L and 53 MSS patients (Cohort 3, C3).

A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dotted line). Non-metastatic samples are represented by a circle and metastatic samples by a diamond. Horizontal barplots indicate the percentage of true negative (TN), true positive (TP), false negative (FN) and false positive (FP) for each cohort.

30

**Figure 3. Improving the computational detection of MSI in CRC by identifying the weaknesses and limits of MSISensor.**

Density plot of the MSISensor score in C1 + C2 (left) and C3 (right) cohorts. The cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to separate MSS from MSI tumors (green dotted line). The adjacent histograms represent the distribution of tumor samples according to their MSISensor score.

5 **Figure 4. Testing the diagnostic performance of MSICare.**

A) Density plot of the MSICare score in the C1 and C2 cohorts.

B) Density plot of the MSICare score in the C3 cohort.

**Figure 5. Comparative performance of MSISensor and MSICare for the identification of MSI in gastric and endometrial tumors from the TCGA.**

10 A) Boxplots show the MSISensor score obtained from WES of 104 TCGA GC patients (including 55 MSI, 9 MSI-L and 42 MSS) and 278 TCGA EC patients (including 159 MSI, 17 MSI-L and 102 MSS) from Cohort 3. A cutoff MSISensor score of 10 (FDA recommendation) was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dotted line).

15 B) Boxplots show the MSICare score obtained from WES of the same TCGA patients with CRC, GC or EC. A cutoff MSICare score of 21 was used to discriminate MSS from MSI tumors (green dotted line).

**Figure 6. Identification of weaknesses and limits of MSISensor for detecting MSI (lack of sensitivity).**

20 A) Distribution of the total number of somatic mutations identified with MSISensor from WES data (C1 and C2) for each category of microsatellites (Mono-, Di-, Tri-, Tetra- or Penta-nucleotide repeats). Mononucleotide repeat (MNR) sequences are by far the most unstable category of microsatellites in dMMR colon tumors and are therefore better at distinguishing MSI from MSS CRC than other forms of repeats used by MSISensor (e.g. di-, tri-, tetra-, penta-).

25 B) Percentage of mutated MNR according to their size (range from 5 to 12, MSICare score) (C1 and C2). 5+, includes all mononucleotide repeats with a length of  $\geq 5$  bp; 6+, includes all mononucleotide repeats with a length of  $\geq 6$  bp, etc. The long MNR of  $\geq 12$  bp was best at discriminating the two phenotypes (Blue rectangle).

30 **Figure 7. Genomic instability Index according to MSISensor score.** Distribution of genomic instability Index (based on mononucleotide repeat instability, see Materials and Methods for details) of tumors according to MSISensor score (x-axis) of cohorts C1 and C2

**Figure 8. Identification of the weaknesses and limits of MSISensor for detecting MSI (lack of specificity).**

A) Density plot of reads according to the repeat length for 3 examples of Loss Of Heterozygosity (LOH) in 3 tumors identified as having mutated microsatellites by MSISensor.

B) Wild-type and mutated profiles of the T16 microsatellite are shown (normal DNA, wild-type, in green; MSI tumor DNA, mutated, in yellow). This illustrates that, due to stuttering (T15), a pure MSI signal can be captured only by considering somatic deletion of 2 bp or more in this long MNR.

**Table 1. Sensitivity, specificity, NPV, PPV of microsatellite instability detection according to NGS methods on different cohort.**

<b>A. Estimate of the sensitivity, specificity, negative and positive predictive values of microsatellite instability detection using MSISensor.</b>				
	Sensitivity % (95 % CI)	Specificity % (95 % CI)	PPV % (95 % CI)	NPV % (95 % CI)
<b>Method : MSISensor</b>				
C1	84.0 (69.3 – 98.7)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	95.1 (90.2 – 100.0)
C2 ALL	85.8 (79.3 – 92.3)	NA	NA	NA
C2 nmCRC	90.9 (84.9 – 96.9)	NA	NA	NA
C2 mCRC	68.0 (49.3 – 86.7)	NA	NA	NA
C1+C2	85.5 (79.6 – 91.4)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	79.4 (70.3 – 88.5)
C3	90.2 (82.0 – 98.4)	95.5 (90.5 – 100.5)	93.9 ( 87.3 – 100.5)	92.8 (86.5 – 99.1)
<b>B. Estimate of the sensitivity, specificity, negative and positive predictive values of microsatellite instability detection using MSICare.</b>				
	Sensitivity % (95 % CI)	Specificity % (95 % CI)	PPV % (95 % CI)	NPV % (95 % CI)
<b>Method : MSICare</b>				
C1	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)
C2 ALL	100.0 (100.0 – 100.0)	NA	NA	NA
C2 nmCRC	100.0 (100.0 – 100.0)	NA	NA	NA
C2 mCRC	100.0 (100.0 – 100.0)	NA	NA	NA
C1+C2	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)	100.0 (100.0 – 100.0)
C3	96.1 (90.7 – 101.5)	97.0 (92.9 – 101.1)	96.1 (90.7 – 101.5)	97.0 (92.9 – 101.1)

CI, confidence interval

PPV, Positive predictive value

NPV, Negative predictive value

nmCRC, non-metastatic colorectal cancer

5 mCRC, metastatic colorectal cancer

## **EXAMPLE:**

### **Material & Methods**

#### **Study populations**

10 The clinical rationale and design of this study are presented in Figure 1. One hundred and two patients with mCRC (Cohort C1, Fig. 1) originated from two multicenter French clinical trials (NCT02840604 and NCT033501260) which accrued patients between May 2015 and November 2019.

NCT02840604 aimed to show that exome analysis is feasible in the routine care of  
15 patients, thereby improving access to targeted therapies and improving the detection of genetic cancer predisposition. Genomic sequencing (WES) was performed at the Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Genomic and Immunotherapy Medical Institute, Dijon, France. Patients were eligible if they presented with a locally advanced, non-operable or metastatic cancer that had progressed during at least one line of systemic therapy. The NIPICOL trial  
20 (NCT033501260) involves treatment of MSI/dMMR mCRC patients with nivolumab (anti-PD-1) and ipilimumab (anti-CTLA-4). mCRC response to ICI was determined according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) (20). Twenty-six cases from the NCT033501260 cohort were treated with ICI. Of these, 23 were confirmed to be MSI/dMMR and 3 were identified later as MSS/pMMR following reassessment of their MSI and MMR  
25 status centrally. Genomic sequencing (WES) was performed by IntegraGen SA (Evry, France). All patients provided signed informed consent for the trials and genomic analysis. After giving consent, patients underwent consultation with a geneticist to explain the consequences of constitutional genetic testing. Following this consultation, the patient could accept or refuse to provide a blood sample for constitutional exome analysis. This trial protocol was approved by  
30 an institutional review committee and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

A historical retrospective cohort was also analyzed (cohort C2, Fig. 1). This comprised  
25 patients with mCRC that were diagnosed between 1998 and 2016 in 6 French hospitals as MSI or dMMR (17), as well as 88 patients from the Saint Antoine Hospital, Paris, who were

diagnosed between 1998 and 2007 as having MSI/dMMR nmCRC (21). Primary and/or metastatic tumor tissues for mCRC were analyzed by IntegraGen SA (Evry, France) using WES. All patients provided written consent and the study was approved by the institutional review boards/ethics committees of the participating centers.

5 We further evaluated and compared the performance of MSICare and MSISensor in a third independent tumor cohort (C3). This included 118 CRC patients whose MSI status was previously assessed by PCR using the Bethesda microsatellite panel and whose WES data was publicly available from the TCGA. All CRC patients with MSI-H (n = 51) or MSI-L (n = 14) and a similar proportion of patients with MSS (n = 53) were included (22). C3 also included  
10 382 extra-colonic tumors from the TCGA with a relatively high incidence of MSI, i.e. gastric (53 MSI-H, 9 MSI-L, 42 MSS) and endometrial (159 MSI-H, 17 MSI-L, 102 MSS) cancers.

### **Samples**

In the prospective cohort (C1, clinical trials NCT02840604 and NCT033501260), the mCRC samples were formalin fixed and paraffin-embedded (FFPE) and were comprised of  
15 either the primary or metastatic tumor tissue. In the retrospective cohort (C2), all nmCRC samples (n = 88) were stored at -80 °C until DNA extraction. For mCRC patients (n=25), both the primary tumor and metastasis preserved in FFPE (n = 45; 25 primary tumors and 20 metastasis) were collected and analyzed whenever possible in order to provide a more complete description of this rare CRC subtype. For the public retrospective cohort (C3), frozen tissue  
20 samples were collected from the primary tumor sites (colorectum, stomach, endometrium) as described (22).

### **Immunohistochemistry and MSI-PCR**

All CRC samples from C1 and C2 used in this post-hoc study were centrally reassessed in our expert center (Saint-Antoine hospital, Paris France) for dMMR status using  
25 immunohistochemistry (IHC) and for MSI using polymerase chain reaction (PCR) as previously described (13-15).

### **MSISensor End Points**

False negatives from C1 and C2 were defined as samples initially diagnosed as MSI or dMMR using MSI-PCR and IHC, respectively, but showing a negative MSISensor Score ( $\leq$   
30 10%) when considering the complete exome data (18, 19). This was done by central assessment at the Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Dijon, and at the Saint-Antoine Hospital, Paris. The sensitivity of MSISensor was calculated as the percentage of true-positive cases amongst the total of true-positive and false-negative cases.

### **Whole exome sequencing and NGS-based MSI diagnosis with MSISensor**

For the prospective (C1) and retrospective (C2) cohorts, the WES procedure was performed as recommended by the manufacturer (SureSelect Human Exon Kit v5, 75 MB; Agilent, Les Ulis, France) and as previously described (23). For metastatic tumor samples, the generated reads were mapped to the reference genome hg38 (GRCh38), while for the retrospective non-metastatic samples the reads were mapped onto hg19 (GRC37). MSISensor was used at the default setting to evaluate the mutation status of microsatellites from the WES data (19).

### **Implementation of the optimized NGS-based MSICare method to increase the sensitivity of MSI detection in CRC and in other tumors**

A new method (MSICare) was developed to optimize the detection of MSI based on comparison of the read distribution between normal and tumor samples from WES data. Mononucleotide repeats (MNR) with a length  $\geq 12$  base pairs (bp) were considered for analysis only if they were covered by at least 20 mapping reads in both normal and tumor samples. The total number of reads covering each candidate MNR was then normalized (arbitrary value of 100) in tumor and matched healthy tissue. For each MNR, the normalized number of reads in healthy tissue was subtracted from the normalized number of reads in tumor tissue [ $\Delta\text{Ratio} = \%Tumor - \%Normal$ ] to generate an MSI index (MSI signal, MSIg) corresponding to the sum of  $\Delta\text{Ratio}$  values for all candidate MNR. The  $\Delta\text{Ratio}$  value was then adjusted by estimating the tumor purity (TP) for each tumor sample, with the estimated TP corresponding to the median value of the MSI signal for all MNR with a length  $\geq 14$  bp covered by at least 30 reads in tumor and 20 reads in normal tissue. The adjusted value for  $\Delta\text{Ratio}$  was then used to classify a given MNR as wild type ( $\Delta\text{Ratio-adjusted} = \Delta\text{Ratio} \times \text{Estimated TP} < 50\%$ ) or mutated ( $\Delta\text{Ratio-adjusted} = \Delta\text{Ratio} \times \text{Estimated TP} \geq 50\%$ ) given that observed microsatellite mutations can be either heterozygous or homozygous in primary tumor samples. Finally, the MSICare score for tumor samples corresponds to the percentage of microsatellites that were mutated amongst the total number of microsatellites analyzed using this approach. The scripts and documentation are available through Github at <https://github.com/MSI.CRSA/MSICare>.

### **MSICare cutoff determination**

A cutoff value for MSICare was estimated in order to optimize the differentiation of MSI from MSS samples in the different cohorts. This was done using the cutpoint package (version 1.0.32), which estimates optimal cutoff points in binary classification tasks and validates their performance using bootstrapping. A cutoff point of 21 was determined using a discovery set of 77 MSS and 138 MSI (C1 + C2; CRC, Discovery set) and then applied to a

validation set of MSI (C3; CRC and non-CRC, Validation set) from public TCGA data (see the Results section for further details).

## **Results**

### **5 Frequent misdiagnosis of MSI with MSISensor in both mCRC and nmCRC**

All CRC samples from C1 and C2 were centrally reassessed for MSI and dMMR status using the gold standard reference methods of pentaplex PCR and IHC (Fig.1). MSISensor confirmed the status of 77 MSS/pMMR mCRC from the prospective C1 cohort (Fig.1 and Fig. 2A; MSISensor score  $\leq$  10%). However, it failed to confirm the status of 4 of the 25  
10 MSI/dMMR mCRC samples (Fig. 2A; MSISensor score  $\leq$  10%). The frequency of misdiagnosis in C1 was therefore 16% (N = 4/25; sensitivity 84%, 95%CI: 69%-99%).

The sensitivity of MSISensor was further assessed in 25 mCRC patients with MSI/dMMR from the retrospective C2 cohort (Fig. 1). In mCRC, the frequency of misdiagnosis was even higher at 32% (N = 8/25, 32%; sensitivity 68%, 95%CI: 49.3%-86.7%) (Fig. 2B). In  
15 88 nmCRC patients with MSI/dMMR from the C2 cohort, misdiagnosis occurred in 9% (N = 8/88, 9%; sensitivity 91%, 95%CI: 85%-97%) (Fig. 2B). A similar performance for MSISensor was observed with MSK-IMPACTTM (see Materials and Methods for details). The overall number of false negative cases detected amongst MSI/dMMR CRC was very similar for all 3 versions of the MSK panel used to determine the MSISensor score (data not shown). The  
20 sensitivity of MSISensor was also assessed in the public C3 cohort of CRC patients that included both nmCRC and mCRC (Fig. 1). The frequency of missed diagnoses was again very similar at 9.8% (N = 5/51), giving a sensitivity of 90% (95%CI: 82%-98%) in patients with MSI/dMMR CRC. This included one misdiagnosed case of mCRC (1/3, 33%) (Fig. 2C). MSISensor confirmed the status of all but 2 MSS/pMMR mCRC from C3, thus indicating the  
25 major limitation of this method was its lack of sensitivity. The overall performance of MSISensor in the C1 cohort compared to the C2 and C3 cohorts is shown in Table 1A.

### **Identifying weaknesses and limits of MSISensor by deciphering the MSI genomic signal of DNA repeats in CRC**

A density plot was created to show fluctuations in the MSISensor score for the 3 patient  
30 cohorts analyzed in this study (Figure 3). The MSI/dMMR and MSS/pMMR status of all samples in cohorts C1 and C2 were pooled as these had previously been validated centrally. CRC samples from the public cohort C3 were considered separately since we were unable to independently confirm the status of these tumors using IHC and MSI-PCR. The density profiles



clearly highlight the lack of sensitivity of MSISensor for the detection of MSI in dMMR CRC, as already shown above for the 3 cohorts (Fig. 2 and Table 1).

We next hypothesized that it should be possible to improve the detection of MSI in CRC by modifying certain parameters in the analysis of NGS data. In support of this, WES analyses revealed that MSISensor lacked sensitivity because: (i) MNR sequences were by far the most unstable category of microsatellites in dMMR colon tumors and therefore better at distinguishing MSI from MSS CRC than other types of repeat used by MSISensor (e.g. di-, tri-, 5 tera-, penta-) (Fig. 6A); (ii) the ability of MNR to discriminate between MSS and MSI colon tumors was dependent upon their length, with long MNR of  $\geq 12$  bp found to be the most discriminating compared to other microsatellites used by MSISensor (Fig. 6B); (iii) MSISensor 10 was not suitable for detecting MSI in CRC samples with an estimated TP of less than 30-40%. This is an important limitation to the sensitivity of MSISensor in primary MSI CRC due to the often high levels of contamination with non-tumor and inflammatory pMMR/MSS cells (Fig. 7) (see also our review (24) and original publications for further details 14, 15, 21, 23, 25). WES analyses also revealed that MSISensor lacks specificity for two reasons. Firstly, the 15 MSISensor computational tool confused the true MSI signal with allelic losses (LOH) for some of the MNR. LOH occurs frequently in MSS colon tumors with high levels of chromosomal instability (Fig. 8A). Secondly, stuttering by DNA polymerase during the PCR reaction occurs frequently at microsatellites and in particular at long MNR. A misdiagnosis of MSI can 20 therefore occur when small 1 bp deletions in these microsatellites are considered by MSISensor to represent MSI (Fig. 8B).

### **Designing and validating MSICare to improve NGS-based detection of MSI in CRC**

To avoid the abovementioned pitfalls of MSISensor, we next designed a new 25 computational tool referred to as MSICare to accurately detect MSI in CRC based on analysis of their WES profile. In contrast to MSISensor, MSICare identifies true MSI signals defined as somatic deletions of at least 2 bp in length that occur in long MNR ( $\geq 12$  bp) in DNA from dMMR cancers but not in DNA from paired normal tissue (see Materials and Methods for further details). A Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was constructed assuming 30 binary classification of the MSICare score. This revealed a perfect discrimination between dMMR and pMMR CRC in C1 and C2, with 100% sensitivity and 100% specificity when using a cut-off value of 21% (Fig. 4A and data not shown). dMMR/MSI samples showed a mean MSICare score above 80% with little dispersion around this value, whereas the mean MSICare score of pMMR/MSS samples was below 10%. MSICare thus appears to be very effective in

discriminating MSI from MSS CRC cases. The high level of discrimination achieved using the cut-off value of 21% was validated in the public C3 cohort (Fig. 4B right panel) and led us to correct 3 cases amongst 5 that were true MSI that showed false negative status with MSISensor. Of interest, the two remaining CRC samples with negative MSISensor status that were previously classified as MSI by PCR according to TCGA remained unambiguously MSS with MSICare. Detailed analysis of the exomic profile of both these tumors revealed very few mutations in microsatellites located within coding regions of known MSI target genes (data not shown). Furthermore, one of the samples showed pMMR according to TCGA, thus suggesting an equivocal MSI status. The overall performance of MSICare in the C1 cohort compared to the C2 and C3 cohorts is shown in Table 1B.

### **MSICare is likely to have better performance than MSISensor for the detection of MSI in gastric and endometrial tumors**

The performance of MSISensor for the detection of MSI was assessed in two other primary cancer types that frequently show an MSI phenotype, namely gastric cancer (GC) and endometrial cancer (EC). Investigation of the available WES data for GC and EC from the TCGA revealed a much better performance for MSICare in the detection of MSI as compared to MSISensor (Fig. 5 and Table 1B).

### **Conclusion**

Several publications have recently highlighted the potential of NGS for the detection of MSI in human cancers by using distinct computational algorithms (18, 19, 26-29). Amongst these, MSISensor has received FDA approval and is used to guide the prescription of ICI therapy in patients with metastatic cancer, regardless of the primary location of the tumor. MSISensor has been tested on advanced solid cancers including a large number of CRC. However, the performance of this NGS-based test has yet to be evaluated in a large series of CRC previously assessed for MSI/dMMR status using the reference PCR and IHC methods. The accuracy of MSISensor is especially important for patients deemed as MSI/dMMR mCRC and subsequently treated with ICI. In this study the inventors provide clear evidence that MSISensor lacks sensitivity for the detection of MSI. This was shown in large cohorts of mCRC and nmCRC samples that were previously confirmed as MSI/dMMR or MSS/pMMR by IHC and MSI-PCR methods performed in large, specialized test centers. These results are of particular clinical relevance for ICI therapy. They highlight that in a prospective cohort of MSI mCRC patients, the consideration of results from MSISensor alone in the absence of MSI-PCR and IHC testing would have led to approximately 16% of patients (4/25) not being offered ICI

treatment. Of the 4 patients not detected by MSISensor, 3 were found to be responsive to treatment. Lack of sensitivity for the detection of MSI in nmCRC, as shown here in a large retrospective patient cohort, can also have other adverse clinical consequences such as the failure to detect Lynch syndrome. From these findings they conclude there is an urgent need to change the NGS-based criteria for the identification of MSI in CRC. The present results in CRC patients are consistent with those of another study that found NGS was unable to detect MSI in dMMR tumors from two prostate cancer patients who displayed prolonged positive response to ICK blockade therapy (30). Both tumors showed a high mutational burden and a high density of intratumoral infiltration with CD3 cells. they therefore extrapolate that the low sensitivity of MSISensor for the detection of MSI is likely to apply to all tumors types, as suggested also by the analysis in the present study of gastric and endometrial tumors from the TCGA.

The new MSICare bioinformatic tool proposed here for the detection of MSI shows much better performance compared to MSISensor. It has 100% sensitivity and specificity compared to PCR-MSI in the CRC cohorts tested here, thus matching the performance of the gold standard IHC and MSI-PCR methods. Importantly, it detected MSI in 4 mCRCs that were not initially detected by MSISensor, 3 of which showed a positive response to immunotherapy. As an expert center for the analysis of MSI in clinical oncology, they have optimized this bioanalytic tool so that MSI detection in tumor DNA is highly sensitive while remaining specific. The use of MSICare makes it possible to diagnose MSI in CRC that is highly contaminated with stromal tissue, which is frequently the case in MSI primary tumors. Of note, this new algorithm shows the same performance for both FFPE and frozen primary or metastatic tissue samples, suggesting that either tissue material can be suitable for the analysis. In summary, MSICare would be very useful for routine clinical practice in the management of CRC patients and others cancers, especially as MSI is becoming an indispensable theranostic biomarker in the metastatic setting.

## REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
2. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.

3. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
4. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
5. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993;53:5849-52.
6. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5:43-51.
7. Marisa L, Svrcek M, Collura A, et al. The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *J Natl Cancer Inst* 2018;110.
8. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509-20.
9. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:773-779.
10. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017;18:1182-1191.
11. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* 2020;38:11-19.
12. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 2019;30:1232-1243.
13. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804-11.

14. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:241-51.
15. Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, et al. HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *J Med Genet* 2016;53:377-84.
16. Svrcek M, Lascols O, Cohen R, et al. MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: Which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: Differences between tumors. *Bull Cancer* 2019;106:119-128.
17. Cohen R, Hain E, Buhard O, et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol* 2019;5:551-555.
18. Middha S, Zhang L, Nafa K, et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precis Oncol* 2017;2017.
19. Niu B, Ye K, Zhang Q, et al. MSIensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:1015-6.
20. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
21. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology* 2014;146:401-11 e1.
22. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, et al. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22:1342-1350.
23. Jonchere V, Marisa L, Greene M, et al. Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;6:277-300.
24. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447-54.
25. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011;17:1283-89.

26. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, et al. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem* 2014;60:1192-9.

27. Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget* 2017;8:7452-7463.

5 28. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, et al. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 2018;7:746-756.

10 29. Johansen AFB, Kassentoft CG, Knudsen M, et al. Validation of computational determination of microsatellite status using whole exome sequencing data from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2019;19:971.

30. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, et al. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *J Clin Oncol* 2019;JCO1901638.

**CLAIMS:**

1. A method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumoral sample and if available from a normal sample obtained  
5 from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal sample of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral sample of said patient or sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral  
10 sample and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR depending if the normal sample is available or not, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, vii) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the  
15 MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.
  
2. The method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof according to the claim 1 comprising i) extracting DNA from a tumoral and normal samples obtained  
20 from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, vi) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, vii) concluding that the patient in need thereof has  
25 a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step vi) is superior than a calculated threshold value.
  
3. The method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof according to the claim 1 comprising i) extracting DNA from a tumoral sample obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) in the tumoral sample  
30 and having a length of at least 12 nucleic acids in the corresponding normal sample, iii) evaluating the normal polymorphic zones for the MNR, iv) evaluating the mutated MNR appearing in the tumor sample only outside the normal polymorphic zone of each MNR;

- v) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR obtained from the tumoral sample; vi) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, vii) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted, viii) obtaining a MSICare score by doing the ratio of the number of MNR with a  $\Delta$ Ratio adjusted mutated on the total number of  $\Delta$ Ratio of the MNR and, ix) concluding that the patient in need thereof has a MSI cancer when the MSICare score obtained at the step viii) is superior than a calculated threshold value.
- 5
4. The method according to claims 1 to 3 wherein the cancer is metastatic or not.
5. The method according to claims 1 to 4 wherein the cancer is a colorectal cancer, a gastric cancer or an endometrial cancer.
- 10
6. The method according to claims 1 to 5 wherein a further step of communicating the result to the patient is added.
7. A method of diagnosing a mutation in a MNR in a patient in need thereof comprising i) extracting DNA from a tumor and normal samples obtained from said patient, ii) sequencing a number (N) of mononucleotide repeats (MNR) sequences having a length of at least 12 nucleic acids in the DNA of the normal samples of said patient and the corresponding MNR in the DNA of the tumoral samples of said patients, iii) calculating the  $\Delta$ Ratio for each MNR, iv) calculating the tumor purity (TP) for the tumor sample, v) calculating the  $\Delta$ Ratio adjusted and vi) concluding that the MNR is wild type when the  $\Delta$ Ratio -adjusted is  $< 50\%$  concluding that the MNR is mutated when the  $\Delta$ Ratio adjusted is  $\geq 50\%$ .
- 15
- 20
8. A method for treating a cancer in a patient identified as having a MSI cancer according to a methods of claims 1 to 6 comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy or a combination thereof.



**ABSTRACT OF THE INVENTION**

**METHOD TO DIAGNOSE MSI CANCER**

5

The present invention relates to the field of the diagnostic of MSI cancer. In the present work, the inventors evaluated the performance of MSISensor for the detection of MSI in dMMR/MSI mCRC from multicenter, prospective patients involved in clinical trials with ICI. The present analyse demonstrated that the FDA-approved NGS-based diagnostic test for identifying MSI in mCRC and nmCRC gave inaccurate results when compared with the gold standard reference methods. Consequently, whole exome sequencing (WES) data from all samples was further analyzed to improve detection of the MSI genomic signal in CRC and other primary tumor types. This allowed them to identify the weaknesses and limits of MSISensor and then to design and validate a newly optimized algorithm, namely MSICare. The high accuracy of MSICare for the detection of MSI in CRC and non-CRC tumors should allow it to become a future reference test for assessing MSI in pan-cancer. Thus, the present invention relates to a method of diagnosing an MSI cancer in a patient in need thereof comprising notably extracting and sequencing DNA from a tumoral sample and if available from a normal sample and operate an analyse of MNRs.

20

# STUDY DESIGN

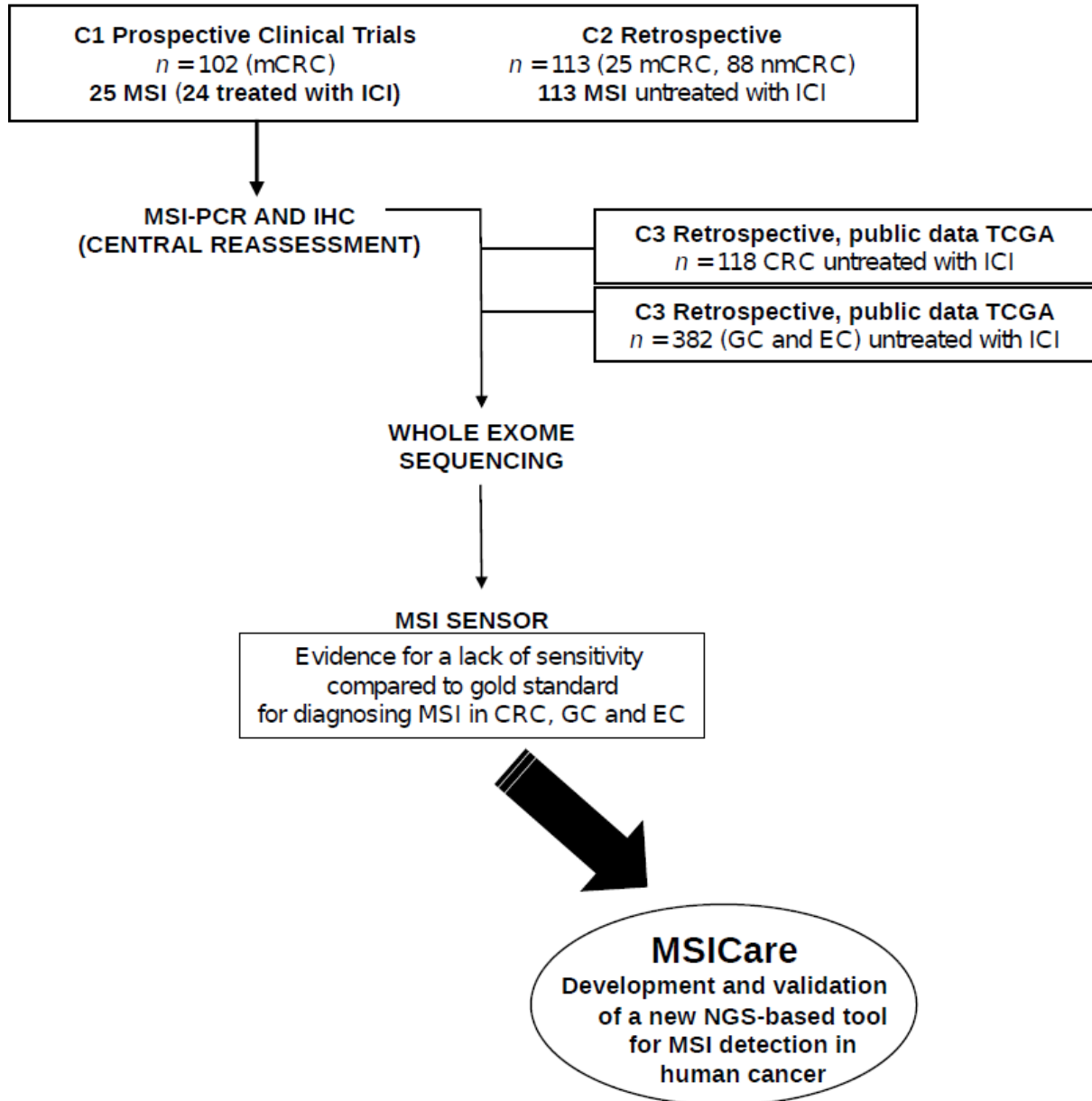


Figure 1

Prospective (C1, n=102)  
mCRC

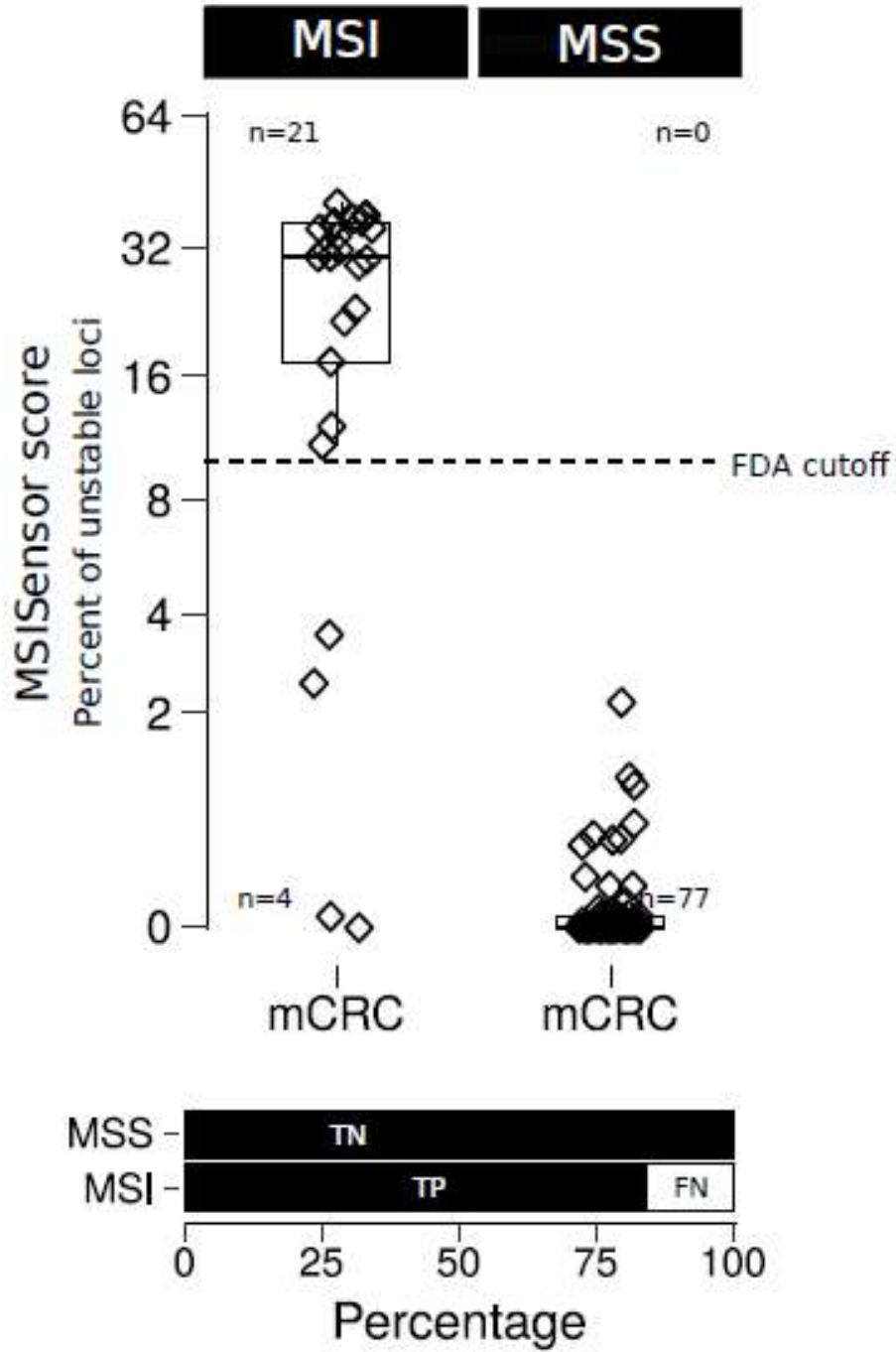


Figure 2A

### Retrospective (C2, n=113) mCRC & nmCRC

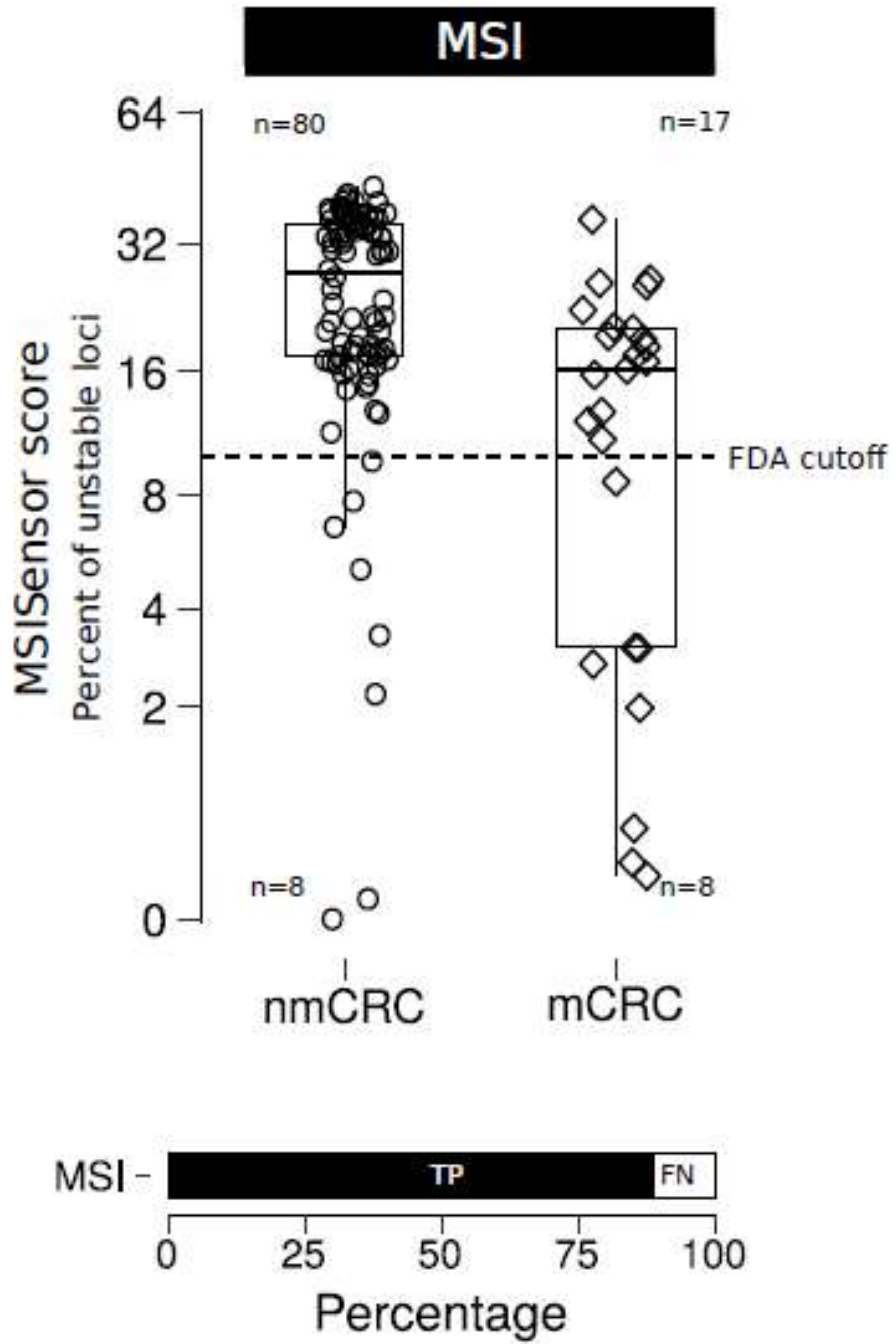


Figure 2B

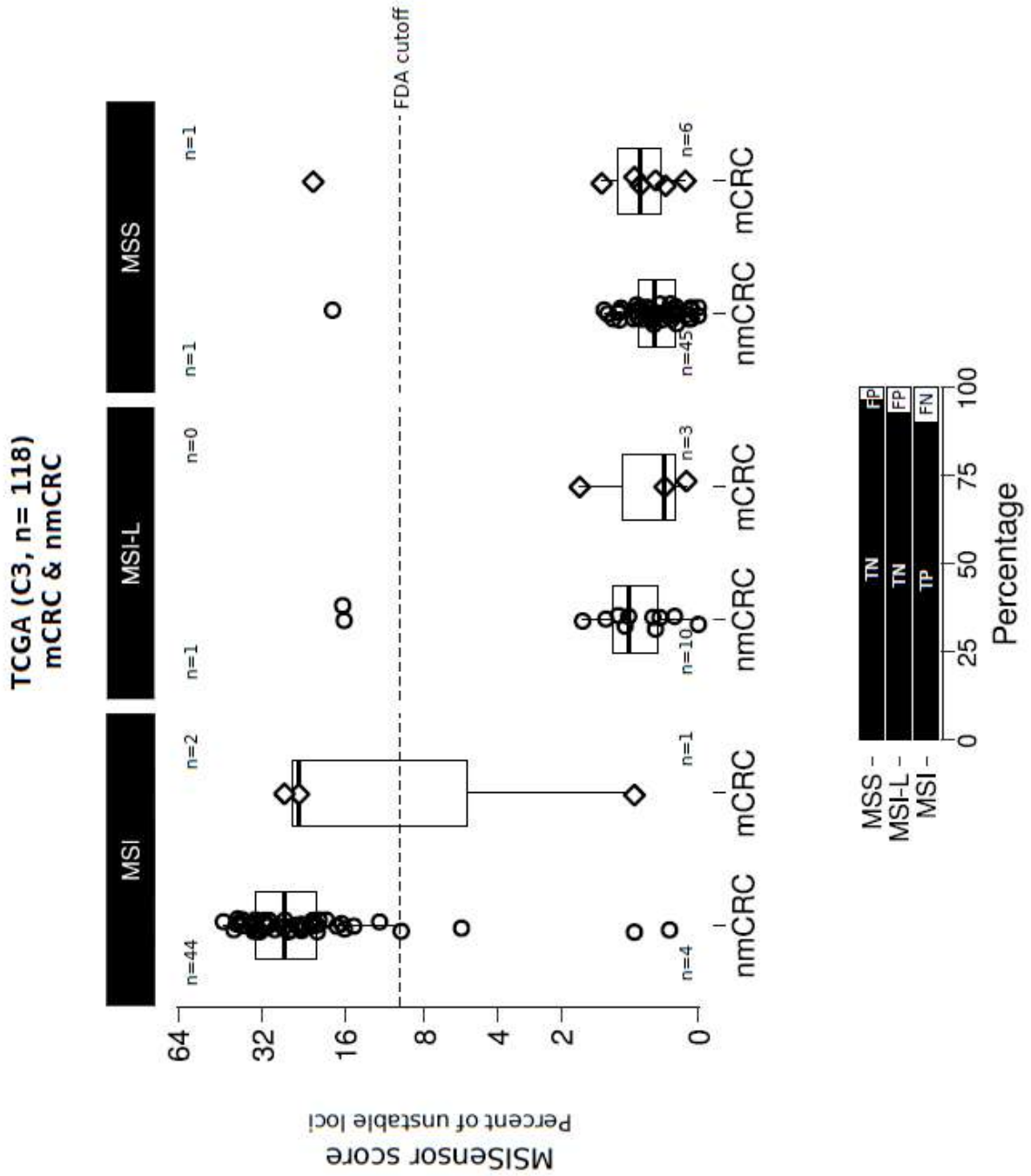
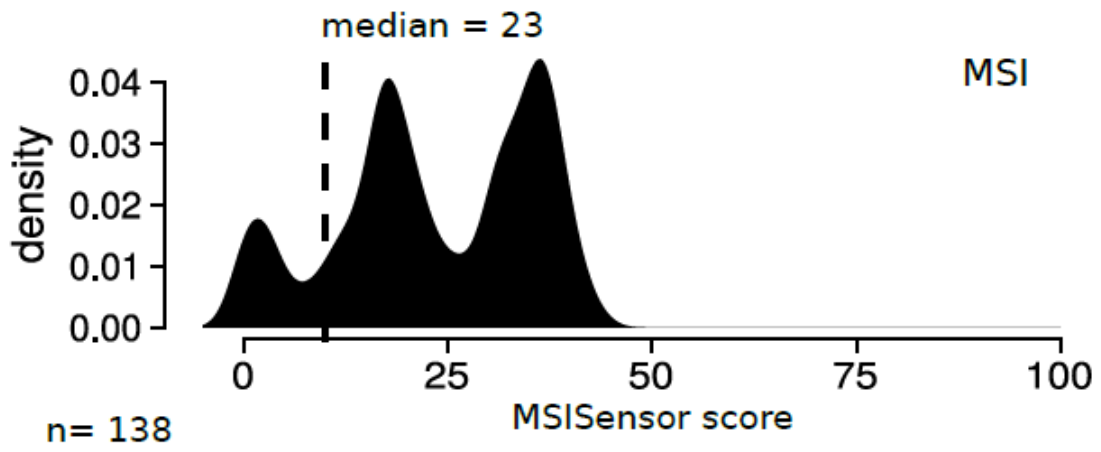
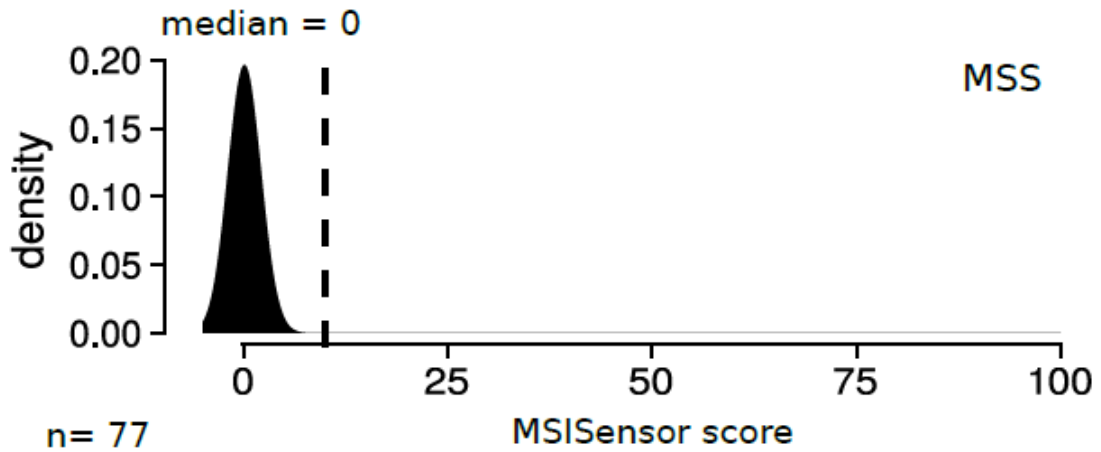
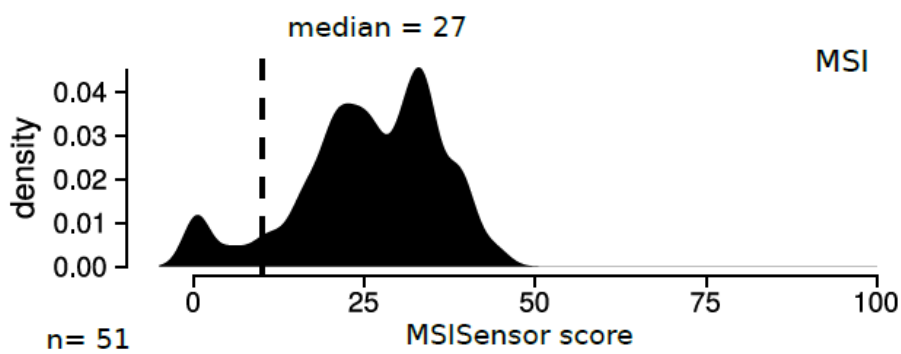
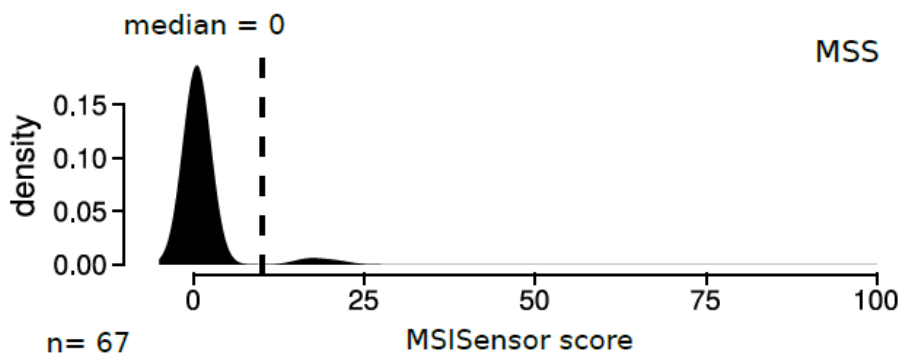


