



HAL
open science

Caractérisation clinique et moléculaire des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN

Romain Cohen

► **To cite this version:**

Romain Cohen. Caractérisation clinique et moléculaire des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN . Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01583263

HAL Id: dumas-01583263

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01583263>

Submitted on 7 Sep 2017

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.

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016

N° 110

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINECaractérisation clinique et moléculaire des patients atteints
d'un cancer colorectal métastatique avec déficience
du système réparation des mésappariements
de l'ADNPrésentée et soutenue publiquement
le 14 octobre 2016

Par

Romain COHENNé le 1^{er} octobre 1986 à Fontenay-aux-Roses (92)

Dirigée par M. Le Professeur Thierry André, PU-PH

Jury :

M. Le Professeur Pierre Laurent-Puig, PU-PH Président

M. Le Docteur Alex Duval, DR1 INSERM

Mme Le Professeur Magali Svrcek, PU-PH

M. Le Professeur Christophe Tournigand, PU-PH

Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

REMERCIEMENTS

A monsieur le professeur Pierre Laurent-Puig, qui me fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. C'est avec beaucoup d'humilité que je sou mets mon travail à votre expertise.

A monsieur le professeur Thierry André, qui m'a dirigé dans cette thèse et me porte dans mon projet professionnel. Merci d'avoir été si disponible et de m'avoir aidé à aller plus loin dans mes réflexions. Merci de m'avoir offert de faire partie de ce beau projet.

A monsieur le docteur Alex Duval. Merci d'avoir avec moi cette attention très médicale dans l'adaptation de ton propos, tant sur le fond que sur la forme. Mon parcours scientifique n'en est qu'à ses débuts et j'espère pouvoir apprendre et avancer grâce à toi.

A madame le professeur Magali Svrcek, pour son investissement dans ce projet. Merci d'avoir pris le temps de m'apprendre les bases de l'anatomopathologie, et de répondre au pied levé à mes questions incessantes. J'ai encore beaucoup de choses à découvrir sous ta direction.

A monsieur le professeur Christophe Tournigand, d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Vous avez impressionné, par votre attention et votre humilité vis-à-vis des patients, le tout jeune interne que j'étais. C'est un honneur pour moi de vous présenter mon travail.

A tous ceux qui font vivre le projet sur le plan scientifique. Un grand merci au docteur Pascale Cervera pour son implication ainsi qu'à Elisabeth Hain, Olivier Buhard et Sylvie Dumont. Merci à toute l'équipe « instabilité des microsatellites et cancer » du Centre de Recherche Saint-Antoine.

A tous ceux qui ont participé à ce projet : Frédéric Bibeau, Florence Renaud, Armelle Bardier-Dupas, Philippe Bertheau, Fatiha Bouhidel, Rachid Kaci, Jean-Baptiste Bachet, Jean-Marc Gornet. Merci à Cécile Charpy, Frédéric Beuvon, Romain Coriat.

Aux chefs de service qui m'ont accueilli, formé et transmis leur vision de la médecine et de l'oncologie : docteur François Blot, professeur Aimery de Gramont, professeur Jean Trédaniel, professeur Jean-Paul Femand, professeur Jean-Charles Soria, professeur Eric Raymond, professeur François Goldwasser, professeur Jean-François Fléjou, professeur Karim Fizazi, docteur Alain Fourquet.

Aux médecins et chefs de clinique auprès desquels j'ai tant appris et avec qui j'ai tant partagé : Luis Teixeira, Hélène Marijon, Lionel Staudacher, Marion Malphettes, Antoine Hollebecque, Cristian Mateescu, Cindy Neuzillet, Anatole Cessot, Judith Michels, Samar Khrili.

A Marion et à Anatole, merci encore.

A mes co-internes pour avoir supporté mon humour, mes digressions, ma fatigue ; merci à vous de m'avoir laissé apprendre et m'enrichir à vos côtés : Delphine avec qui je vais continuer l'expérience, Cécilia, Paul-Arthur, Constance, Florence, Camille, Carole, Edith, Emilie, Stéphane, Edith « Borco », Clément, Frédéric, Lila, Pernelle, Cloé, Alix, Astrid, Fanny, Camille, Cécile, Audrey, Zineb, Matthieu.

A Camille et Florence, pour un semestre extraordinaire et une naissance qui restera dans les annales.

A tous mes amis, pour leur soutien indéfectible malgré les gardes, les astreintes, les examens, l'Examen, la Thèse : Anne, Camille, Florence, Fabrice, Yohann, Lise, Jessica, Guillaume, Cécile, Aurélia, Soleine, Mathilde, Julien, Claire, Thomas, Anne-Sophie, Anaïs, Camille, Laurent, les Nicolas et tous les autres.

A Anne.

A ma belle-famille, Françoise, Yves, Christian, Denise et les cousins d'Amérique.

A Hadouk Trio, pour *Shamanimal*.

A mes parents, de m'avoir toujours soutenu. Merci pour les dimanches improvisés, pour les doggy bag et les saucissons. Merci de transmettre. Merci d'être là.

A mes frères et à ma sœur, Mathilde, Benjamin, Martin, David-Henri ; à Mariam, Dimitri, Charline. Merci d'avoir supporté les intrusions de la médecine, merci de me faire découvrir d'autres univers.

A mes grands-parents. A Grand-Papa et Grand-Maman, pour Malaucène, les murs de pierre, la photographie. Merci de m'avoir transmis tant de choses. A Mamou et Jean-Pierre, pour les tartes Julie, les séances de cinéma et tout le reste ; le petit Paul Newman est devenu grand. A Grand-Père et Manine.

A mes oncles et tantes. A Antonin, Pierre, Cécile, cousins et cousine pour toujours.

A la nouvelle génération ; Joseph, Nathan, Noam, Gabriel, Simon, Raphaël, Robin, Paul, Mahault, Emile, Alix et tous ceux et toutes celles qui arriveront.

A Raphaël, mon plus beau cadeau d'anniversaire.

A Emile, la joie de vivre, jusqu'au bout de la nuit.

A Virginie, grâce à qui tout a commencé. Promis, je t'emmènerai au bout du monde.

Aux patients et à leurs familles.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Table des matières	4
1 Abréviations	7
2 Introduction	8
3 Revue de la littérature.....	11
3.1 Système de réparation des mésappariements de l'ADN.....	11
3.1.1 Système de réparation des mésappariements de l'ADN.....	11
3.1.2 Indications à la recherche d'une déficience du système MMR	12
3.1.3 Méthodes diagnostiques	13
3.2 Statut MMR et cancer colorectal localisé.....	15
3.2.1 Effet pronostique	15
3.2.2 Statut MMR et chimiothérapie adjuvante.....	16
3.2.3 Biomarqueurs d'intérêt.....	16
3.3 Statut MMR et cancer colorectal métastatique.....	17
3.3.1 Effet pronostique	17
3.3.2 Immunothérapie.....	19
4 Matériel et méthodes	21
4.1 Considérations éthiques.....	21
4.2 Sélection des patients	21
4.3 Recueil des données cliniques.....	21
4.4 Etude anatomo-pathologique.....	21
4.5 Analyses moléculaires	22
4.5.1 Phénotype microsatellitaire	22
4.5.2 Méthylation du promoteur du gène <i>hMLH1</i>	23
4.5.3 Statuts mutationnels des gènes <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i>	23
4.6 Analyses statistiques.....	23
5 Résultats	25
5.1 Population étudiée	25

5.2	Cas sporadiques et cas liés au syndrome de Lynch	26
5.3	Caractéristiques cliniques.....	28
5.4	Caractéristiques moléculaires.....	30
5.5	Caractéristiques anatomo-pathologiques.....	31
5.6	Evolution de la maladie au travers des stades	31
5.7	Analyses de survie.....	33
5.7.1	Maladies initialement localisées : survie avant récurrence	33
5.7.2	Survie globale en situation métastatique	33
5.7.3	Survie sans maladie : métastases prises en charge dans une intention curative	35
5.7.4	Survie sans progression en 1 ^e ligne métastatique	35
6	Discussion	36
6.1	Mise en perspective et critique	36
6.2	Méthodes et discordances.....	37
6.2.1	PCR et immunohistochimie.....	37
6.2.2	Syndrome de Lynch et mutation <i>BRAFV600E</i>	37
6.3	Caractéristiques de la population étudiée	38
6.3.1	Prévalence des cas sporadiques et des cas liés au syndrome de Lynch.....	38
6.3.2	Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques.....	38
6.3.3	Profil pronostique des CCRm dMMR.....	38
6.4	Avenir.....	40
7	Conclusion.....	41
8	Bibliographie.....	42