Figure 2C

### MSISensor on C1 + C2



### MSISensor on C3



■ ■ ■ FDA cutoff

Figure 3

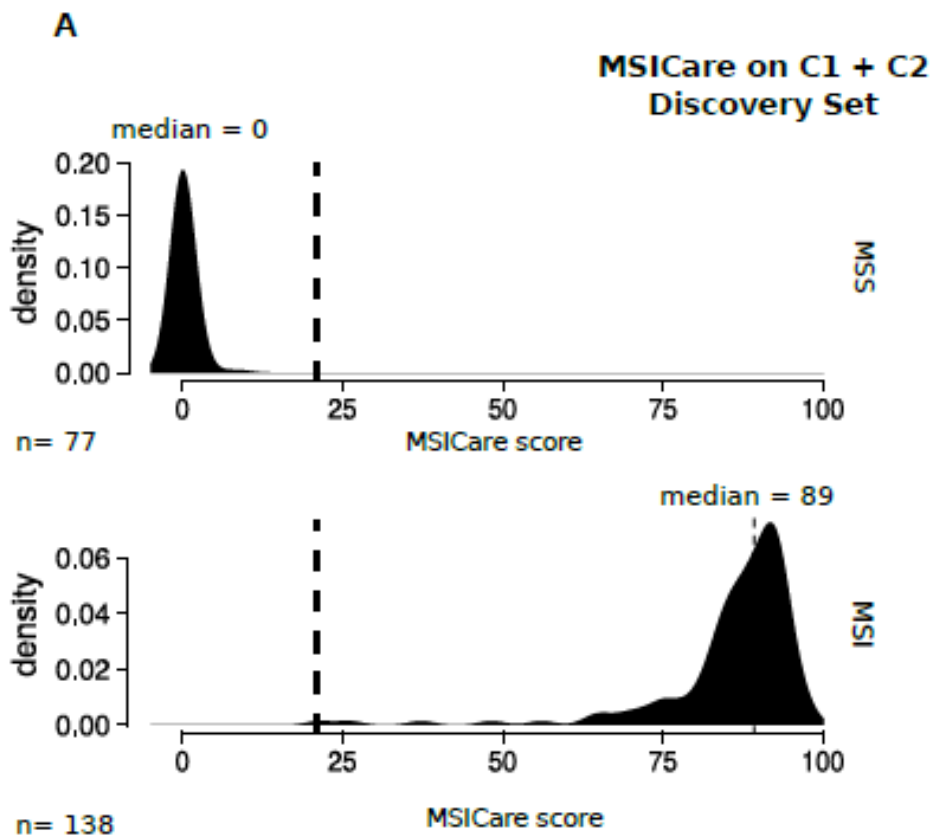


Figure 4A

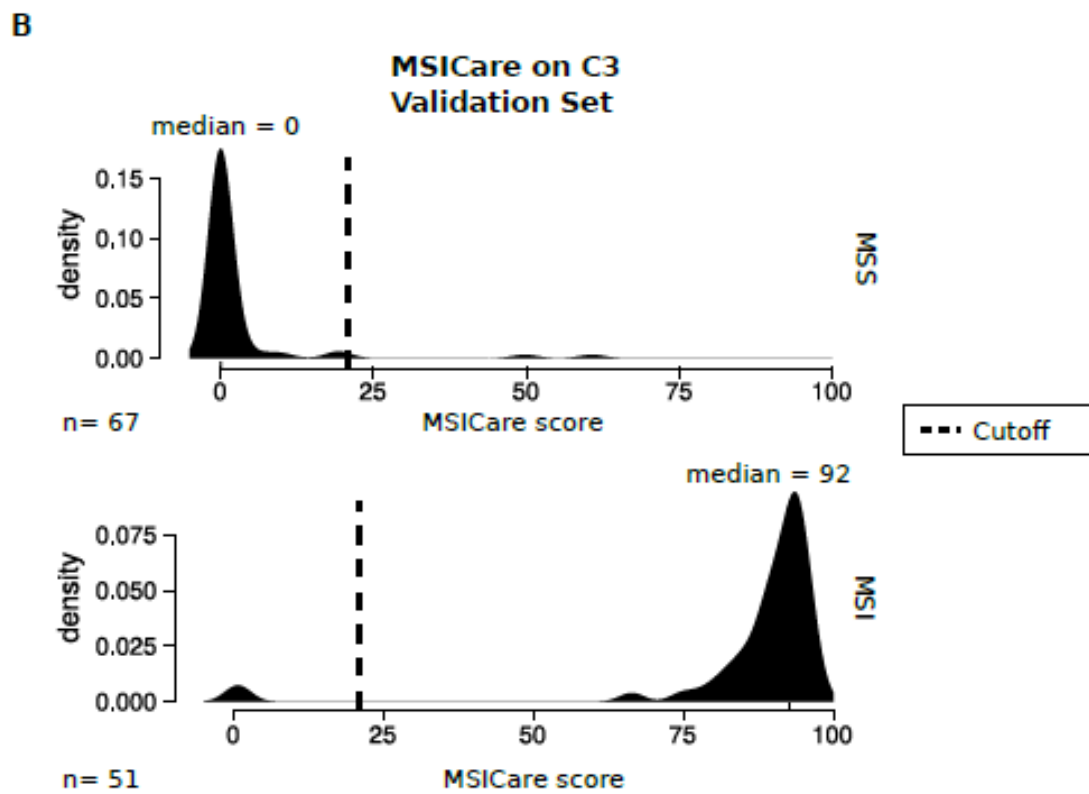


Figure 4B

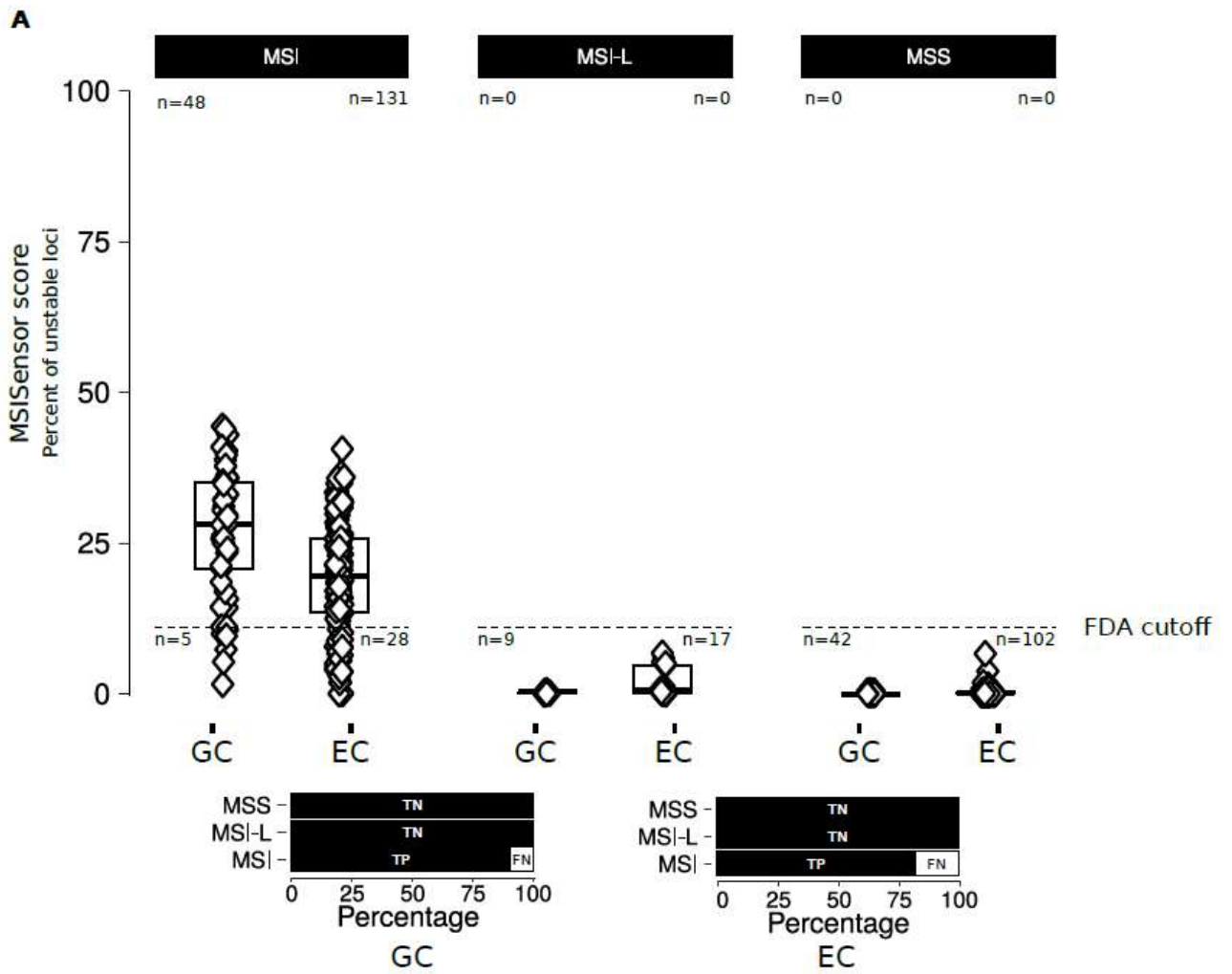


Figure 5A



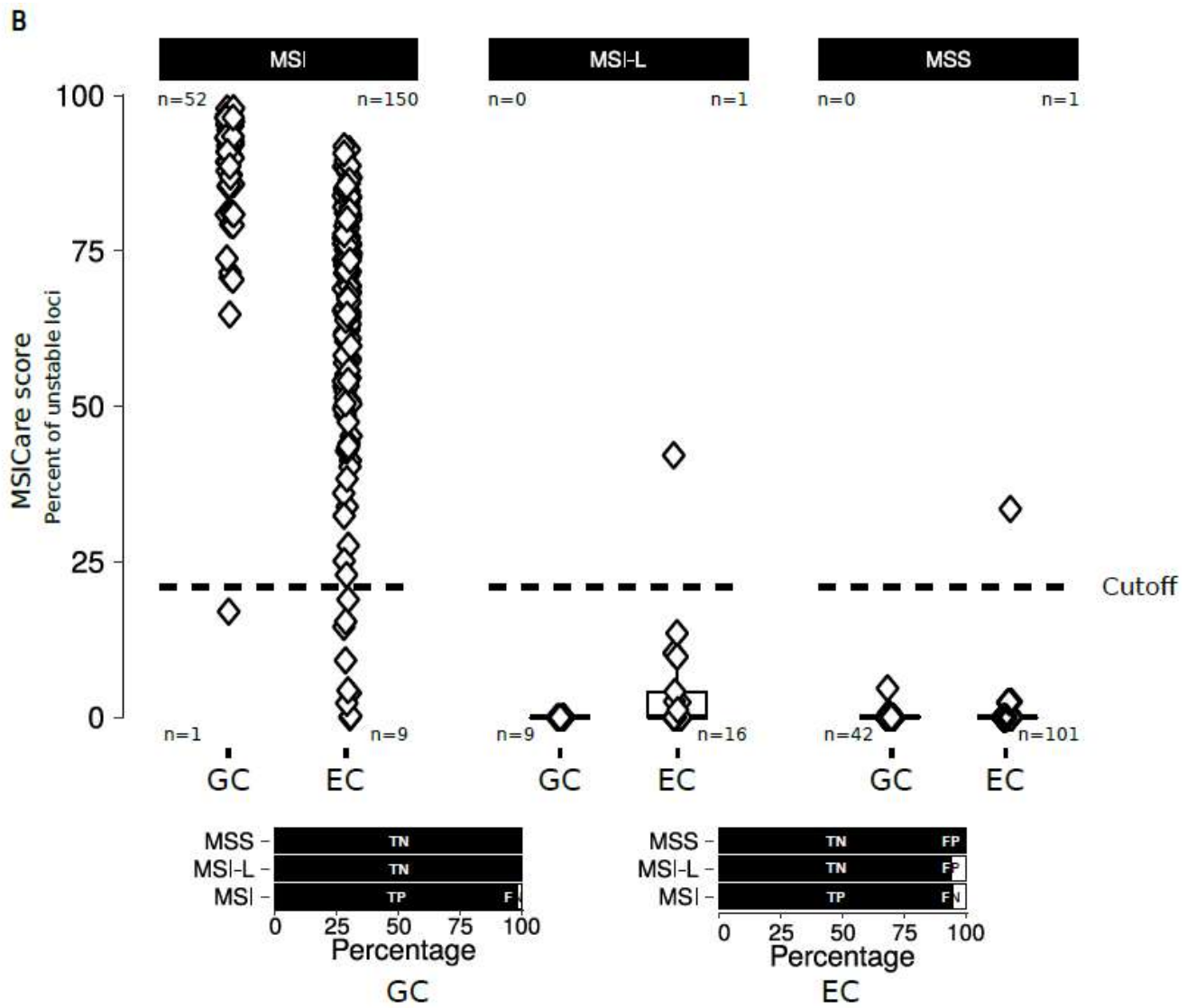


Figure 5B

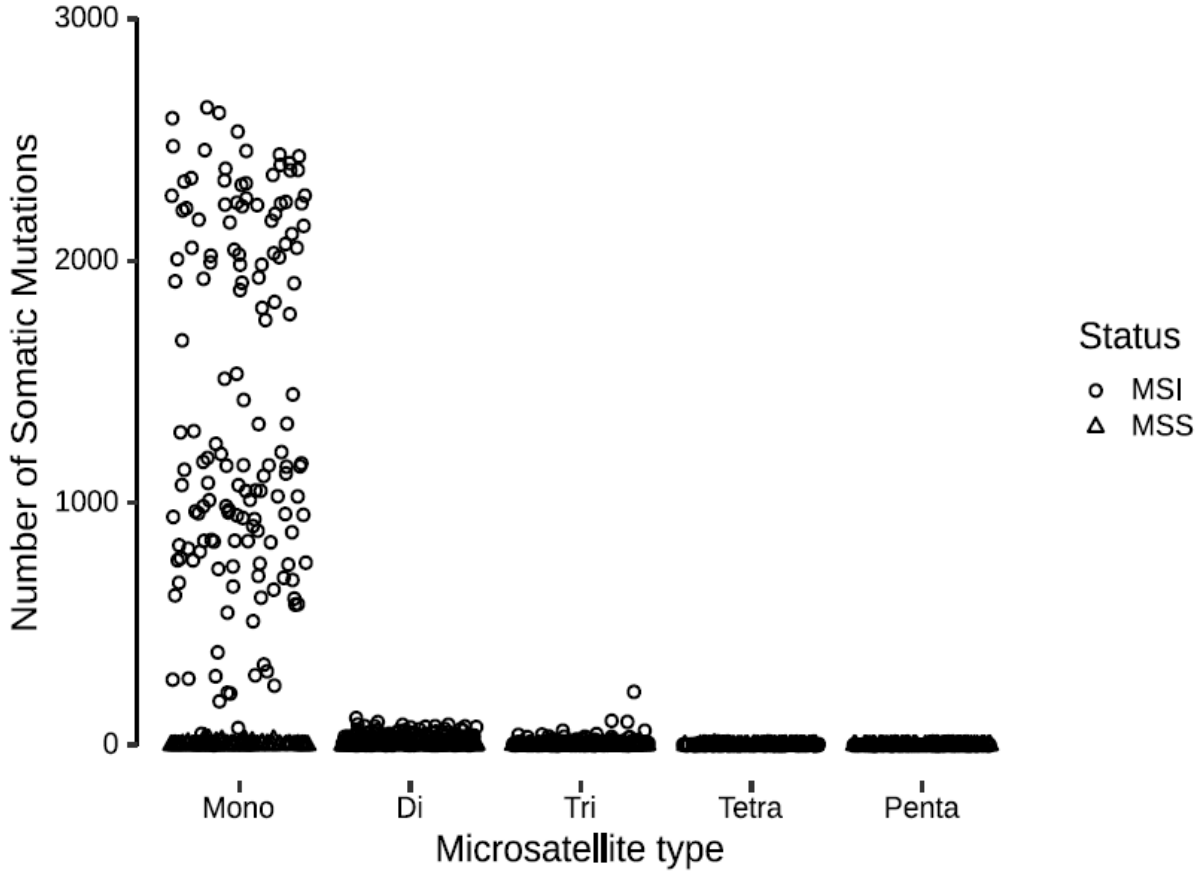


Figure 6A

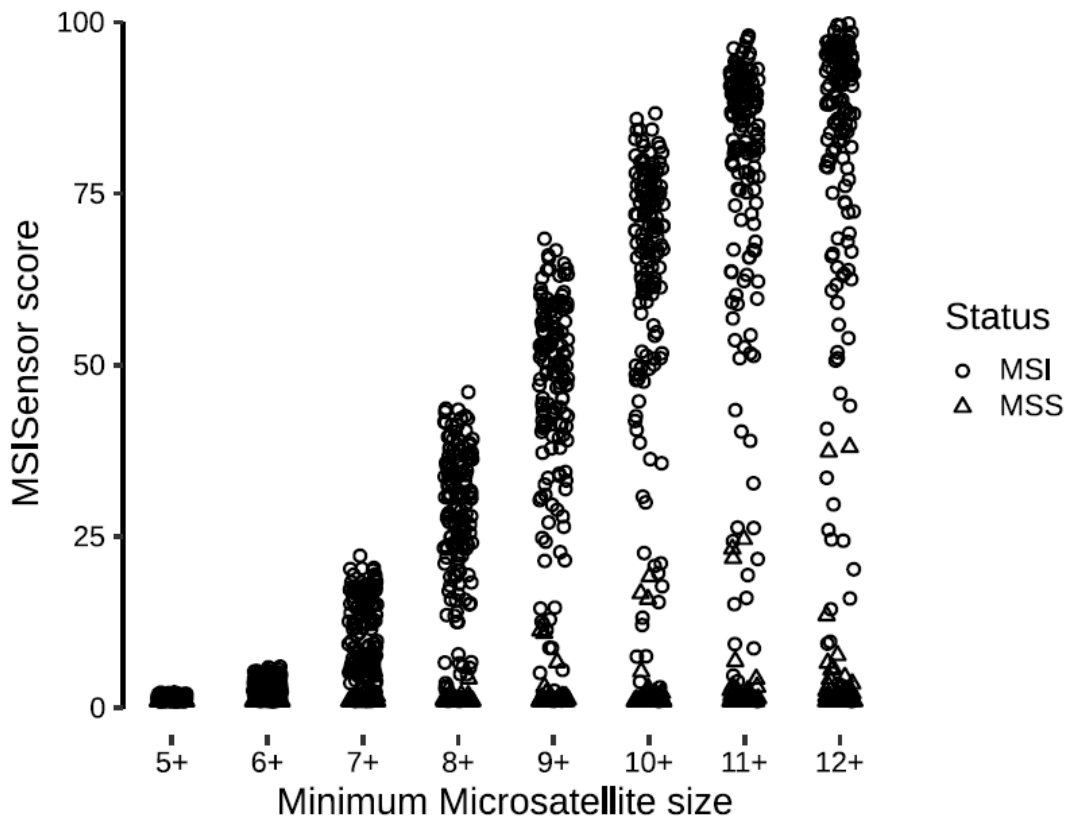


Figure 6 B

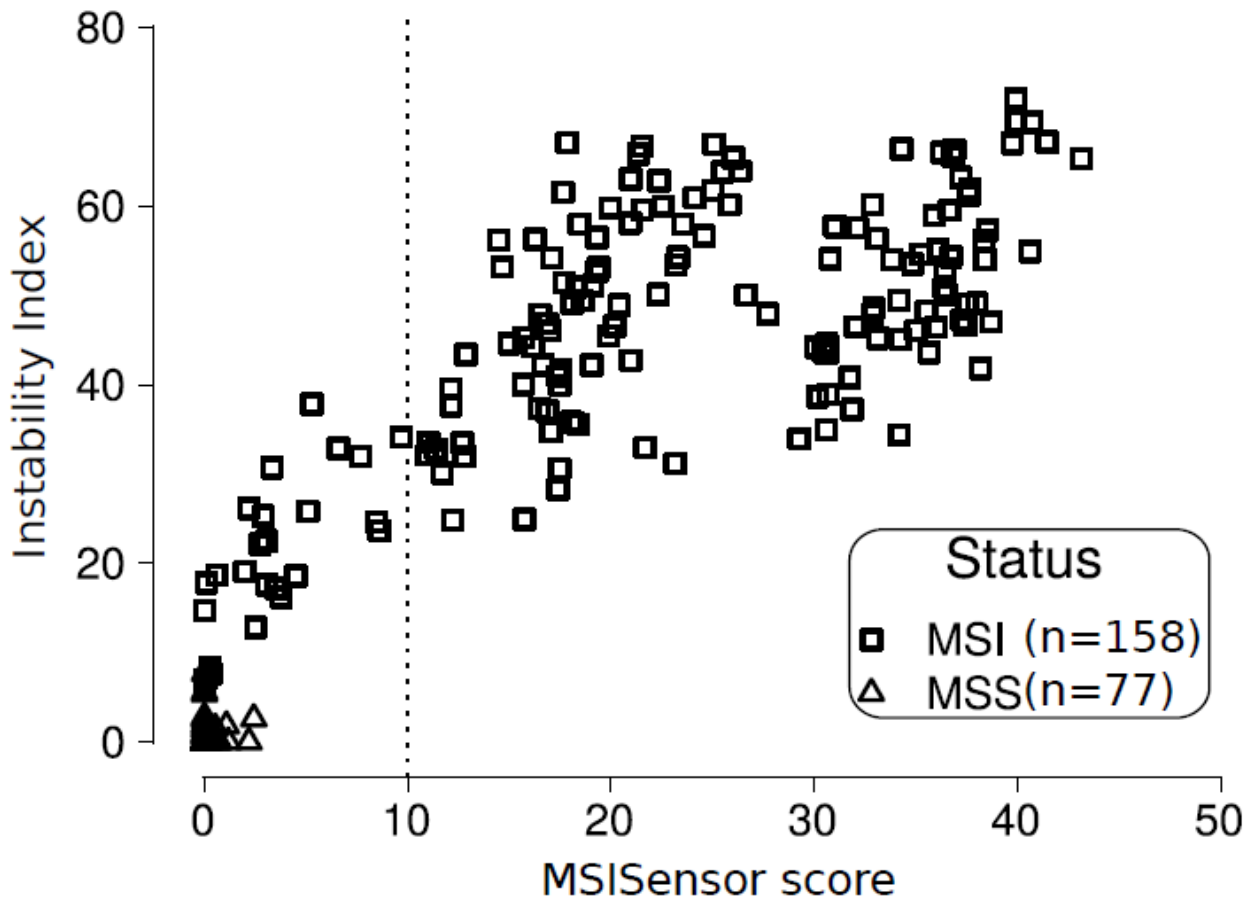


Figure 7

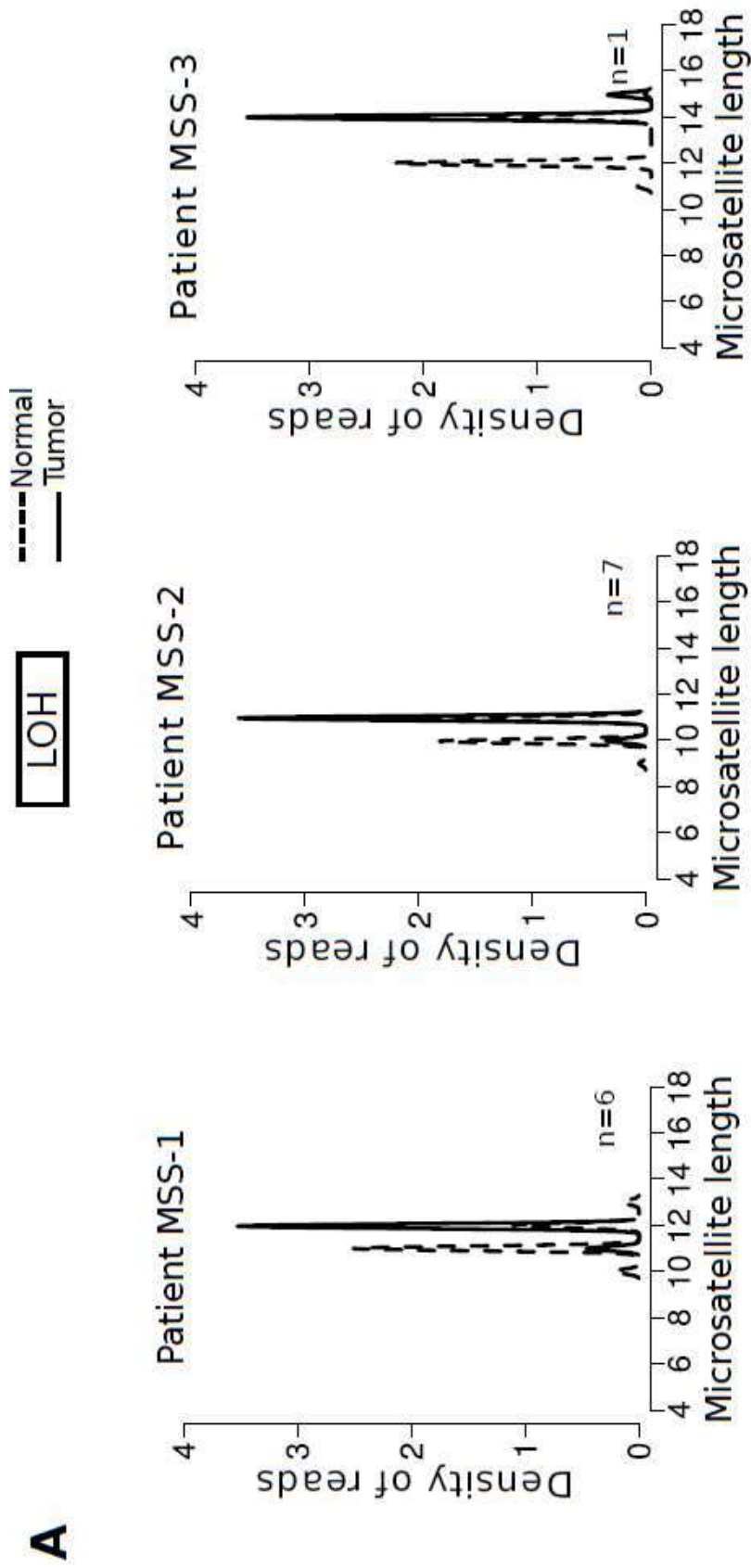


Figure 8A

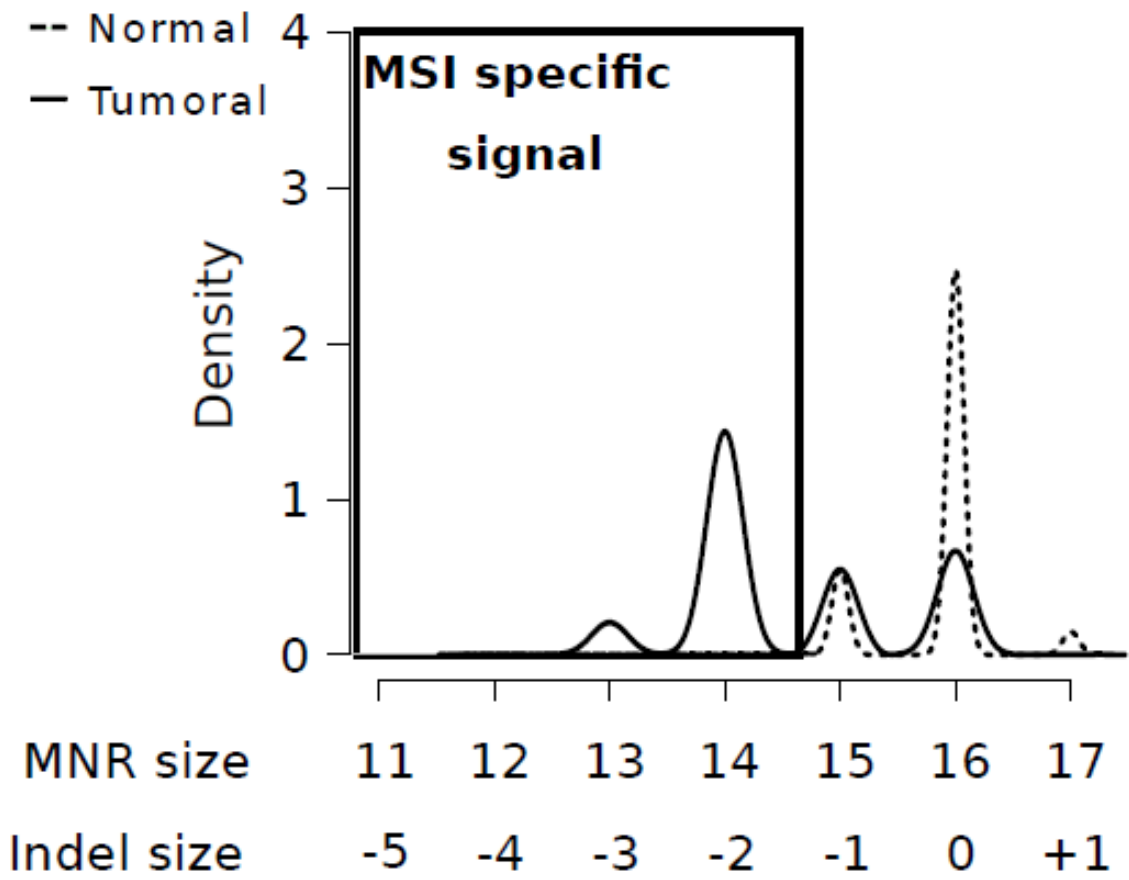


Figure 8B

# Conclusion, Discussion et perspectives

# Chapitre 7

## Discussion & Perspectives :

À l'ère de l'immunothérapie, la détection du phénotype MSI est un enjeu majeur. Facteur pronostique dans certains cas, le statut MSI est aussi et surtout devenu désormais un marqueur théranostique, prédictif de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Devenu un sujet brûlant après l'approbation par la FDA, ce bio marqueur a révolutionné la prise en charge clinique d'un sous-ensemble de patients atteints de cancer métastatique en pan-Cancer. Malgré le fait que ce statut MSI soit associé à une forte efficacité des ICKi, une proportion importante des patients avec un cancer MSI restent néanmoins réfractaires à l'immunothérapie. Par ailleurs, ces dernières années, l'avènement des technologies de séquençage à haut débit a grandement améliorées notre compréhension de la génomique des tumeurs. Au cours de ma thèse je me suis dans ce contexte intéressé à l'utilisation du NGS, technique en pleine émergence, pour le diagnostic du phénotype MSI dans le cancer ainsi que pour l'analyse des mécanismes de résistance des tumeurs MSI à l'Immunothérapie.

### 7.1 Développement du diagnostic MSI en NGS pan-tumoral

Le phénotype MSI est aujourd'hui le premier marqueur moléculaire permettant l'accès à une thérapie ciblée quelle que soit la localisation tumorale. Cette "révolution" théranostique pourrait imposer d'élargir le screening MSI à toutes les tumeurs. Et les progrès réalisés en NGS ont fourni un nouveau scénario pour sa détection. Au cours d'une première étude (article 1), nous avons mis en évidence, le manque de sensibilité de la méthode approuvée par la FDA et actuellement utilisée pour diagnostiquer le phénotype MSI en NGS (MSIsensor). Il est utile de rappeler que les patients mal diagnostiqués (faux négatifs) peuvent avoir fait l'objet de décisions de soins erronées, notamment en n'ayant pas pu bénéficier d'une immunothérapie en

situation métastatique. Dans mon travail, je montre que le manque de sensibilité de cette méthode de détection est en partie lié à une utilisation sous-optimale des séquences de microsatellites intégrées dans les analyses génomiques proposées. En nous appuyant sur les données de la littérature et en considérant le pourcentage tumoral, nous avons développé une nouvelle méthodologie qui semble parfaitement spécifique et sensible, du moins pour l'analyse des CCR. Ainsi, il est urgent d'affiner aujourd'hui les critères basés sur le NGS pour l'identification du phénotype MSI dans les CCR. La grande précision de MSICare pour le diagnostic MSI dont nous faisons la démonstration pourrait faire de ce test une référence pour l'évaluation du statut MSI dans les CCR à l'avenir.

Bien que les résultats suggèrent également la haute performance de MSICare pour détecter l'instabilité des microsatellites dans une série publique de cancers de l'estomac et de l'endomètre, une évaluation plus approfondie dans les types de cancers non colorectaux est nécessaire. D'ailleurs, les analyses génomiques à haut débit, au niveau pan-tumoral, ont permis de préciser aujourd'hui le paysage MSI. Et les différentes données qui sous-tendent l'utilité clinique de ce biomarqueur pourraient amener à une modification des pratiques courantes. En effet, au-delà d'une analyse du statut MSI uniquement dans les principales localisations tumorales (côlon rectum, endomètre, estomac), le diagnostic MSI pourrait s'élargir en cas de contexte familial évocateur chez un patient présentant un cancer ne faisant pas partie du spectre classique du syndrome de Lynch. Et éventuellement à termes sur tous les cancers nouvellement diagnostiqués puisque les tumeurs vont de plus en plus bénéficier d'un séquençage par NGS dans le contexte de leur prise en charge.

L'essor et la généralisation de la technologie NGS pour la recherche de biomarqueurs d'intérêt en clinique, en particulier en oncologie, sont sous-tendus par la capacité d'analyse transversale de celle-ci, qui s'étend bien au-delà du diagnostic MSI. Cette essor va de pair avec la démocratisation du NGS en partie liée à la baisse du prix de ces analyses de séquençage, au développement de panels de gènes d'intérêts et de tests compagnons (MSK-IMPACT, F1CDx etc), à la diversification des techniques actuelles (Illumina, Ion Torrent, Pacific Biosciences, Nanopore, Bio-nano Genomics etc).

Actuellement, l'application de certaines de ces méthodes repose sur l'utilisation de panels de gènes d'intérêt. Ces panels sont déterminants pour la réalisation d'un bon diagnostic. Pour des raisons économiques et pratiques (volume, rapidité d'analyse), l'utilisation d'un panel est aujourd'hui privilégiée pour standardiser l'analyse onco-génomique des patients, même si les analyses de l'exome ou du génome



entier commencent à s'implanter en routine (Plan France Médecine Génomique 2025 ; SeqOIA, AURAGEN etc..). Aux Etats-Unis, les panels comme MSK-IMPACT et FoundationOne CDx (F1CDx) sont approuvés par la FDA et peuvent donner lieu à un choix thérapeutique dans le cancer (DEN170058). Dans le cadre du diagnostic MSI, ces panels pourraient être améliorés en y intégrant d'avantage de microsatellites de type mononucléotidique et de grande taille dans leur capture, car ce sont ceux qui sont les plus sensibles pour la détection de l'instabilité microsatellitaire.

## 7.2 Autres approches MSI sur des échantillons de tissus tumoraux

Actuellement, la plupart des méthodes NGS de diagnostic MSI ont plusieurs limitations, telles que l'exigence d'échantillons normaux appariés comme contrôle (parfois inaccessibles), les ressources de calcul et le fait d'être analysées à de faibles profondeurs de séquençage et dans le contexte de faibles puretés tumorales. En particulier, en raison de l'exigence d'analyser les échantillons normaux appariés, les méthodes basées sur le NGS ne fonctionnent pas bien lors de l'investigation d'échantillons de leucémie ou de l'analyse de xéno greffes/organoïdes dérivées du patient. La version actuelle de MSICare nécessite la paire normale et tumorale pour l'identification du phénotype MSI. Cependant, des méthodes moléculaires basées sur des échantillons de tissu tumoraux uniquement ou de plasma ont été développées au laboratoire et elles permettront bientôt de s'affranchir du tissu sain pour l'identification du phénotype tumoral MSI.

Pour s'affranchir du tissu sain apparié, différentes méthodes existent ou sont envisageables. L'utilisation d'une base de référence (comme mSINGS, MIAMs, MSI sensor-pro, etc) via des modèles mathématiques, statistiques, d'apprentissage automatique ou encore des modèles d'apprentissage profond peuvent être considérés pour la prédiction et l'identification du statut MSI. Par ailleurs, l'utilisation d'un substitut au tissu sain, comme les panels d'échantillons normaux (PON, Panel of Normals) est aussi une possibilité. Cette méthode consiste tout simplement à fabriquer à partir d'échantillons normaux (dérivés de tissus sains dont on pense qu'ils ne présentent aucune altération somatique) un "normal alternatif" qui capture les artefacts techniques récurrents afin d'améliorer les résultats de l'analyse des appels de variants. Enfin, l'étude du polymorphisme et la considération de celui-ci au niveau de chaque microsatellite peut être une excellente alternative. En effet, l'intégration de la distribution des polymorphismes microsatellitaires directement au niveau des algorithmes de diagnostic permettrait une simple comparaison de cette

donnée (référence) à la donnée tumorale (distribution des allèles du microsatellite dans la tumeur). Cela permettrait d'inférer directement le statut mutationnel du microsatellite dans le tissu tumoral et ainsi de s'affranchir du tissu sain.

### 7.3 Vers les tests MSI en biopsie liquide

La biopsie tumorale représente la source de référence du matériel pour la détermination du statut MSI ; cependant, son utilisation clinique a plusieurs limites. Premièrement, le matériel tissulaire est parfois inaccessible en raison de la localisation tumorale et résulte d'une procédure invasive associée à des complications chirurgicales potentielles. Deuxièmement, il ne donne qu'une image instantanée de la diversité tumorale et peut ne pas saisir pleinement la complexité de la maladie. Dans quelques rares cas de tumeurs MMRd/MSI sporadiques, une hétérogénéité intra- et inter-tumorale peut survenir à la suite d'une émergence tardive de défauts MMR dans le développement tumoral (Evrard et al., 2019). La caractérisation du statut MMRd/MSI basée sur une seule biopsie tissulaire pourrait ainsi conduire à une mauvaise classification des MSI dans de tels cas.