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1. Prévalence de la mutation <i>BRAFV600E</i> dans les cancers colorectaux dMMR et du statut dMMR dans les cancers colorectaux <i>BRAFV600E</i> mutés	9
Tableau 2. Valeur pronostique du statut MMR dans le cancer colorectal métastatique.....	18
Tableau 3. Médianes de survie globale selon les statuts MMR et <i>BRAF</i> dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS.....	18
Tableau 4. Immunothérapie et cancer colorectal métastatique dMMR.....	20
Tableau 5. Croisement des résultats de PCR Pentaplex® et d'immunohistochimie	26
Tableau 6. Identification des tumeurs dMMR sporadiques ou liées au syndrome de Lynch	27
Tableau 7. Caractéristiques démographiques et cliniques au diagnostic de cancer	28
Tableau 8. Caractéristiques de l'atteinte tumorale primitive et secondaire.....	29
Tableau 9. Statuts mutationnels <i>RAS</i> et <i>BRAF</i>	30
Tableau 10. Caractéristiques anatomo-pathologiques.....	31
Figure 1. Représentation schématique du système MMR	11
Figure 2. Etude immunohistochimique des protéines du système MMR.....	14
Figure 3. Taille allélique des 5 marqueurs de la PCR Pentaplex	15
Figure 4. Courbes de survie globale selon les statuts MMR et <i>BRAF</i> dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS.....	19
Figure 5. Diagramme de flux des inclusions.....	25
Figure 6. Diagramme de flux selon le caractère synchrone ou métachrone et l'accessibilité à un traitement local curatif de la maladie métastatique	32
Figure 7. Maladies initialement localisées : survie avant récurrence	33
Figure 8. Survie globale à partir du diagnostic de maladie métastatique	34
Figure 9. Survie sans maladie des cas métastatiques traités dans une intention curative.....	35
Figure 10. Survie sans progression en 1 ^e ligne métastatique.....	35

1 ABBREVIATIONS

BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CCR : cancer colorectal

CCRM : cancer colorectal métastatique

CIN : chromosomal instability

CMS : consensus molecular subtypes

dMMR : deficient mismatch repair

HSP110 : heat shock protein 110

HT17 : répétition mononucléotidique T17 du gène *Hsp110*

IHC : immunohistochimie

hMLH1 : human MutL homolog 1

hMSH2 : human MutS homolog 2

hMSH6 : human MutS homolog 2

HR : hazard ratio

MSI : microsatellite instability

MSS : microsatellite stable

PCR : polymerase chain reaction

PD-1 : programmed death 1

hPMS2 : human postmeiotic segregation increased 2

pMMR : proficient mismatch repair

SAR : survie après récurrence

SG : survie globale

SSM : survie sans maladie

SSR : survie sans récurrence

2 INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CCR) est responsable du 2^e plus grand nombre de décès par cancer en France (INCa 2013). Cette maladie, biologiquement hétérogène, se développe à travers différentes voies de carcinogénèse : l'instabilité chromosomique (CIN : chromosomal instability), l'instabilité microsatellitaire (MSI : microsatellite instability) et le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP : CpG island methylator phenotype). Ce dernier, qui présente un certain degré de chevauchement avec les voies CIN et MSI, correspond à une instabilité épigénétique aboutissant à une répression aberrante d'expression génique¹.

Le phénotype MSI est dû à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (dMMR : deficient mismatch repair), qui peut être d'origine sporadique et liée à une inactivation épigénétique du gène *hMLH1* (human MutL homolog 1), ou d'origine germinale, liée alors à une mutation germinale de l'un des gènes du système MMR, à savoir *hMLH1*, *hMSH2* (human MutS homolog 2), *hMSH6* (human MutS homolog 6) et *hPMS2* (human postmeiotic segregation increased 2) et correspondant alors aux 2 à 5% de CCR liés au syndrome de Lynch (prédisposition génétique au CCR et au cancer de l'endomètre principalement, et dans une moindre mesure aux cancers urothéliaux, des ovaires, de l'estomac, du pancréas et de l'intestin grêle)²⁻⁵.