La biopsie liquide, qui désigne l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) rejeté dans les fluides corporels (plasma, urine, salive,...) par les cellules tumorales, s'est imposée ces dernières années comme un substitut prometteur à la biopsie tumorale. La biopsie liquide est présentée comme un outil peu invasif et facilement reproductible, qui permet de surmonter le problème d'hétérogénéité spatiale et temporelle et permet le suivi de la maladie par échantillonnage itératif (Siravegna et al., 2019). La biopsie liquide a déjà été utilisée pour détecter diverses altérations liées au cancer, notamment des variations de nucléotides uniques, des événements d'insertion-délétion, des variations du nombre de copies, des fusions de gènes, des profils de méthylation de l'ADN, et récemment pour l'instabilité des microsatellites (Siravegna et al., 2017; Han et al., 2021). De nombreuses études ont révélé le potentiel clinique de la biopsie liquide dans l'établissement du diagnostic moléculaire tumoral, le suivi de la réponse au traitement, l'évaluation de la maladie résiduelle minimale, la détection des rechutes tumorales précoces ainsi que le suivi des mécanismes de résistance secondaires (Siravegna et al., 2019). La biopsie liquide a notamment révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules depuis son approbation par l'Agence européenne du médicament (EMA) et la FDA pour le profilage moléculaire lorsque le prélèvement tumoral n'était pas possible ou fournissait des résultats non contributifs (Luo et al., 2014; Douillard et al., 2014; Kwapisz, 2017).

Compte tenu de la tendance actuelle pour le diagnostic moléculaire des tumeurs basé sur l'analyse de l'ADNtc et des multiples enjeux du statut MSI dans la gestion du cancer, il existe un besoin croissant de développer de nouvelles approches pour le diagnostic du statut MSI sur des échantillons de sang. L'un des principaux défis techniques pour la détermination du statut MSI est qu'il nécessite des méthodes très sensibles en raison de la nature hautement fragmentée de l'ADNtc et de la faible fraction d'ADNtc parmi l'ADNc total dans les fluides corporels (aussi bas que 0,01% dans les stades précoces des cancers) (Diehl et al., 2008). Au cours des dernières années, des progrès importants dans l'amélioration de la résolution des problèmes tissulaires existants ont été accomplis.

En comparant les tests MSI conventionnels basés sur les tissus et les nouvelles approches basées sur l'ADNtc, une assez bonne conformité a été retrouvée (Silveira et al., 2020; Georgiadis et al., 2019; Willis et al., 2019). Cela suggère que le diagnostic MSI basé sur l'ADNtc pourrait être réalisé dans le cadre de la pratique clinique de routine afin de stratifier les patients ayant un meilleur pronostic et susceptibles de bénéficier d'une ICKi au stade métastatique, en particulier lorsque les échantillons de tissu sont indisponibles ou rares (Georgiadis et al., 2019; Willis et al., 2019; Lee et al., 2020). De plus, de nouveaux outils bio-informatiques, basés sur le NGS ont récemment vu le jour pour le diagnostic MSI via l'ADNtc (Cai et al., 2020; Wang et al., 2020; Han et al., 2021). Grâce à son caractère peu invasif, la biopsie liquide peut être répétée en série afin d'assurer un suivi de la maladie en temps réel sur la base de la cinétique de l'ADNtc. Les changements dans les niveaux d'instabilité dans l'ADN circulant pendant le traitement par ICKi sont bien corrélés avec ceux des autres marqueurs d'ADNtc et reflètent de manière fiable la réponse tumorale au traitement (Silveira et al., 2020). L'analyse séquentielle de l'ADNtc a également permis de détecter l'acquisition d'un phénotype MSI qui peut apparaître au cours de l'évolution du cancer chez des patients initialement diagnostiqués avec des tumeurs MSS (Moss et al., 2020; Abida et al., 2019). Certes, il n'a été démontré que quelques cas d'acquisition du phénotype MSI au cours de l'évolution de la maladie (Moss et al., 2020; Abida et al., 2019) ; cependant, ce phénomène peut avoir été sous-estimé étant donné que la plupart des tumeurs ne sont dépistées pour le statut MSI qu'au moment du diagnostic dans la pratique courante. L'intérêt d'un tel phénotype MSI acquis pour guider la décision thérapeutique reste évasif et doit être démontré par des études supplémentaires. En parallèle, une meilleure compréhension de l'évolution tumorale MSI, notamment depuis la genèse et l'acquisition de mutations dans des cryptes MMR déficiente ou dans l'adénome vers le développement de l'adénocarcinome pourrait éventuellement aider. L'utilisation d'une telle stratégie basée sur l'analyse cinétique d'échantillons de plasma augmente cependant considérablement le coût

des tests MSI. Dans ce contexte, des analyses coût-efficacité devraient être réalisées avant sa mise en uvre dans la pratique clinique.

## 7.4 TMB et réponse à l’immunothérapie

Suite au diagnostic du statut MSI dans les cancers, il est important de définir des stratégies qui peuvent aider les médecins à adapter la thérapie ciblée. En 2020, la FDA a accordé une autorisation accélérée au pembrolizumab pour le traitement des patients adultes et pédiatriques atteints de tumeurs solides non résecables ou métastatiques à charge mutationnelle tumorale élevée (TMB-H) [10 mutations/mégabase (mut/Mb)]. Dans une deuxième étude (article n°2, en préparation), nous n’avons pas réussi à démontrer que la charge mutationnelle ou le MSISensor prédisaient une réponse objective à l’immunothérapie chez les patients atteints de CCRm dans l’essai clinique NCTNIPICOL, contrairement à ce qui a été récemment rapporté dans deux autres cohortes prospectives de patients CCRm traités par ICKi ([Schrock et al., 2019](#); [Mandal et al., 2019](#)). Néanmoins, nous avons observé ici que 3 CCRm de NCTNIPICOL étaient MSS suite à une réévaluation centrale de leur statut dans notre centre expert et avaient donc été inclus par erreur dans cet essai clinique en raison d’un diagnostic erroné de leur statut MSI ou MMRd dans les centres d’origine. Nous émettons donc l’hypothèse que des erreurs de diagnostic dans le statut MSI des tumeurs se sont également produites dans des études prospectives publiées précédemment, et que cela a constitué un biais dans l’analyse de l’impact clinique du TMB ou du MSISensor.

Le caractère non prédictif de la TMB que nous observons dans la cohorte NCTNIPICOL a été validé dans une cohorte indépendante de 73 CCRm. Ces observations concordent bien avec les observations rapportées par Rousseau et collègues ([Rousseau et al., 2021](#)), selon laquelle, une TMB élevée ne prédit pas une amélioration de la survie globale après un traitement avec ICKi chez les MMRd/MSI. Comme cela a été effectué ici, il sera intéressant de confirmer davantage dans d’autres cohortes prospectives de patients atteints de CCRm que les niveaux d’instabilité génomiques de la tumeur ne sont pas prédictifs de la réponse aux ICKi après une évaluation minutieuse du statut MMRd/MSI des échantillons tumoraux pour exclure les faux positifs.

Dans notre étude, ni le TMB, ni le MSISensor ni le MSICare n’avaient de valeur prédictive en limitant l’analyse clinique aux cas vrais positifs de MSI, quel que soit le seuil utilisé pour séparer les patients. Ce point n’est pas surprenant puisque,

au cours de la progression tumorale MSI, la présentation de néo antigènes issus de l'instabilité microsatellitaire est rapidement un phénomène observé dans de nombreuses cellules tumorales qui peut permettre l'atteinte précoce d'une valeur seuil capable de déclencher une réponse immunitaire adaptative significative de la part de l'hôte.

De plus, la relation entre l'intensité de la réponse immunitaire dans les tumeurs MSI et le nombre de mutations somatiques dans le cancer est probablement très complexe et une simple interrelation entre l'intensité de cette réponse immunitaire et la charge mutationnelle n'est pas attendue. En revanche, nous avons observé qu'un patient MSS atteint de CCR métastatique, avec un score TMB et MSISensor plutôt élevé par rapport aux deux autres MSS CCRm, a affiché une réponse objective aux ICKi. Cela pourrait signifier que, comme suggéré récemment, le TMB aurait plutôt intérêt à prédire la réponse au l'ICKi dans certains CCRm immunogènes MMRp/MSS ([Chen et al., 2020](#)).

## 7.5 Importance de l'environnement tumoral dans la résistance au ICKi

La réponse à l'immunothérapie pourrait dépendre très fortement du micro- et macro-environnement de la tumeur. En effet, nous avons remarqué dans l'étude des mécanismes de résistance aux ICKi qui est associé à cette thèse que les patients résistant au traitement étaient majoritairement ceux avec un microenvironnement stomal enrichi en collagène et fibroblaste. La présence de ces éléments associés aux tumeurs pourrait créer une barrière physique qui empêcherait les lymphocytes d'exercer leurs activités antitumorales (notion d'exclusion des cellules immunitaires par la tumeur). Ainsi même après la réactivation du système immunitaire par les ICKi, les lymphocytes n'auraient pas d'effet considérable car ceux-ci n'atteindraient pas assez significativement la tumeur. Dans ce contexte, les stratégies ciblant la signalisation stromales combinées aux ICKi pourraient avoir à l'avenir une valeur thérapeutique potentielle pour ses patients.

Par ailleurs, au niveau macro-environnement, la localisation de la tumeur pourrait aussi jouer un rôle important dans la résistance aux ICKi. Le concept de site sanctuaires, tels que le cerveau, l'ovaire ou les testicules, sont bien connus dans le contexte de la chimiothérapie cytotoxique. À l'ère de l'immunothérapie, elle est étayée par l'existence de réponses tumorales dissociées. En outre, des études rétrospectives suggèrent que la sensibilité aux ICKi peut dépendre du site métastatique, les lésions

pulmonaires étant plus susceptibles de permettre une réponse objective que d'autres sites tels que les métastases hépatiques (Pires da Silva et al., 2020). Nous avons aussi suggéré dans le cadre de ce doctorat que les glandes surrénales pourraient constituer un site sanctuaire particulier en résistance à l'immunothérapie basée sur les ICKi. Et cela s'expliquerait éventuellement par la présence de glucocorticoïdes. En effet, les glandes surrénales ont pour rôle de sécréter des hormones impliquées dans différents processus. La partie externe de la glande, la cortico-surrénale, sécrète les glucocorticoïdes (cortisone). Ces hormones ont pour rôle, entre autres, de libérer le glucose stocké et donc de vitaliser l'organisme. Et il a été montré que l'administration systémique de glucocorticoïdes synthétiques tels que la dexaméthasone et la prednisolone a été associée à de moins bons résultats chez les patients atteints d'un cancer traité par ICKi. Ainsi, la compréhension de l'environnement global de la tumeur pourrait permettre en parallèle du diagnostic du statut MSI de cette dernière, une meilleure stratification pour une médecine de précision et une meilleure prise en charge des patients.

# Bibliographie

- Aaltonen, L. A., Peltomäki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J. P., Järvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., and Hamilton, S. R. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109):812–816.
- Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., de la Chapelle, A., Peltomäki, P., Mecklin, J. P., and Järvinen, H. J. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer*, 81(2):214–218.
- Abida, W., Cheng, M. L., Armenia, J., Middha, S., Autio, K. A., Vargas, H. A., Rathkopf, D., Morris, M. J., Danila, D. C., Slovin, S. F., Carbone, E., Barnett, E. S., Hullings, M., Hechtman, J. F., Zehir, A., Shia, J., Jonsson, P., Stadler, Z. K., Srinivasan, P., Laudone, V. P., Reuter, V., Wolchok, J. D., Socci, N. D., Taylor, B. S., Berger, M. F., Kantoff, P. W., Sawyers, C. L., Schultz, N., Solit, D. B., Gopalan, A., and Scher, H. I. (2019). Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. *JAMA oncology*, 5(4):471–478.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Ilicic, T., Imbeaud, S., Imielinski, M., Imielinsk, M., Jäger, N., Jones, D. T. W., Jones, D., Knappskog, S., Kool, M., Lakhani, S. R., López-Otín, C., Martin, S., Munshi, N. C., Nakamura, H., Northcott, P. A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J. V., Puente, X. S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A. L., Richter, J., Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T. N., Span, P. N., Teague, J. W., Totoki, Y., Tutt, A. N. J., Valdés-Mas, R., van Buuren, M. M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L. R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi, J., Futreal, P. A., McDermott, U., Lichter, P., Meyerson, M., Grimmond, S. M., Siebert, R., Campo, E., Shibata,

- T., Pfister, S. M., Campbell, P. J., and Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463):415–421.
- Alhopuro, P., Sammalkorpi, H., Niittymäki, I., Biström, M., Raitila, A., Saharinen, J., Nousiainen, K., Lehtonen, H. J., Heliövaara, E., Puhakka, J., Tuupanen, S., Sousa, S., Seruca, R., Ferreira, A. M., Hofstra, R. M. W., Mecklin, J.-P., Järvinen, H., Ristimäki, A., Orntoft, T. F., Hautaniemi, S., Arango, D., Karhu, A., and Aaltonen, L. A. (2012). Candidate driver genes in microsatellite-unstable colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 130(7):1558–1566.
- Andre, T., Amonkar, M., Norquist, J. M., Shiu, K.-K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C. J. A., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Sevilla, I., De La Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Diaz, L. A., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M., and Le, D. T. (2021a). Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 22(5):665–677.
- Andre, T., Lonardi, S., Wong, M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M., Van Cutsem, E., McDermott, R. S., Hill, A. G., Sawyer, M. B., Hendlisz, A., Neyns, B., Svrcek, M., Moss, R. A., Ledezine, J.-M., Cao, Z. A., Kamble, S., Kopetz, S., and Overman, M. J. (2018). Nivolumab + ipilimumab combination in patients with DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high (dMMR/MSI-H) metastatic colorectal cancer (mCRC): First report of the full cohort from CheckMate-142. *Journal of Clinical Oncology*, 36(4\_suppl):553–553. Publisher: Wolters Kluwer.
- Andre, T., Shiu, K.-K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C. J. A., Smith, D. M., Garcia-Carbonero, R., Alcaide, J., Gibbs, P., De La Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J. C., Le, D. T., Yoshino, T., Zhong, W. Y., Fogelman, D. R., Marinello, P., and Diaz, L. A. (2021b). Final overall survival for the phase III KN177 study: Pembrolizumab versus chemotherapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 39(15\_suppl):3500–3500. Publisher: Wolters Kluwer.
- André, T. (2019). [Microsatellite instability (MSI): best predictor of effectiveness of immune checkpoint inhibitors (ICKi)? Focus on MSI by Bulletin du Cancer]. *Bulletin Du Cancer*, 106(2):91–93.



- André, T., de Gramont, A., Vernerey, D., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Tijeras-Raballand, A., Scriver, A., Hickish, T., Tabernero, J., Van Laethem, J. L., Banzi, M., Maartense, E., Shmueli, E., Carlsson, G. U., Scheithauer, W., Papamichael, D., Möehler, M., Landolfi, S., Demetter, P., Colote, S., Tournigand, C., Louvet, C., Duval, A., Fléjou, J.-F., and de Gramont, A. (2015). Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(35):4176–4187.
- André, T., Shiu, K.-K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J., Le, D. T., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M. Z., Marinello, P., and Diaz, L. A. (2020). Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383(23):2207–2218. Publisher: Massachusetts Medical Society \_eprint: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699>.
- Baker, K. E. and Parker, R. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(3):293–299.
- Baralle, F. E. and Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(7):437–451.
- Barata, P., Agarwal, N., Nussenzveig, R., Gerendash, B., Jaeger, E., Hatton, W., Ledet, E., Lewis, B., Layton, J., Babiker, H., Bryce, A., Garje, R., Stein, C., Kiedrowski, L., Saylor, P., and Sartor, O. (2020). Clinical activity of pembrolizumab in metastatic prostate cancer with microsatellite instability high (MSI-H) detected by circulating tumor DNA. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2):e001065.
- Baruch, E. N., Youngster, I., Ben-Betzalel, G., Ortenberg, R., Lahat, A., Katz, L., Adler, K., Dick-Necula, D., Raskin, S., Bloch, N., Rotin, D., Anafi, L., Avivi, C., Melnichenko, J., Steinberg-Silman, Y., Mamtani, R., Harati, H., Asher, N., Shapira-Frommer, R., Brosh-Nissimov, T., Eshet, Y., Ben-Simon, S., Ziv, O., Khan, M. A. W., Amit, M., Ajami, N. J., Barshack, I., Schachter, J., Wargo, J. A., Koren, O., Markel, G., and Boursi, B. (2021). Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6529):602–609.
- Beatty, G. L. and Gladney, W. L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide

- for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(4):687–692.
- Berardinelli, G. N., Scapulatempo-Neto, C., Durães, R., Antônio de Oliveira, M., Guimarães, D., and Reis, R. M. (2018). Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients. *Oncotarget*, 9(47):28691–28701.
- Bicknell, D. C., Kaklamanis, L., Hampson, R., Bodmer, W. F., and Karran, P. (1996). Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Current biology: CB*, 6(12):1695–1697.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., and Gajewski, T. F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Research*, 64(3):1140–1145.
- Bokemeyer, C., Van Cutsem, E., Rougier, P., Ciardiello, F., Heeger, S., Schlichting, M., Celik, I., and Köhne, C.-H. (2012). Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 48(10):1466–1475.
- Boland, C. R. and Goel, A. a. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6):2073–2087.e3.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*, 58(22):5248–5257.
- Bonneville, R., Krook, M. A., Kautto, E. A., Miya, J., Wing, M. R., Chen, H.-Z., Reeser, J. W., Yu, L., and Roychowdhury, S. (2017). Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO precision oncology*, 2017.
- Bortolomeazzi, M., Keddar, M. R., Montorsi, L., Acha-Sagredo, A., Benedetti, L., Temelkovski, D., Choi, S., Petrov, N., Todd, K., Wai, P., Kohl, J., Denner, T., Nye, E., Goldstone, R., Ward, S., Wilson, G. A., Bakir, M. A., Swanton, C., John, S., Miles, J., Larijani, B., Kunene, V., Fontana, E., Arkenau, H.-T., Parker, P. J., Rodriguez-Justo, M., Shiu, K.-K., Spencer, J., and Ciccarelli, F. D. (2021). Immunogenomics of Colorectal Cancer Response to Checkpoint Blockade: Analysis

of the KEYNOTE 177 Trial and Validation Cohorts. *Gastroenterology*, 0(0). Publisher: Elsevier.

- Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T. M., McMiller, T. L., Gilson, M. M., Wang, C., Selby, M., Taube, J. M., Anders, R., Chen, L., Korman, A. J., Pardoll, D. M., Lowy, I., and Topalian, S. L. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(19):3167–3175.
- Buckowitz, A., Knaebel, H.-P., Benner, A., Bläker, H., Gebert, J., Kienle, P., von Knebel Doeberitz, M., and Kloor, M. (2005). Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British Journal of Cancer*, 92(9):1746–1753.
- Buhard, O., Cattaneo, F., Wong, Y. F., Yim, S. F., Friedman, E., Flejou, J.-F., Duval, A., and Hamelin, R. (2006). Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(2):241–251.
- Buhard, O., Lagrange, A., Guilloux, A., Colas, C., Chouchène, M., Wanherdrick, K., Coulet, F., Guillerm, E., Dorard, C., Marisa, L., Bokhari, A., Greene, M., El-Murr, N., Bodo, S., Muleris, M., Sourouille, I., Svrcek, M., Cervera, P., Blanché, H., Lefevre, J. H., Parc, Y., Lepage, C., Chapusot, C., Bouvier, A.-M., Gaub, M.-P., Selves, J., Garrett, K., Iacopetta, B., Soong, R., Hamelin, R., Garrido, C., Lascols, O., André, T., Fléjou, J.-F., Collura, A., and Duval, A. (2016). HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics*, 53(6):377–384.
- Buhard, O., Suraweera, N., Lectard, A., Duval, A., and Hamelin, R. (2004). Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Disease Markers*, 20(4-5):251–257.
- Cabrera, C. M., Jiménez, P., Cabrera, T., Esparza, C., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2003). Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*, 61(3):211–219.
- Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., van Schoiack, A.,

- Lövgren, K., Warren, S., Jirström, K., Olsson, H., Pietras, K., Ingvar, C., Isaksson, K., Schadendorf, D., Schmidt, H., Bastholt, L., Carneiro, A., Wargo, J. A., Svane, I. M., and Jönsson, G. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*, 577(7791):561–565.
- Cai, Z., Wang, Z., Liu, C., Shi, D., Li, D., Zheng, M., Han-Zhang, H., Lizaso, A., Xiang, J., Lv, J., Wu, W., Zhang, Z., Zhang, Z., Yuan, F., He, S., and Sun, J. (2020). Detection of Microsatellite Instability from Circulating Tumor DNA by Targeted Deep Sequencing. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 22(7):860–870.
- Cancer Genome Atlas Network and (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407):330–337.
- Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J., and Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32(3):634–643.
- Chakrabarti, S., Huebner, L. J., Finnes, H. D., Muranyi, A., Clements, J., Singh, S., Hubbard, J. M., McWilliams, R. R., Shanmugam, K., and Sinicrope, F. A. (2019). Intratumoral CD3+ and CD8+ T-Cell Densities in Patients With DNA Mismatch Repair Deficient Metastatic Colorectal Cancer Receiving Programmed Cell Death-1 Blockade. *JCO Precision Oncology*, (3):1–7. Publisher: Wolters Kluwer.
- Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., Ross, J. S., Garraway, L., Miller, V. A., Stephens, P. J., and Frampton, G. M. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*, 9(1):34.
- Champiat, S., Lambotte, O., Barreau, E., Belkhir, R., Berdelou, A., Carbonnel, F., Cauquil, C., Chanson, P., Collins, M., Durrbach, A., Ederhy, S., Feuillet, S., François, H., Lazarovici, J., Le Pavec, J., De Martin, E., Mateus, C., Michot, J.-M., Samuel, D., Soria, J.-C., Robert, C., Eggermont, A., and Marabelle, A. (2016). Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: a collaborative position paper. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(4):559–574.
- Chang, Y.-F., Imam, J. S., and Wilkinson, M. F. (2001). Microsatellites in the

- eukaryotic dna mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Research*.
- Chang, Y.-F., Imam, J. S., and Wilkinson, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 76:51–74.
- Chatterjee, S. and Pal, J. K. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*, 101(5):251–262.
- Chen, E. X., Jonker, D. J., Loree, J. M., Kennecke, H. F., Berry, S. R., Couture, F., Ahmad, C. E., Goffin, J. R., Kavan, P., Harb, M., Colwell, B., Samimi, S., Samson, B., Abbas, T., Aucoin, N., Aubin, F., Koski, S. L., Wei, A. C., Magoski, N. M., Tu, D., and O'Callaghan, C. J. (2020). Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients With Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study. *JAMA oncology*, 6(6):831–838.
- Chen, J. and Weiss, W. A. (2015). Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34(1):1–14.
- Cheng, D. T., Mitchell, T. N., Zehir, A., Shah, R. H., Benayed, R., Syed, A., Chandramohan, R., Liu, Z. Y., Won, H. H., Scott, S. N., Brannon, A. R., O'Reilly, C., Sadowska, J., Casanova, J., Yannes, A., Hechtman, J. F., Yao, J., Song, W., Ross, D. S., Oultache, A., Dogan, S., Borsu, L., Hameed, M., Nafa, K., Arcila, M. E., Ladanyi, M., and Berger, M. F. (2015). Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT). *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 17(3):251–264.
- Chiossone, L., Vienne, M., Kerdiles, Y. M., and Vivier, E. (2017). Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more. *Seminars in Immunology*, 31:55–63.
- Cocco, E., Benhamida, J., Middha, S., Zehir, A., Mullaney, K., Shia, J., Yaeger, R., Zhang, L., Wong, D., Villafania, L., Nafa, K., Scaltriti, M., Drilon, A., Saltz, L., Schram, A. M., Stadler, Z. K., Hyman, D. M., Benayed, R., Ladanyi, M., and Hechtman, J. F. (2019). Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Research*, 79(6):1047–1053.
- Cohen, R., Cervera, P., Svrcek, M., Dumont, C., Garcia, M.-L., Chibaudel, B., de Gramont, A., Pocard, M., Duval, A., Fléjou, J.-F., and André, T. (2015). [DNA mismatch repair and BRAF status in colorectal cancer: Interest for the therapeutic management?]. *Bulletin Du Cancer*, 102(6 Suppl 1):S72–81.

- Cohen, R., Hain, E., Buhard, O., Guilloux, A., Bardier, A., Kaci, R., Bertheau, P., Renaud, F., Bibeau, F., Fléjou, J.-F., André, T., Svrcek, M., and Duval, A. (2019). Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA oncology*, 5(4):551–555.
- Cohen, R., Rousseau, B., Vidal, J., Colle, R., Diaz, L. A., and André, T. (2020). Immune Checkpoint Inhibition in Colorectal Cancer: Microsatellite Instability and Beyond. *Targeted Oncology*, 15(1):11–24.
- Cohen, R., Taieb, J., Fiskum, J., Yothers, G., Goldberg, R., Yoshino, T., Alberts, S., Allegra, C., de Gramont, A., Seitz, J.-F., O’Connell, M., Haller, D., Wolmark, N., Erlichman, C., Zaniboni, A., Lonardi, S., Kerr, R., Grothey, A., Sinicrope, F. A., André, T., and Shi, Q. (2021). Microsatellite Instability in Patients With Stage III Colon Cancer Receiving Fluoropyrimidine With or Without Oxaliplatin: An ACCENT Pooled Analysis of 12 Adjuvant Trials. *Journal of Clinical Oncology*, 39(6):642–651. Publisher: Wolters Kluwer.
- Colas, C., Coulet, F., Svrcek, M., Collura, A., Fléjou, J.-F., Duval, A., and Hamelin, R. (2012). Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Advances in Cancer Research*, 113:121–166.
- Colle, R. and Cohen, R. (2019). [Epidemiology of microsatellite instability across solid neoplasms]. *Bulletin Du Cancer*, 106(2):114–118.
- Colle, R., Radzik, A., Cohen, R., Pellat, A., Lopez-Tabada, D., Cachanado, M., Duval, A., Svrcek, M., Menu, Y., and André, T. (2021). Pseudoprogression in patients treated with immune checkpoint inhibitors for microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 144:9–16.
- Collura, A., Lagrange, A., Svrcek, M., Marisa, L., Buhard, O., Guilloux, A., Wannerherdrick, K., Dorard, C., Taieb, A., Saget, A., Loh, M., Soong, R., Zeps, N., Platell, C., Mews, A., Iacopetta, B., De Thonel, A., Seigneuric, R., Marcion, G., Chapusot, C., Lepage, C., Bouvier, A.-M., Gaub, M.-P., Milano, G., Selves, J., Senet, P., Delarue, P., Arzouk, H., Lacoste, C., Coquelle, A., Bengrine-Lefèvre, L., Tournigand, C., Lefèvre, J. H., Parc, Y., Biard, D. S., Fléjou, J.-F., Garrido, C., and Duval, A. (2014). Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology*, 146(2):401–411.e1.
- Collura, A., Lefevre, J. H., Svrcek, M., Tougeron, D., Zaanani, A., and Duval,

- A. (2019). [Microsatellite instability and cancer: from genomic instability to personalized medicine]. *Medecine Sciences: M/S*, 35(6-7):535–543.
- Cortes-Ciriano, I., Lee, S., Park, W.-Y., Kim, T.-M., and Park, P. J. a. (2017). A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nature Communications*, 8:15180.
- Davar, D., Dzutsev, A. K., McCulloch, J. A., Rodrigues, R. R., Chauvin, J.-M., Morrison, R. M., Deblasio, R. N., Menna, C., Ding, Q., Pagliano, O., Zidi, B., Zhang, S., Badger, J. H., Vetizou, M., Cole, A. M., Fernandes, M. R., Prescott, S., Costa, R. G. F., Balaji, A. K., Morgun, A., Vujkovic-Cvijin, I., Wang, H., Borhani, A. A., Schwartz, M. B., Dubner, H. M., Ernst, S. J., Rose, A., Najjar, Y. G., Belkaid, Y., Kirkwood, J. M., Trinchieri, G., and Zarour, H. M. (2021). Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6529):595–602.
- Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J. P., Allen, B. A., Truta, B., Sleisenger, M. H., and Kim, Y. S. (2004). BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(1 Pt 1):191–195.
- Derosa, L., Hellmann, M. D., Spaziano, M., Halpenny, D., Fidelle, M., Rizvi, H., Long, N., Plodkowski, A. J., Arbour, K. C., Chaft, J. E., Rouche, J. A., Zitvogel, L., Zalcman, G., Albiges, L., Escudier, B., and Routy, B. (2018). Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(6):1437–1444.
- Des Guetz, G., Uzzan, B., Nicolas, P., Schischmanoff, O., Perret, G.-Y., and Morere, J.-F. (2009). Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Research*, 29(5):1615–1620.
- Dhomen, N. and Marais, R. (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(1):31–39.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S. A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Diaz, L. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9):985–990.

- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., Lebecque, S., Fridman, W.-H., and Cadranel, J. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(27):4410–4417.
- Doeberitz, M. v. K., Kloor, M., Reuschenbach, M., Pauligk, C., Rafiyan, M.-R., Batran, S.-E. A., Karbach, J., Tariverdian, M., and Jaeger, E. a. (2016). Abstract A006: Frameshift peptide neoantigens as vaccine targets in microsatellite-unstable cancers. *Cancer Immunology Research*, 4(11 Supplement):A006–A006. Publisher: American Association for Cancer Research Section: Antigen and Vaccines.
- Dohet, C., Wagner, R., and Radman, M. a. (1985). Repair of defined single base-pair mismatches in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2):503–505.
- Dolcetti, R., Viel, A., Doglioni, C., Russo, A., Guidoboni, M., Capozzi, E., Vecchiato, N., Macrì, E., Fornasarig, M., and Boiocchi, M. (1999). High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *The American Journal of Pathology*, 154(6):1805–1813.
- Domingo, E., Espín, E., Armengol, M., Oliveira, C., Pinto, M., Duval, A., Brennetot, C., Seruca, R., Hamelin, R., Yamamoto, H., and Schwartz, S. (2004a). Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 39(2):138–142.
- Domingo, E., Laiho, P., Ollikainen, M., Pinto, M., Wang, L., French, A. J., Westra, J., Frebourg, T., Espín, E., Armengol, M., Hamelin, R., Yamamoto, H., Hofstra, R. M. W., Seruca, R., Lindblom, A., Peltomäki, P., Thibodeau, S. N., Aaltonen, L. A., and Schwartz, S. (2004b). BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *Journal of Medical Genetics*, 41(9):664–668.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E., and Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8):793–800.
- Dorard, C., de Thonel, A., Collura, A., Marisa, L., Svrcek, M., Lagrange, A., Jegou, G., Wanherdrick, K., Joly, A. L., Buhard, O., Gobbo, J., Penard-Lacronique, V., Zouali, H., Tubacher, E., Kirzin, S., Selves, J., Milano, G., Etienne-Grimaldi,



- M.-C., Bengrine-Lefèvre, L., Louvet, C., Tournigand, C., Lefèvre, J. H., Parc, Y., Tiret, E., Fléjou, J.-F., Gaub, M.-P., Garrido, C., and Duval, A. (2011). Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature Medicine*, 17(10):1283–1289.
- Douillard, J.-Y., Ostoros, G., Cobo, M., Ciuleanu, T., Cole, R., McWalter, G., Walker, J., Dearden, S., Webster, A., Milenkova, T., and McCormack, R. (2014). Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(9):1345–1353.
- Dronca, R. S., Liu, X., Harrington, S. M., Chen, L., Cao, S., Kottschade, L. A., McWilliams, R. R., Block, M. S., Nevala, W. K., Thompson, M. A., Mansfield, A. S., Park, S. S., Markovic, S. N., and Dong, H. T cell Bim levels reflect responses to antiPD-1 cancer therapy. *JCI Insight*, 1(6):e86014.
- Duval, A. and Hamelin, R. (2002). Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch Repair-deficient Human Cancers: Toward a New Concept of Target Genes for Instability. *Cancer Research*, 62(9):2447–2454. Publisher: American Association for Cancer Research Section: Review.
- Duval, A., Reperant, M., Compoint, A., Seruca, R., Ranzani, G. N., Iacopetta, B., and Hamelin, R. (2002). Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Research*, 62(6):1609–1612.
- Duval, A., Rolland, S., Compoint, A., Tubacher, E., Iacopetta, B., Thomas, G., and Hamelin, R. (2001). Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Human Molecular Genetics*, 10(5):513–518.
- El-Bchiri, J., Buhard, O., Penard-Lacronique, V., Thomas, G., Hamelin, R., and Duval, A. (2005). Differential nonsense mediated decay of mutated mRNAs in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Human Molecular Genetics*, 14(16):2435–2442.
- El-Bchiri, J., Guilloux, A., Dartigues, P., Loire, E., Mercier, D., Buhard, O., Sobhani, I., de la Grange, P., Auboeuf, D., Praz, F., Fléjou, J.-F., and Duval, A. a. (2008). Nonsense-mediated mRNA decay impacts MSI-driven carcinogenesis and anti-tumor immunity in colorectal cancers. *PloS One*, 3(7):e2583.

- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 5(6):435–445.
- Endo, E., Okayama, H., Saito, K., Nakajima, S., Yamada, L., Ujiie, D., Kase, K., Fujita, S., Endo, H., Sakamoto, W., Saito, M., Saze, Z., Momma, T., Ohki, S., Mimura, K., and Kono, K. (2020). A TGF-Dependent Stromal Subset Underlies Immune Checkpoint Inhibitor Efficacy in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Colorectal Cancer. *Molecular cancer research: MCR*, 18(9):1402–1413.
- Engel, C., Forberg, J., Holinski-Feder, E., Pagenstecher, C., Plaschke, J., Kloor, M., Poremba, C., Pox, C. P., Rüschoff, J., Keller, G., Dietmaier, W., Rümmele, P., Friedrichs, N., Mangold, E., Buettner, R., Schackert, H. K., Kienle, P., Stemmler, S., Moeslein, G., Loeffler, M., and German HNPCC Consortium (2006). Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 118(1):115–122.
- Escudié, F., Van Goethem, C., Grand, D., Vendrell, J., Vigier, A., Brousset, P., Evrard, S. M., Solassol, J., and Selves, J. (2019). MIAMs: microsatellite instability detection on NGS amplicons data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, page btz797.
- Evrard, C., Tachon, G., Randrian, V., Karayan-Tapon, L., and Tougeron, D. (2019). Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers*, 11(10):1567.
- Fanoni, D., Tavecchio, S., Recalcati, S., Balice, Y., Venegoni, L., Fiorani, R., Crosti, C., and Berti, E. (2011). New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas. *Immunology Letters*, 134(2):157–160.
- Fayette, J., Bauman, J., Salas, S., Colevas, D., Even, C., Cupissol, D., Posner, M. R., Lefebvre, G., Saada-Bouzzid, E., Bernadach, M., Seiwert, T., Pearson, A., Messouak, S., Cornen, S. L., Andre, P., Rotolo, F., Boyer-Chammard, A., and Cohen, R. B. (2020). 81P Monalizumab in combination with cetuximab post platinum and anti-PD-(L)1 in patients with recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN): Updated results from a phase II trial. *Annals of Oncology*, 31:S1450. Publisher: Elsevier.
- Ferreira, A. M., Tuominen, I., Sousa, S., Gerbens, F., van Dijk-Bos, K., Osinga, J., Kooi, K. A., Sanjabi, B., Esendam, C., Oliveira, C., Terpstra, P., Hardonk,

- M., van der Sluis, T., Zazula, M., Stachura, J., van der Zee, A. G., Hollema, H., Sijmons, R. H., Aaltonen, L. A., Seruca, R., Hofstra, R. M. W., and Westers, H. (2014). New target genes in endometrial tumors show a role for the estrogen-receptor pathway in microsatellite-unstable cancers. *Human Mutation*, 35(12):1514–1523.
- Fiszbein, A. and Kornblihtt, A. R. (2017). Alternative splicing switches: Important players in cell differentiation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(6).
- Foltz, S. M., Liang, W.-W., Xie, M., and Ding, L. a. (2017). MIRMMR: binary classification of microsatellite instability using methylation and mutations. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(23):3799–3801.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., and Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7):1027–1034.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., and Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795):1960–1964.
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., Nagtegaal, I. D., Palmqvist, R., Mascucci, G. V., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., Asslaber, M., D’Arrigo, C., Vidal-Vanaclocha, F., Zavadova, E., Chouchane, L., Ohashi, P. S., Hafezi-Bakhtiari, S., Wouters, B. G., Roehrl, M., Nguyen, L., Kawakami, Y., Hazama, S., Okuno, K., Ogino, S., Gibbs, P., Waring, P., Sato, N., Torigoe, T., Itoh, K., Patel, P. S., Shukla, S. N., Wang, Y., Kopetz, S., Sinicrope, F. A., Scripcariu, V., Ascierto, P. A., Marincola, F. M., Fox, B. A., and Pagès, F. (2014). Towards the introduction of the Immunoscore in the classification of malignant tumours. *The Journal of Pathology*, 232(2):199–209.
- Ganai, R. A. and Johansson, E. a. (2016). DNA Replication-A Matter of Fidelity. *Molecular Cell*, 62(5):745–755.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Tor-

- rejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., and Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6):1189–1201.
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Lucey, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., and KEYNOTE-001 Investigators (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(21):2018–2028.
- Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T., and Modrich, P. (1998). Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31):19895–19901.
- Georgiadis, A., Durham, J. N., Keefe, L. A., Bartlett, B. R., Zielonka, M., Murphy, D., White, J. R., Lu, S., Verner, E. L., Ruan, F., Riley, D., Anders, R. A., Gedvilaite, E., Angiuoli, S., Jones, S., Velculescu, V. E., Le, D. T., Diaz, L. A., and Sausen, M. (2019). Noninvasive Detection of Microsatellite Instability and High Tumor Mutation Burden in Cancer Patients Treated with PD-1 Blockade. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(23):7024–7034.
- Giannini, G., Rinaldi, C., Ristori, E., Ambrosini, M. I., Cerignoli, F., Viel, A., Bidoli, E., Berni, S., D’Amati, G., Scambia, G., Frati, L., Screpanti, I., and Gulino, A. (2004). Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene*, 23(15):2640–2647.
- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T. K. D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., Validire, P., Remark, R., Hammond, S. A., Cremer, I., Damotte, D., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Research*, 74(3):705–715.
- Gordon, S. R., Maute, R. L., Dulken, B. W., Hutter, G., George, B. M., McCracken, M. N., Gupta, R., Tsai, J. M., Sinha, R., Corey, D., Ring, A. M., Connolly, A. J.,

- and Weissman, I. L. (2017). PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature*, 545(7655):495–499.
- Granier, C., Soumelis, V., Mandavit, M., Gibault, L., Belazzoug, R., de Guillebon, E., Badoual, C., Tartour, E., and Roussel, H. a. (2017). [The "immune checkpoints", how does it work]. *Annales De Pathologie*, 37(1):18–28.
- Grasso, C. S., Giannakis, M., Wells, D. K., Hamada, T., Mu, X. J., Quist, M., Nowak, J. A., Nishihara, R., Qian, Z. R., Inamura, K., Morikawa, T., Noshu, K., Abril-Rodriguez, G., Connolly, C., Escuin-Ordinas, H., Geybels, M. S., Grady, W. M., Hsu, L., Hu-Lieskovan, S., Huyghe, J. R., Kim, Y. J., Krystofinski, P., Leiserson, M. D. M., Montoya, D. J., Nadel, B. B., Pellegrini, M., Pritchard, C. C., Puig-Saus, C., Quist, E. H., Raphael, B. J., Salipante, S. J., Shin, D. S., Shinbrot, E., Shirts, B., Shukla, S., Stanford, J. L., Sun, W., Tsoi, J., Upfill-Brown, A., Wheeler, D. A., Wu, C. J., Yu, M., Zaidi, S. H., Zaretsky, J. M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Garraway, L. A., Hudson, T. J., Fuchs, C. S., Ribas, A., Ogino, S., and Peters, U. (2018). Genetic Mechanisms of Immune Evasion in Colorectal Cancer. *Cancer Discovery*, 8(6):730–749.
- Greaves, M. and Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381):306–313.
- Gu-Trantien, C., Migliori, E., Buisseret, L., de Wind, A., Brohée, S., Garaud, S., Noël, G., Dang Chi, V. L., Lodewyckx, J.-N., Naveaux, C., Duvillier, H., Goriely, S., Larsimont, D., and Willard-Gallo, K. (2017). CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI insight*, 2(11):91487.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., Homicsko, K., Maru, D., Manyam, G. C., Broom, B., Boige, V., Perez-Villamil, B., Laderas, T., Salazar, R., Gray, J. W., Hanahan, D., Tabernero, J., Bernards, R., Friend, S. H., Laurent-Puig, P., Medema, J. P., Sadanandam, A., Wessels, L., Delorenzi, M., Kopetz, S., Vermeulen, L., and Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11):1350–1356.
- Guyot D'Asnières De Salins, A., Tachon, G., Cohen, R., Karayan-Tapon, L., Junca, A., Frouin, E., Godet, J., Evrard, C., Randrian, V., Duval, A., Svrcek, M., Lascols, O., Vignot, S., Coulet, F., André, T., Fléjou, J.-F., Cervera, P., and

- Tougeron, D. a. (2021). Discordance between immunochemistry of mismatch repair proteins and molecular testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *ESMO open*, 6(3):100120.
- Hamelin, R., Chalastanis, A., Colas, C., El Bchiri, J., Mercier, D., Schreurs, A.-S., Simon, V., Svrcek, M., Zaanani, A., Borie, C., Buhard, O., Capel, E., Zouali, H., Praz, F., Muleris, M., Fléjou, J.-F., and Duval, A. (2008). [Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers]. *Bulletin Du Cancer*, 95(1):121–132.
- Hampel, H., Frankel, W. L., Martin, E., Arnold, M., Khanduja, K., Kuebler, P., Nakagawa, H., Sotamaa, K., Prior, T. W., Westman, J., Panescu, J., Fix, D., Lockman, J., Comeras, I., and de la Chapelle, A. (2005). Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *The New England Journal of Medicine*, 352(18):1851–1860.
- Han, X., Zhang, S., Zhou, D. C., Wang, D., He, X., Yuan, D., Li, R., He, J., Duan, X., Wendl, M. C., Ding, L., and Niu, B. (2021). MSI sensor-ct: microsatellite instability detection using cfDNA sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, page bbaa402.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. a. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5):646–674. Publisher: Elsevier.
- Hause, R. J., Pritchard, C. C., Shendure, J., and Salipante, S. J. (2016). Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nature Medicine*, 22(11):1342–1350.
- Henry, R. A. and Kendall, P. L. (2010). CXCL13 blockade disrupts B lymphocyte organization in tertiary lymphoid structures without altering B cell receptor bias or preventing diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(3):1460–1465.
- Hoffmann, M. M. and Slansky, J. E. (2020). T-cell receptor affinity in the age of cancer immunotherapy. *Molecular Carcinogenesis*, 59(7):862–870.
- Hollebecque, A., Hyun C. Chung, Maria J. de Miguel, A. I. J.-P. M. C.-C. L. N. C. D. M. P. V. M. W.-C. S. K. H. C. V. R. G. M. C. D. Y. A. M. S. Y. Z. S. L. S. L. G. X. X., and Bang, Y.-J. (2021). Safety and antitumor activity of -pd-11 antibody as monotherapy or in combination with -tim-3 antibody in patients with microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res.*

- Hombauer, H., Campbell, C. S., Smith, C. E., Desai, A., and Kolodner, R. D. (2011). Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates. *Cell*, 147(5):1040–1053.
- Hsieh, P. and Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8):391–407.
- Hugo, H., Cures, A., Suraweera, N., Drabsch, Y., Purcell, D., Mantamadiotis, T., Phillips, W., Dobrovic, A., Zupi, G., Gonda, T. J., Iacopetta, B., and Ramsay, R. G. (2006). Mutations in the MYB intron I regulatory sequence increase transcription in colon cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45(12):1143–1154.
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363(6429):558–561.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19):12293–12297.
- Jhunjhunwala, S., Hammer, C., and Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nature Reviews. Cancer*, 21(5):298–312.
- Jia, P., Yang, X., Guo, L., Liu, B., Lin, J., Liang, H., Sun, J., Zhang, C., and Ye, K. (2020). MSIsensor-pro: Fast, Accurate, and Matched-normal-sample-free Detection of Microsatellite Instability. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 18(1):65–71.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(5):335–346.
- Jiricny, J. (2013). Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4):a012633.
- Jonchere, V., Marisa, L., Greene, M., Virouleau, A., Buhard, O., Bertrand, R., Svrcek, M., Cervera, P., Goloudina, A., Guillerme, E., Coulet, F., Landman, S., Ratovomanana, T., Job, S., Ayadi, M., Elarouci, N., Armenoult, L., Merabtene, F., Dumont, S., Parc, Y., Lefèvre, J. H., André, T., Fléjou, J.-F., Guilloux, A., Collura, A., de Reyniès, A., and Duval, A. (2018). Identification of Positively and Negatively Selected Driver Gene Mutations Associated With Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 6(3):277–300.