Les CCR dMMR présentent des caractéristiques clinico-pathologiques particulières. Généralement situées au niveau du côlon droit, ce sont des tumeurs peu différenciées, souvent mucineuses avec une importante infiltration lymphocytaire péri- et intra-tumorale^{1, 6, 7}. Les CCR dMMR sont retrouvés dans 15 à 20 % des CCR localisés ; ce sont plus souvent des tumeurs de stade II que de stade III. Le phénotype MSI est moins fréquent en situation métastatique, représentant environ 3 à 5 % des CCR de stade IV (CCRm)⁸.

Les cas sporadiques de CCR dMMR, au contraire des cas liés au syndrome de Lynch, sont fréquemment associés à la mutation V600E de *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) [tableau 1]⁹. Cette mutation consiste en un remplacement d'une valine en position 600 du gène *BRAF* par un acide glutamique et aboutit à une protéine BRAF mutée, constitutionnellement active, qui induit l'activation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) *via* la phosphorylation de MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) en aval. Cette mutation oncogénique est de mauvais pronostic, associée à une médiane de survie globale (SG) en situation métastatique de l'ordre de 11 mois⁸. En outre, elle permet de distinguer, en cas de perte d'expression tumorale de *hMLH1*, les CCR dMMR sporadiques des cas héréditaires liés au syndrome de Lynch¹⁰⁻¹³.

INTRODUCTION

Tableau 1. Prévalence de la mutation BRAFV600E dans les cancers colorectaux dMMR et du statut dMMR dans les cancers colorectaux BRAFV600E mutés

	BRAFMT		dMMR	
	dMMR (%)	pMMR (%)	BRAFMT (%)	BRAFWT (%)
Cancers colorectaux de stade II-III				
NSABP C-07 et C-08 ¹⁴	29	71	35	65
PETACC-3 ¹⁵	46	54	24	76
PETACC-8 ¹⁶	36	64	32	68
MOSAIC ¹⁷	21	79	24	76
Cancers colorectaux métastatiques				
CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS ⁸	21	79	35	65

BRAFMT: BRAFV600E muté; BRAFWT: BRAF sauvage

Les CCR dMMR et/ou *BRAF* mutés s'intègrent dans un sous-groupe moléculairement et cliniquement particulier, nommé « consensus molecular subtype 1 » selon la classification du CRCSC (Colorectal Cancer Subtyping Consortium). L'impact pronostique positif du statut dMMR et le caractère péjoratif de la mutation *BRAFV600E* s'entremêlent et aboutissent à un profil pronostique intrigant. Alors qu'ils sont associés à des taux de survie sans récurrence (SSR) favorables aux stades localisés, les CCR *BRAF* mutés et dMMR ont un pronostic très péjoratif en situation métastatique, avec respectivement des médianes de survie d'environ 12 et 15 mois^{8, 18}. Ces tumeurs représentent un défi thérapeutique particulier et plusieurs stratégies novatrices sont en cours de développement.

En particulier, l'immunothérapie anti-tumorale, représentée par les anticorps monoclonaux anti-PD1 (programmed death 1) +/- anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), est une voie prometteuse puisque de récents travaux ont montré que les patients avec un CCRm dMMR présentent des taux de réponse tumorale objective supérieurs à 25%, au contraire des patients avec des tumeurs présentant un système MMR efficace (pMMR) (taux de réponse : 0%)¹⁹⁻²¹.

Bien que phénotypiquement (MSI) et génotypiquement (dMMR) homogène, l'entité « CCR dMMR » regroupe des patients aux profils pronostiques variés, des tumeurs aux caractéristiques moléculaires différentes (mutation *BRAFV600E* notamment) et des voies de carcinogénèse distinctes (syndrome de

INTRODUCTION

Lynch et mutation germinale des gènes MMR, tumeurs sporadiques et phénotype hyperméthyateur). Si l'hétérogénéité du groupe des CCR dMMR de stades II et III a été explorée, la faible fréquence du statut dMMR en situation métastatique (5%) en limite les possibilités d'analyse précise à ce stade avancé de la maladie cancéreuse⁸.

Notre travail a pour objectif de caractériser sur le plan clinique et moléculaire les CCRm dMMR, avec un intérêt particulier porté au caractère sporadique ou familial de ces tumeurs.

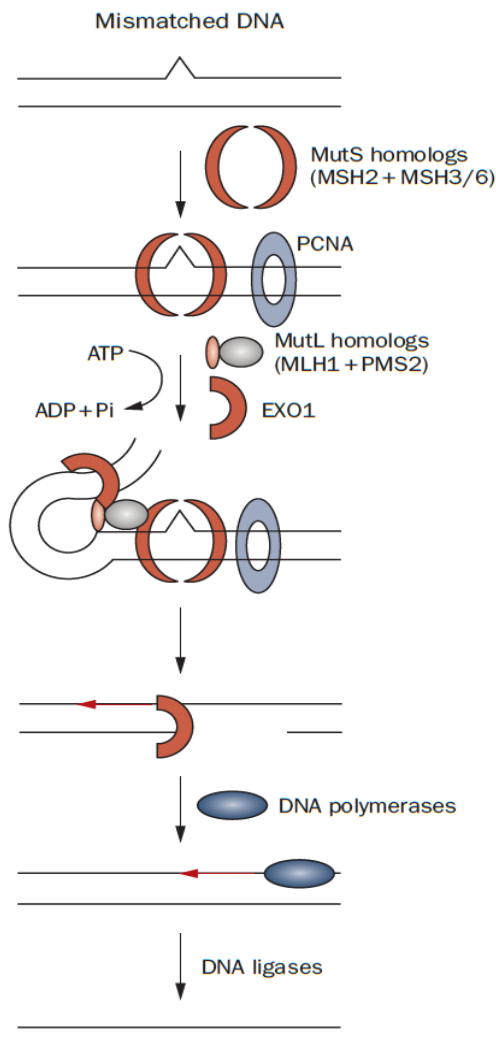
3 REVUE DE LA LITTÉRATURE

3.1 SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS DE L'ADN

3.1.1 Système de réparation des mésappariements de l'ADN

La réplication de l'ADN lors de la division cellulaire est une étape majeure pour assurer l'intégrité du génome. Les ADN polymérases répliquatives sont des enzymes d'une haute fiabilité. Des erreurs d'incorporation de nucléotides peuvent néanmoins apparaître, créant des mésappariements de bases ou des boucles d'insertion-délétion. Le système MMR est un mécanisme de correction d'erreur hautement conservé qui corrige ces erreurs générées lors de la réplication de l'ADN. Ce système fait intervenir un complexe protéique comprenant hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2, sous forme d'hétérodimères (hMLH1-hPMS2, hMSH2-hMSH6) et fonctionne en 4 grandes étapes [figure 1]^{22, 23}.

Figure 1. Représentation schématique du système MMR



Les 4 grandes étapes schématiques du système MMR :

- reconnaissance du mésappariement de bases ou de la boucle d'insertion-délétion par hMutS (hMSH2/hMSH6 ou hMSH2/hMSH3)
 - fixation de hMutS à la lésion de l'ADN, induisant une modification conformationnelle qui initie le recrutement de hMutL (hMLH1/hPMS2)
 - recrutement par hMutL de multiples partenaires protéiques et notamment des exonucléases pour couper la zone d'erreur sur le brin d'ADN lésé
 - comblement du vide au niveau du brin lésé par une ADN polymérase et raccordement du brin par des ADN ligases.
- d'après Hewish et collègues, Nat. Rev. Clin. Oncol. (2010)

3.1.2 Indications à la recherche d'une déficience du système MMR

La détermination du statut MMR a pour objectif primaire l'identification des patients porteurs d'une mutation germinale d'un gène MMR, et donc des apparentés pouvant présenter une prédisposition génétique aux cancers du spectre du syndrome de Lynch.

Les recommandations d'Amsterdam II ont proposé d'orienter les patients d'emblée vers une consultation oncogénétique à la recherche d'une mutation germinale d'un gène MMR, sans recherche préalable d'une déficience du système MMR, selon les critères suivants²⁴ :

- au moins trois cas de cancers colorectaux ou de cancers du spectre du syndrome de Lynch ;
- chez des apparentés au premier degré ;
- sur au moins deux générations successives ;
- dont au moins un cas diagnostiqué avant 50 ans ;
- une polypose adénomateuse familiale ayant été exclue.

Les recommandations de Bethesda, révisées en 2004, proposent un pré-criblage somatique au travers de la recherche d'une instabilité microsatellitaire, préalablement à toute consultation d'oncogénétique, chez les patients remplissant l'un des critères suivants²⁵ :

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

Jugés trop complexes, ces critères sont également modérément sensibles. Comparés à des stratégies de test systématique sur tous les patients, il a été montré que 12 à 28 % des cas de syndrome de Lynch identifiés auraient été manqués avec les critères de Bethesda révisés^{26,27}. Les dernières recommandations publiées par un groupe d'experts européens proposent de tester les CCR de tous les patients de moins de 70 ans²⁸.