- Juneja, V. R., McGuire, K. A., Manguso, R. T., LaFleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(4):895–904.
- Jung, B., Staudacher, J. J., and Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 152(1):36–52.
- Kautto, E. A., Bonneville, R., Miya, J., Yu, L., Krook, M. A., Reeser, J. W., and Roychowdhury, S. a. (2016). Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS. *Oncotarget*, 8(5):7452–7463.
- Kim, T.-M., Laird, P. W., and Park, P. J. (2013). The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*, 155(4):858–868.
- Kloor, M., Becker, C., Benner, A., Woerner, S. M., Gebert, J., Ferrone, S., and von Knebel Doeberitz, M. (2005). Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Research*, 65(14):6418–6424.
- Kloor, M., Huth, C., Voigt, A. Y., Benner, A., Schirmacher, P., von Knebel Doeberitz, M., and Bläker, H. (2012). Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study. *The Lancet. Oncology*, 13(6):598–606.
- Kloor, M., Michel, S., Buckowitz, B., Rüschoff, J., Büttner, R., Holinski-Feder, E., Dippold, W., Wagner, R., Tariverdian, M., Benner, A., Schwitalle, Y., Kuchenbuch, B., and von Knebel Doeberitz, M. (2007). Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 121(2):454–458.
- Kloor, M., Michel, S., and von Knebel Doeberitz, M. a. (2010). Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *International Journal of Cancer*, 127(5):1001–1010.
- Kloor, M. and von Knebel Doeberitz, M. (2016). The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. *Trends in Cancer*, 2(3):121–133.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4):820–823.



- Kondelin, J., Alexandra, E. G., Lundgren, S., al, and Pitkänen, E. (2017). Comprehensive evaluation of protein coding mononucleotide microsatellites in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Nature*.
- Kunkel, T. A. and Erie, D. A. a. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annual Review of Genetics*, 49:291–313.
- Kwapisz, D. (2017). The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Annals of Translational Medicine*, 5(3):46.
- Lahue, R. S., Au, K. G., and Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4914):160–164.
- Lal, N., Beggs, A. D., Willcox, B. E., and Middleton, G. W. (2015). An immunogenomic stratification of colorectal cancer: Implications for development of targeted immunotherapy. *Oncoimmunology*, 4(3):e976052.
- Latham Schwark, A., Srinivasan, P., Kemel, Y., Shia, J., Bandlamudi, C., Mandelker, D., Dubard-Gault, M., Tran, C., Middha, S., Hechtman, J. F., Penson, A., Varghese, A. M., Zhang, L., Robson, M. E., Solit, D. B., Diaz, L. A., Taylor, B. S., Offit, K., Berger, M. F., and Stadler, Z. K. (2018). Pan-cancer microsatellite instability to predict for presence of Lynch syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 36(18\_suppl):LBA1509–LBA1509. Publisher: Wolters Kluwer.
- Lauritzen, G. F., Hofgaard, P. O., Schenck, K., and Bogen, B. (1998). Clonal deletion of thymocytes as a tumor escape mechanism. *International Journal of Cancer*, 78(2):216–222.
- Lavoine, N., Colas, C., Muleris, M., Bodo, S., Duval, A., Entz-Werle, N., Coulet, F., Cabaret, O., Andreiuolo, F., Charpy, C., Sebille, G., Wang, Q., Lejeune, S., Buisine, M. P., Leroux, D., Couillault, G., Leverger, G., Fricker, J. P., Guimbaud, R., Mathieu-Dramard, M., Jedraszak, G., Cohen-Hagenauer, O., Guerrini-Rousseau, L., Bourdeaut, F., Grill, J., Caron, O., Baert-Dusermont, S., Tinat, J., Bougeard, G., Frébourg, T., and Brugières, L. (2015). Constitutional mismatch repair deficiency syndrome: clinical description in a French cohort. *Journal of Medical Genetics*, 52(11):770–778.
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubner, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Greten, T. F., Duffy, A. G., Ciombor, K. K., Eyring, A. D., Lam, B. H., Joe, A., Kang, S. P., Holdhoff, M., Danilova, L., Cope, L., Meyer, C., Zhou, S., Goldberg, R. M., Armstrong, D. K., Bever, K. M., Fader, A. N., Taube, J.,

- Housseau, F., Spetzler, D., Xiao, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., Anders, R. A., and Diaz, L. A. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349):409–413.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B., Kemberling, H., Eyring, A., Azad, N. S., Laheru, D., Donehower, R. C., Crocenzi, T. S., Goldberg, R. M., Fisher, G. A., Lee, J. J., Greten, T. F., Koshiji, M., Kang, S. P., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., and Diaz, L. A. (2016). Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(15\_suppl):103–103. Publisher: Wolters Kluwer.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhaijee, F., Huebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., and Diaz, L. A. a. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26):2509–2520.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5256):1734–1736.
- Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., and Nyström-Lahti, M. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 75(6):1215–1225.
- Lee, H., Park, C., Na, W., Park, K. H., and Shin, S. (2020). Precision cell-free DNA extraction for liquid biopsy by integrated microfluidics. *NPJ Precision Oncology*, 4:3.
- Lee, J. J. and Chu, E. (2018). Recent Advances in the Clinical Development of Immune Checkpoint Blockade Therapy for Mismatch Repair Proficient (pMMR)/non-MSI-H Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 17(4):258–273.
- Lee, S.-K., Seo, S.-H., Kim, B.-S., Kim, C.-D., Lee, J.-H., Kang, J.-S., Maeng, P. J., and Lim, J.-S. (2005). IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells. *Journal of Dermatological Science*, 40(2):95–103.

- Lenz, H.-J., Lonardi, S., Zagonel, V., Van Cutsem, E., Limon, M. L., Wong, M., Hendlisz, A., Aglietta, M., Garcia-Alfonso, P., Neyns, B., Gelsomino, F., Cardin, D. B., Dragovich, T., Shah, U., Yang, J., Ledezine, J.-M., and Overman, M. J. (2020). Nivolumab (NIVO) + low-dose ipilimumab (IPI) as first-line (1L) therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): Two-year clinical update. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15\_suppl):4040–4040. Publisher: Wolters Kluwer.
- Lenz, H.-J. J., Cutsem, E. V., Limon, M. L., Wong, K. Y., Hendlisz, A., Aglietta, M., Garcia-Alfonso, P., Neyns, B., Luppi, G., Cardin, D., Dragovich, T., Shah, U., Atasoy, A., Postema, R., Boyd, Z., Ledezine, J.-M., Overman, M., and Lonardi, S. (2018). Durable clinical benefit with nivolumab (NIVO) plus low-dose ipilimumab (IPI) as first-line therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Annals of Oncology*, 29:viii714. Publisher: Elsevier.
- Lewandowska, M. A. (2013). The missing puzzle piece: splicing mutations. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(12):2675–2682.
- Li, S. K. H. and Martin, A. a. (2016). Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends in Molecular Medicine*, 22(4):274–289.
- Lindor, N. M., Burgart, L. J., Leontovich, O., Goldberg, R. M., Cunningham, J. M., Sargent, D. J., Walsh-Vockley, C., Petersen, G. M., Walsh, M. D., Leggett, B. A., Young, J. P., Barker, M. A., Jass, J. R., Hopper, J., Gallinger, S., Bapat, B., Redston, M., and Thibodeau, S. N. (2002). Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(4):1043–1048.
- Linnebacher, M., Gebert, J., Rudy, W., Woerner, S., Yuan, Y. P., Bork, P., and von Knebel Doeberitz, M. (2001). Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *International Journal of Cancer*, 93(1):6–11.
- Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., Blosser, R. L., Fan, H., Wang, H., Lubner, B. S., Zhang, M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Sears, C. L., Anders, R. A., Pardoll, D. M., and Housseau, F. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.*
- Loke, P. and Allison, J. P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by

- Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5336–5341.
- Lothe, R. A., Peltomäki, P., Meling, G. I., Aaltonen, L. A., Nyström-Lahti, M., Pylkkänen, L., Heimdal, K., Andersen, T. I., Møller, P., and Rognum, T. O. (1993). Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Research*, 53(24):5849–5852.
- Luchini, C., Bibeau, F., Ligtenberg, M. J. L., Singh, N., Nottegar, A., Bosse, T., Miller, R., Riaz, N., Douillard, J.-Y., Andre, F., and Scarpa, A. (2019). ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(8):1232–1243.
- Lujan, S. A., Williams, J. S., Pursell, Z. F., Abdulovic-Cui, A. A., Clark, A. B., Nick McElhinny, S. A., and Kunkel, T. A. (2012). Mismatch Repair Balances Leading and Lagging Strand DNA Replication Fidelity. *PLoS Genetics*, 8(10):e1003016.
- Luo, J., Shen, L., and Zheng, D. (2014). Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 4:6269.
- Maby, P., Tougeron, D., Hamieh, M., Mlecnik, B., Kora, H., Bindea, G., Angell, H. K., Fredriksen, T., Elie, N., Fauquembergue, E., Drouet, A., Leprince, J., Benichou, J., Mauillon, J., Le Pessot, F., Sesboüé, R., Tuech, J.-J., Sabourin, J.-C., Michel, P., Frébourg, T., Galon, J., and Latouche, J.-B. (2015). Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Research*, 75(17):3446–3455.
- Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H., and Perucho, M. (1996). Frameshift mutator mutations. *Nature*, 382(6591):499–500.
- Mandal, R., Samstein, R. M., Lee, K.-W., Havel, J. J., Wang, H., Krishna, C., Sabio, E. Y., Makarov, V., Kuo, F., Blecua, P., Ramaswamy, A. T., Durham, J. N., Bartlett, B., Ma, X., Srivastava, R., Middha, S., Zehir, A., Hechtman, J. F., Morris, L. G., Weinhold, N., Riaz, N., Le, D. T., Diaz, L. A., and Chan, T. A. (2019). Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6439):485–491.

- Marcucci, F., Rumio, C., and Corti, A. (2017). Tumor cell-associated immune checkpoint molecules - Drivers of malignancy and stemness. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1868(2):571–583.
- Marcus, L., Lemery, S. J., Keegan, P., and Pazdur, R. (2019). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(13):3753–3758.
- Marisa, L., Svrcek, M., Collura, A., Becht, E., Cervera, P., Wanherdrick, K., Buhard, O., Goloudina, A., Jonchère, V., Selves, J., Milano, G., Guenet, D., Cohen, R., Colas, C., Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Lefèvre, J. H., Parc, Y., Boige, V., Lepage, C., André, T., Fléjou, J.-F., Dérangère, V., Ghiringhelli, F., de Reynies, A., and Duval, A. (2018). The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 110(1).
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5215):1336–1338.
- Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.-L., Luke, J. J., and Gajewski, T. F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6371):104–108.
- Mazurek, A., Johnson, C. N., Germann, M. W., and Fishel, R. (2009). Sequence context effect for hMSH2-hMSH6 mismatch-dependent activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11):4177–4182.
- McWilliams, E. M., Mele, J. M., Cheney, C., Timmerman, E. A., Fiazuddin, F., Strattan, E. J., Mo, X., Byrd, J. C., Muthusamy, N., and Awan, F. T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*, 5(10):e1226720.
- Michel, S., Linnebacher, M., Alcaniz, J., Voss, M., Wagner, R., Dippold, W., Becker, C., von Knebel Doeberitz, M., Ferrone, S., and Kloor, M. (2010). Lack of HLA class II antigen expression in microsatellite unstable colorectal carcinomas is caused by mutations in HLA class II regulatory genes. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(4):889–898.

- Middha, S., Yaeger, R., Shia, J., Stadler, Z. K., King, S., Guercio, S., Paroder, V., Bates, D. D. B., Rana, S., Diaz, L. A., Saltz, L., Segal, N., Ladanyi, M., Zehir, A., and Hechtman, J. F. (2019). Majority of B2M-Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High. *JCO precision oncology*, 3.
- Middha, S., Zhang, L., Nafa, K., Jayakumaran, G., Wong, D., Kim, H. R., Sadowska, J., Berger, M. F., Delair, D. F., Shia, J., Stadler, Z., Klimstra, D. S., Ladanyi, M., Zehir, A., and Hechtman, J. F. (2017). Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precision Oncology*, 1:PO.17.00084.
- Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S. E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., Sasso, M., Bilocq, A. M., Kirilovsky, A., Obenauf, A. C., Hamieh, M., Berger, A., Bruneval, P., Tuech, J.-J., Sabourin, J.-C., Le Pessot, F., Mauillon, J., Raffi, A., Laurent-Puig, P., Speicher, M. R., Trajanoski, Z., Michel, P., Sesboüe, R., Frebourg, T., Pagès, F., Valge-Archer, V., Latouche, J.-B., and Galon, J. (2016). Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*, 44(3):698–711.
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annual Review of Genetics*, 25:229–253.
- Mojtahed, A., Schrijver, I., Ford, J. M., Longacre, T. A., and Pai, R. K. (2011). A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(7):1004–1014.
- Moreira, L., Balaguer, F., Lindor, N., de la Chapelle, A., Hampel, H., Aaltonen, L. A., Hopper, J. L., Le Marchand, L., Gallinger, S., Newcomb, P. A., Haile, R., Thibodeau, S. N., Gunawardena, S., Jenkins, M. A., Buchanan, D. D., Potter, J. D., Baron, J. A., Ahnen, D. J., Moreno, V., Andreu, M., Ponz de Leon, M., Rustgi, A. K., Castells, A., and EPICOLON Consortium (2012). Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*, 308(15):1555–1565.
- Moss, E. L., Gorsia, D. N., Collins, A., Sandhu, P., Foreman, N., Gore, A., Wood, J., Kent, C., Silcock, L., and Guttery, D. S. (2020). Utility of Circulating Tumor DNA for Detection and Monitoring of Endometrial Cancer Recurrence and Progression. *Cancers*, 12(8):E2231.

- Nakata, B., Wang, Y. Q., Yashiro, M., Nishioka, N., Tanaka, H., Ohira, M., Ishikawa, T., Nishino, H., and Hirakawa, K. (2002). Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(8):2536–2540.
- Nebot-Bral, L., Brandao, D., Verlingue, L., Rouleau, E., Caron, O., Despras, E., El-Dakdouki, Y., Champiat, S., Aoufouchi, S., Leary, A., Marabelle, A., Malka, D., Chaput, N., and Kannouche, P. L. (2017). Hypermutated tumours in the era of immunotherapy: The paradigm of personalised medicine. *Eur J Cancer*.
- Ngiow, S. F., von Scheidt, B., Akiba, H., Yagita, H., Teng, M. W. L., and Smyth, M. J. (2011). Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN--mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Research*, 71(10):3540–3551.
- Ngiow, S. F., Young, A., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Enot, D., Zitvogel, L., and Smyth, M. J. (2015). A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Research*, 75(18):3800–3811.
- Nirschl, C. J. and Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(18):4917–4924.
- Niu, B., Ye, K., Zhang, Q., Lu, C., Xie, M., McLellan, M. D., Wendl, M. C., and Ding, L. (2014). MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(7):1015–1016.
- Nordling, C. O. (1953). A new theory on cancer-inducing mechanism. *British Journal of Cancer*, 7(1):68–72.
- Oliveira, C., Westra, J. L., Arango, D., Ollikainen, M., Domingo, E., Ferreira, A., Velho, S., Niessen, R., Lagerstedt, K., Alhopuro, P., Laiho, P., Veiga, I., Teixeira, M. R., Ligtenberg, M., Kleibeuker, J. H., Sijmons, R. H., Plukker, J. T., Imai, K., Lage, P., Hamelin, R., Albuquerque, C., Schwartz, S., Lindblom, A., Peltomaki, P., Yamamoto, H., Aaltonen, L. A., Seruca, R., and Hofstra, R. M. W. (2004). Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Human Molecular Genetics*, 13(19):2303–2311.
- Overbeek, L. I. H., Ligtenberg, M. J. L., Willems, R. W., Hermens, R. P. M. G., Blokx, W. A. M., Dubois, S. V., van der Linden, H., Meijer, J. W. R., Mlynek-Kersjes, M. L., Hoogerbrugge, N., Hebeda, K. M., and van Krieken, J. H. J. M. a.

- (2008). Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *The American Journal of Surgical Pathology*, 32(8):1246–1251.
- Overman, M. J., Lonardi, S., Wong, K. Y. M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M. A., Van Cutsem, E., McDermott, R., Hill, A., Sawyer, M. B., Hendlisz, A., Neyns, B., Svrcek, M., Moss, R. A., Ledezine, J.-M., Cao, Z. A., Kamble, S., Kopetz, S., and André, T. (2018). Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(8):773–779.
- Overman, M. J., McDermott, R., Leach, J. L., Lonardi, S., Lenz, H.-J., Morse, M. A., Desai, J., Hill, A., Axelson, M., Moss, R. A., Goldberg, M. V., Cao, Z. A., Ledezine, J.-M., Maglente, G. A., Kopetz, S., and André, T. (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 18(9):1182–1191.
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., and Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(25):2654–2666.
- Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T. T., Berger, M. D., Nagtegaal, I. D., Vink-Börger, E., Hartmann, A., Geppert, C., Kolwelter, J., Merkel, S., Grützmann, R., Van den Eynde, M., Jouret-Mourin, A., Kartheuser, A., Léonard, D., Remue, C., Wang, J. Y., Bavi, P., Roehrl, M. H. A., Ohashi, P. S., Nguyen, L. T., Han, S., MacGregor, H. L., Hafezi-Bakhtiari, S., Wouters, B. G., Masucci, G. V., Andersson, E. K., Zavadova, E., Vocka, M., Spacek, J., Petruzelka, L., Konopasek, B., Dundr, P., Skalova, H., Nemejcova, K., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Ciliberto, G., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., Fredriksen, T., Buttard, B., Angelova, M., Vasaturo, A., Maby, P., Church, S. E., Angell, H. K., Lafontaine, L., Bruni, D., El Sissy, C., Haicheur, N., Kirilovsky, A., Berger, A., Lagorce, C., Meyers, J. P., Paustian, C., Feng, Z., Ballesteros-Merino, C., Dijkstra, J., van de Water, C., van Lent-van Vliet, S., Knijn, N., Muin, A.-M., Scripcariu, D.-V., Popivanova, B., Xu, M., Fujita, T., Hazama, S., Suzuki, N., Nagano, H., Okuno, K., Torigoe, T., Sato, N., Furuhashi, T., Takemasa, I., Itoh, K., Patel, P. S., Vora, H. H., Shah, B., Patel, J. B., Rajvik, K. N., Pandya, S. J., Shukla, S. N., Wang, Y., Zhang, G.,



- Kawakami, Y., Marincola, F. M., Ascierto, P. A., Sargent, D. J., Fox, B. A., and Galon, J. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet (London, England)*, 391(10135):2128–2139.
- Pai, R. K. and Pai, R. K. (2016). A Practical Approach to the Evaluation of Gastrointestinal Tract Carcinomas for Lynch Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 40(4):e17–34.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4):252–264.
- Parsons, M. T., Buchanan, D. D., Thompson, B., Young, J. P., and Spurdle, A. B. (2012). Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *Journal of Medical Genetics*, 49(3):151–157.
- Pavlov, Y. I., Mian, I. M., and Kunkel, T. A. (2003). Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast. *Current biology: CB*, 13(9):744–748.
- Peltomäki, P. (2016). Update on Lynch syndrome genomics. *Familial Cancer*, 15(3):385–393.
- Peltomäki, P. and Vasen, H. (2004). Mutations associated with HNPCC predisposition – Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Disease Markers*, 20(4-5):269–276.
- Perakis, S., Auer, M., Belic, J., and Heitzer, E. (2017). Advances in Circulating Tumor DNA Analysis. *Advances in Clinical Chemistry*, 80:73–153.
- Perucho, M. (1996). Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biological Chemistry*, 377(11):675–684.
- Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E. Z., Chen, T. W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougouïn, A., Moreira, M., Lacroix, G., Natario, I., Adam, J., Lucchesi, C., Laizet, Y. H., Toulmonde, M., Burgess, M. A., Bolejack, V., Reinke, D., Wani, K. M., Wang, W.-L., Lazar, A. J., Roland, C. L., Wargo, J. A., Italiano, A., Sautès-Fridman, C., Tawbi, H. A., and Fridman, W. H. (2020). B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*, 577(7791):556–560.

- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A., and Rosenberg, S. A. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14):8372–8377.
- Phillips, S. M., Banerjea, A., Feakins, R., Li, S. R., Bustin, S. A., and Dorudi, S. (2004). Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *The British Journal of Surgery*, 91(4):469–475.
- Pinato, D. J., Howlett, S., Ottaviani, D., Urus, H., Patel, A., Mineo, T., Brock, C., Power, D., Hatcher, O., Falconer, A., Ingle, M., Brown, A., Gujral, D., Partridge, S., Sarwar, N., Gonzalez, M., Bendle, M., Lewanski, C., Newsom-Davis, T., Al-lara, E., and Bower, M. (2019). Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer. *JAMA oncology*, 5(12):1774–1778.
- Pino, M. S. and Chung, D. C. (2011). Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 5(3):385–399.
- Pires da Silva, I., Lo, S., Quek, C., Gonzalez, M., Carlino, M. S., Long, G. V., and Menzies, A. M. a. (2020). Site-specific response patterns, pseudoprogression, and acquired resistance in patients with melanoma treated with ipilimumab combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer*, 126(1):86–97.
- Pluciennik, A., Dzantiev, L., Iyer, R. R., Constantin, N., Kadyrov, F. A., and Modrich, P. (2010). PCNA function in the activation and strand direction of MutL endonuclease in mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37):16066–16071. Publisher: National Academy of Sciences Section: Biological Sciences.
- Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R. S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(3):609–618.
- Posch, F., Silina, K., Leibl, S., Mündlein, A., Moch, H., Siebenhüner, A., Samaras, P., Riedl, J., Stotz, M., Szkandera, J., Stöger, H., Pichler, M., Stupp, R., van den Broek, M., Schraml, P., Gerger, A., Petrausch, U., and Winder, T. (2018). Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 7(2):e1378844.

- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302):967–969.
- Rapisuwon, S., Vietsch, E. E., and Wellstein, A. (2016). Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14:211–222.
- Ratovomanana, T., Cohen, R., Svrcek, M., Renaud, F., Cervera, P., Siret, A., Letourneur, Q., Buhard, O., Bourgoin, P., Guillermin, E., Dorard, C., Nicolle, R., Ayadi, M., Touat, M., Bielle, F., Sanson, M., Le Rouzic, P., Buisine, M.-P., Piessen, G., Collura, A., Fléjou, J.-F., de Reyniès, A., Coulet, F., Ghiringhelli, F., André, T., Jonchère, V., and Duval, A. (2021). Performance of Next-Generation Sequencing for the Detection of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer With Deficient DNA Mismatch Repair. *Gastroenterology*, 161(3):814–826.e7.
- Reyes, G. X., Schmidt, T. T., Kolodner, R. D., and Hombauer, H. (2015). New insights into the mechanism of dna mismatch repair. *Chromosoma*.
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., and Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(23):1758–1762.
- Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G., and Hacohen, N. (2015). Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*, 160(1-2):48–61.
- Rousseau, B., Foote, M. B., Maron, S. B., Diplas, B. H., Lu, S., Argilés, G., Cercek, A., and Diaz, L. A. (2021). The Spectrum of Benefit from Checkpoint Blockade in Hypermutated Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 384(12):1168–1170.
- Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D. M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 131(1):58–67.
- Sade-Feldman, M., Jiao, Y. J., Chen, J. H., Rooney, M. S., Barzily-Rokni, M., Eliane, J.-P., Bjorgaard, S. L., Hammond, M. R., Vitzthum, H., Blackmon, S. M., Frederick, D. T., Hazar-Rethinam, M., Nadres, B. A., Van Seventer, E. E., Shukla, S. A., Yizhak, K., Ray, J. P., Rosebrock, D., Livitz, D., Adalsteinsson, V., Getz, G., Duncan, L. M., Li, B., Corcoran, R. B., Lawrence, D. P., Stemmer-Rachamimov, A., Boland, G. M., Landau, D. A.,

- Flaherty, K. T., Sullivan, R. J., and Hacoheh, N. (2017). Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nature Communications*, 8(1):1–11. Bandiera\_abtest: a Cc\_license\_type: cc\_by Cg\_type: Nature Research Journals Number: 1 Primary\_atype: Research Publisher: Nature Publishing Group Subject\_term: Cancer genetics;Cancer immunotherapy;Cancer therapeutic resistance;Melanoma Subject\_term\_id: cancer-genetics;cancer-immunotherapy;cancer-therapeutic-resistance;melanoma.
- Saeterdal, I., Bjørheim, J., Lislrud, K., Gjertsen, M. K., Bukholm, I. K., Olsen, O. C., Nesland, J. M., Eriksen, J. A., Møller, M., Lindblom, A., and Gaudernack, G. (2001). Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23):13255–13260.
- Sahai, E., Astsaturrov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., Ramirez, D. C., Scherz-Shouval, R., Sherman, M. H., Stewart, S., Tlsty, T. D., Tuveson, D. A., Watt, F. M., Weaver, V., Weeraratna, A. T., and Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Cancer*, 20(3):174–186.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., and Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(10):2187–2194.
- Salipante, S. J., Scroggins, S. M., Hampel, H. L., Turner, E. H., and Pritchard, C. C. (2014). Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clinical Chemistry*, 60(9):1192–1199.
- Sammalkorpi, H., Alhopuro, P., Lehtonen, R., Tuimala, J., Mecklin, J.-P., Järvinen, H. J., Jiricny, J., Karhu, A., and Aaltonen, L. A. (2007). Background mutation frequency in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Research*, 67(12):5691–5698.
- Sargent, D. J., Marsoni, S., Monges, G., Thibodeau, S. N., Labianca, R., Hamilton, S. R., French, A. J., Kabat, B., Foster, N. R., Torri, V., Ribic, C., Grothey, A., Moore, M., Zaniboni, A., Seitz, J.-F., Sinicrope, F., and Gallinger, S. (2010). Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20):3219–3226.

- Schrock, A. B., Ouyang, C., Sandhu, J., Sokol, E., Jin, D., Ross, J. S., Miller, V. A., Lim, D., Amanam, I., Chao, J., Catenacci, D., Cho, M., Braiteh, F., Klempner, S. J., Ali, S. M., and Fakih, M. (2019). Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(7):1096–1103.
- Senter, L., Clendenning, M., Sotamaa, K., Hampel, H., Green, J., Potter, J. D., Lindblom, A., Lagerstedt, K., Thibodeau, S. N., Lindor, N. M., Young, J., Winship, I., Dowty, J. G., White, D. M., Hopper, J. L., Baglietto, L., Jenkins, M. A., and de la Chapelle, A. (2008). The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology*, 135(2):419–428.
- Shia, J. (2008). Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 10(4):293–300.
- Shia, J., Holck, S., Depetris, G., Greenson, J. K., and Klimstra, D. S. (2013). Lynch syndrome-associated neoplasms: a discussion on histopathology and immunohistochemistry. *Familial Cancer*, 12(2):241–260.
- Silia, K., Soltermann, A., Attar, F. M., Casanova, R., Uckeley, Z. M., Thut, H., Wandres, M., Isajevs, S., Cheng, P., Curioni-Fontecedro, A., Foukas, P., Levesque, M. P., Moch, H., Lin, A., and van den Broek, M. (2018). Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 78(5):1308–1320.
- Silveira, A. B., Bidard, F.-C., Kasperek, A., Melaabi, S., Tanguy, M.-L., Rodrigues, M., Bataillon, G., Cabel, L., Buecher, B., Pierga, J.-Y., Proudhon, C., and Stern, M.-H. (2020). High-Accuracy Determination of Microsatellite Instability Compatible with Liquid Biopsies. *Clinical Chemistry*, 66(4):606–613.
- Sinicrope, F. A., Foster, N. R., Thibodeau, S. N., Marsoni, S., Monges, G., Labianca, R., Kim, G. P., Yothers, G., Allegra, C., Moore, M. J., Gallinger, S., and Sargent, D. J. (2011). DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(11):863–875.
- Sinicrope, F. A., Smyrk, T. C., Foster, N. R., Meyers, J. P., Thibodeau, S. N., Goldberg, R. M., Shi, Q., Sargent, D. J., and Alberts, S. R. (2016). Association of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) with molecular subtype and prognosis

- in stage III colon cancers (CC) from a FOLFOX-based adjuvant chemotherapy trial. *Journal of Clinical Oncology*, 34(15\_suppl):3518–3518. Publisher: Wolters Kluwer.
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., and Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(9):531–548.
- Siravegna, G., Mussolin, B., Venesio, T., Marsoni, S., Seoane, J., Dive, C., Papadopoulos, N., Kopetz, S., Corcoran, R. B., Siu, L. L., and Bardelli, A. (2019). How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(10):1580–1590.
- Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J. B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z. M., Benyamin, F. W., Lei, Y. M., Jabri, B., Alegre, M.-L., Chang, E. B., and Gajewski, T. F. (2015). Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6264):1084–1089.
- Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Payer, . R., Gonzalez, S., and López-Soto, A. (2020). Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10):E3726.
- St Charles, J. A., Liberti, S. E., Williams, J. S., Lujan, S. A., and Kunkel, T. A. (2015). Quantifying the contributions of base selectivity, proofreading and mismatch repair to nuclear DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair*, 31:41–51.
- Surmann, E.-M., Voigt, A. Y., Michel, S., Bauer, K., Reuschenbach, M., Ferrone, S., von Knebel Doeberitz, M., and Kloor, M. (2015). Association of high CD4-positive T cell infiltration with mutations in HLA class II-regulatory genes in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 64(3):357–366.
- Suzuki, H., Chikazawa, N., Tasaka, T., Wada, J., Yamasaki, A., Kitaura, Y., Sozaki, M., Tanaka, M., Onishi, H., Morisaki, T., and Katano, M. (2010). Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 59(5):653–661.
- Svrcek, M., Lascols, O., Cohen, R., Collura, A., Jonchère, V., Fléjou, J.-F., Buhard, O., and Duval, A. a. (2019). MSI/MMR-deficient tumor diagnosis: Which standard for screening and for diagnosis? Diagnostic modalities for the colon and other sites: Differences between tumors. *Bulletin Du Cancer*, 106(2):119–128.

- Swart, M., Verbrugge, I., and Beltman, J. B. (2016). Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 6:233.
- Syngal, S., Brand, R. E., Church, J. M., Giardiello, F. M., Hampel, H. L., Burt, R. W., and American College of Gastroenterology (2015). ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(2):223–262; quiz 263.
- Tauriello, D. V. F., Palomo-Ponce, S., Stork, D., Berenguer-Llargo, A., Badiarmentol, J., Iglesias, M., Sevillano, M., Ibiza, S., Cañellas, A., Hernando-Momblona, X., Byrom, D., Matarin, J. A., Calon, A., Rivas, E. I., Nebreda, A. R., Riera, A., Attolini, C. S.-O., and Batlle, E. (2018). TGF drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, 554(7693):538–543.
- Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A., and Smyth, M. J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, 75(11):2139–2145.
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., Prévost-Blondel, A., Kato, M., Schultze, J. L., Tartour, E., Kroemer, G., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Research*, 71(16):5393–5399.
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J. L., Guimbaud, R., Pezet, D., Artru, P., Assenat, E., Borg, C., Mathonnet, M., De La Fouchardière, C., Bouché, O., Gavaille, C., Fiess, C., Auzemery, B., Meddeb, R., Lopez-Crapez, E., Sanchez, C., Pastor, B., and Ychou, M. (2017). Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(9):2149–2159.
- Thompson, R., Zoppis, S., and McCord, B. (2012). An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 830:3–16.
- Thompson, R. H., Gillett, M. D., Chevillat, J. C., Lohse, C. M., Dong, H., Webster, W. S., Krejci, K. G., Lobo, J. R., Sengupta, S., Chen, L., Zincke, H., Blute, M. L., Strome, S. E., Leibovich, B. C., and Kwon, E. D. (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49):17174–17179.

- Tougeron, D., Maby, P., Elie, N., Fauquembergue, E., Le Pessot, F., Cornic, M., Sabourin, J.-C., Michel, P., Frébourg, T., and Latouche, J.-B. (2013). Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PloS One*, 8(4):e61001.
- Townsend, A., Ohlén, C., Rogers, M., Edwards, J., Mukherjee, S., and Bastin, J. (1994). Source of unique tumour antigens. *Nature*, 371(6499):662.
- Tran, B., Kopetz, S., Tie, J., Gibbs, P., Jiang, Z.-Q., Lieu, C. H., Agarwal, A., Maru, D. M., Sieber, O., and Desai, J. (2011). Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 117(20):4623–4632.
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J. A., Emerson, R. O., Robins, H., Pierce, R. H., Elashoff, D. A., Robert, C., and Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528):568–571.
- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, S. R., Hatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H. T., Peltomaki, P., Ramsey, S. D., Rodriguez-Bigas, M. A., Vasen, H. F. A., Hawk, E. T., Barrett, J. C., Freedman, A. N., and Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4):261–268.
- Urganci, N., Genc, D. B., Kose, G., Onal, Z., and Vidin, O. O. (2015). Colorectal Cancer due to Constitutional Mismatch Repair Deficiency Mimicking Neurofibromatosis I. *Pediatrics*, 136(4):e1047–1050.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D’Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J.-Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., Heinemann, V., Hoff, P., Köhne, C.-H., Labianca, R., Laurent-Puig, P., Ma, B., Maughan, T., Muro, K., Normanno, N., Österlund, P., Oyen, W. J. G., Papamichael, D., Pentheroudakis, G., Pfeiffer, P., Price, T. J., Punt, C., Rieke, J., Roth, A., Salazar, R., Scheithauer, W., Schmoll, H. J., Tabernero, J., Taïeb, J., Tejpar, S., Wasan, H., Yoshino, T., Zaanani, A., and Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients



- with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(8):1386–1422.
- Vasen, H. F. A., Ghorbanoghli, Z., Bourdeaut, F., Cabaret, O., Caron, O., Duval, A., Entz-Werle, N., Goldberg, Y., Ilencikova, D., Kratz, C. P., Lavoine, N., Loeffen, J., Menko, F. H., Muleris, M., Sebille, G., Colas, C., Burkhardt, B., Brugieres, L., Wimmer, K., and EU-Consortium Care for CMMR-D (C4CMMR-D) (2014). Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium "Care for CMMR-D" (C4CMMR-D). *Journal of Medical Genetics*, 51(5):283–293.
- Venderbosch, S., Nagtegaal, I. D., Maughan, T. S., Smith, C. G., Cheadle, J. P., Fisher, D., Kaplan, R., Quirke, P., Seymour, M. T., Richman, S. D., Meijer, G. A., Ylstra, B., Heideman, D. A. M., de Haan, A. F. J., Punt, C. J. A., and Koopman, M. (2014). Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(20):5322–5330.
- von Knebel Doeberitz, M. and Kloor, M. (2013). Towards a vaccine to prevent cancer in Lynch syndrome patients. *Familial Cancer*, 12(2):307–312.
- Vuagnat, P. and Champiat, S. (2018). Immunothérapies anti-checkpoints: aspects fondamentaux. *MISE AU POINT*, page 6.
- Vétizou, M., Pitt, J. M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M. P., Duong, C. P. M., Poirier-Colame, V., Roux, A., Becharaf, S., Formenti, S., Golden, E., Cording, S., Eberl, G., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Mani, S., Yamazaki, T., Jacquelot, N., Enot, D. P., Bérard, M., Nigou, J., Opolon, P., Eggermont, A., Woerther, P.-L., Chachaty, E., Chaput, N., Robert, C., Mateus, C., Kroemer, G., Raoult, D., Boneca, I. G., Carbonnel, F., Chamaillard, M., and Zitvogel, L. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6264):1079–1084.
- Wang, C. and Liang, C. (2018). MSIpred: a python package for tumor microsatellite instability classification from tumor mutation annotation data using a support vector machine. *Scientific Reports*, 8(1):17546.
- Wang, Z., Zhao, X., Gao, C., Gong, J., Wang, X., Gao, J., Li, Z., Wang, J., Yang, B., Wang, L., Zhang, B., Zhou, Y., Wang, D., Li, X., Bai, Y., Li, J., and Shen, L. (2020). Plasma-based microsatellite instability detection strategy to guide

immune checkpoint blockade treatment. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2):e001297.

Willis, J., Lefterova, M. I., Artyomenko, A., Kasi, P. M., Nakamura, Y., Mody, K., Catenacci, D. V. T., Fakih, M., Barbacioru, C., Zhao, J., Sikora, M., Fairclough, S. R., Lee, H., Kim, K.-M., Kim, S. T., Kim, J., Gavino, D., Benavides, M., Peled, N., Nguyen, T., Cusnir, M., Eskander, R. N., Azzi, G., Yoshino, T., Banks, K. C., Raymond, V. M., Lanman, R. B., Chudova, D. I., Talasz, A., Kopetz, S., Lee, J., and Odegaard, J. I. (2019). Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(23):7035–7045.

Wimmer, K. and Kratz, C. P. (2010). Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome. *Haematologica*, 95(5):699–701.

Woerner, S. M., Gebert, J., Yuan, Y. P., Sutter, C., Ridder, R., Bork, P., and von Knebel Doeberitz, M. a. (2001). Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *International Journal of Cancer*, 93(1):12–19.

Woerner, S. M., Kloor, M., von Knebel Doeberitz, M., and Gebert, J. F. (2006). Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2(1-2):69–86.

Woerner, S. M., Yuan, Y. P., Benner, A., Korff, S., von Knebel Doeberitz, M., and Bork, P. (2010). SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue):D682–689.

Yearley, J. H., Gibson, C., Yu, N., Moon, C., Murphy, E., Juco, J., Lunceford, J., Cheng, J., Chow, L. Q. M., Seiwert, T. Y., Handa, M., Tomassini, J. E., and McClanahan, T. (2017). PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(12):3158–3167.

Yoon, H. H., Shi, Q., Heying, E. N., Muranyi, A., Bredno, J., Ough, F., Djalilvand, A., Clements, J., Bowermaster, R., Liu, W.-W., Barnes, M., Alberts, S. R., Shanmugam, K., and Sinicrope, F. A. (2019). Intertumoral Heterogeneity of CD3+ and CD8+ T-Cell Densities in the Microenvironment of DNA Mismatch-Repair-Deficient Colon Cancers: Implications for Prognosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(1):125–133.

- Yurgelun, M. B., Kulke, M. H., Fuchs, C. S., Allen, B. A., Uno, H., Hornick, J. L., Ukaegbu, C. I., Brais, L. K., McNamara, P. G., Mayer, R. J., Schrag, D., Meyerhardt, J. A., Ng, K., Kidd, J., Singh, N., Hartman, A.-R., Wenstrup, R. J., and Syngal, S. (2017). Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(10):1086–1095.
- Zaanan, A. and Taieb, J. (2019). Predictive and prognostic value of msi phenotype in adjuvant colon cancer: Who and how to treat? *Bull Cancer*.
- Zhang, Y., Yuan, F., Presnell, S. R., Tian, K., Gao, Y., Tomkinson, A. E., Gu, L., and Li, G.-M. (2005). Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell*, 122(5):693–705.
- Zhou, G., Noordam, L., Sprengers, D., Doukas, M., Boor, P. P. C., van Beek, A. A., Erkens, R., Mancham, S., Grünhagen, D., Menon, A. G., Lange, J. F., Burger, P. J. W. A., Brandt, A., Galjart, B., Verhoef, C., Kwekkeboom, J., and Bruno, M. J. (2018). Blockade of LAG3 enhances responses of tumor-infiltrating T cells in mismatch repair-proficient liver metastases of colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 7(7):e1448332.
- Zhu, L., Li, Z., Wang, Y., Zhang, C., Liu, Y., and Qu, X. (2015). Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(3):699–705.