Indépendamment de l'identification des cas associés au syndrome de Lynch, l'évaluation du statut MMR a également pour intérêt de préciser le profil pronostique des patients, notamment pour les CCR de stade II pour lesquels il n'y a pas d'indication à une chimiothérapie par fluoropyrimidines en cas de déficience du système MMR, en raison de leur pronostic excellent et de l'absence d'impact de la chimiothérapie adjuvante dans cette situation²⁹. Par ailleurs, compte-tenu des résultats impressionnants de

l'immunothérapie dans les CCRm dMMR¹⁹⁻²¹, il semble nécessaire de connaître le statut MMR des patients atteints d'un CCR de stade IV, bien que l'immunothérapie (pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab) n'ait pas d'autorisation de mise sur le marché dans cette indication.

Ainsi, la recherche d'une déficience du système MMR a pour objectifs de :

- identifier les patients potentiellement porteurs du syndrome de Lynch ;
- préciser le profil pronostique de la maladie tumorale et discuter l'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour les CCR de stade II ;
- orienter les patients avec un CCRm vers des stratégies thérapeutiques innovantes.

La recherche du statut dMMR devrait donc probablement être réalisée pour tous les patients présentant un CCR, indépendamment de leurs antécédents personnels et familiaux, des caractéristiques anatomopathologiques de la tumeur ou du stade de la maladie.

3.1.3 Méthodes diagnostiques

3.1.3.1 Immunohistochimie

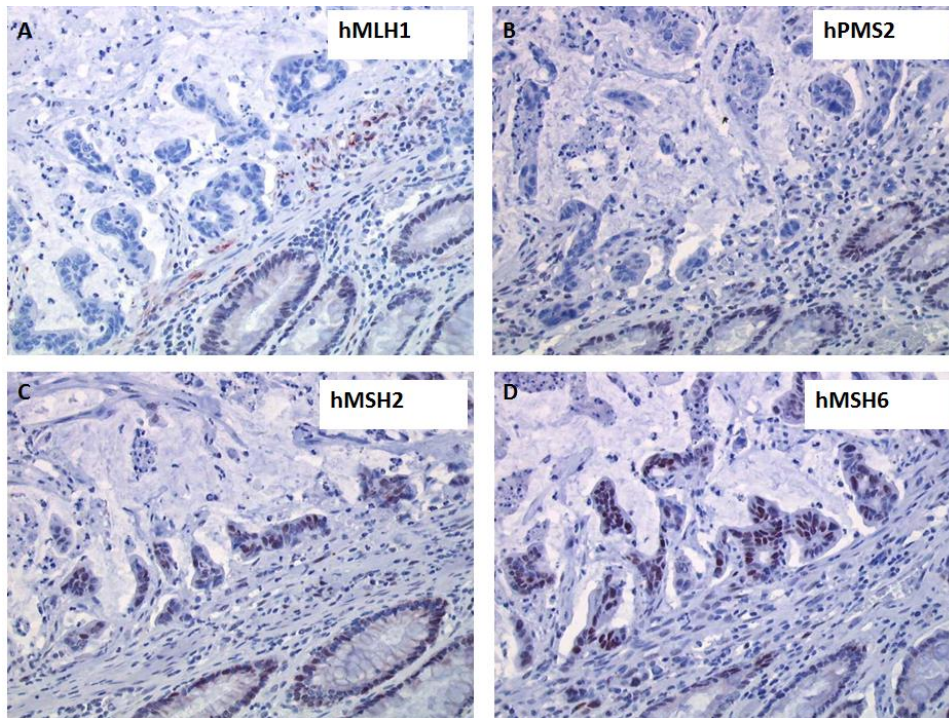
Les mutations des gènes MMR résultent en la perte d'expression de la protéine correspondante et peuvent être détectées par immunohistochimie (IHC) en utilisant des anticorps ciblant sur les 4 protéines [figure 2]. Les pertes de hMLH1 et de hMSH2 sont responsables d'une perte des protéines hPMS2 et hMSH6, respectivement, les secondes étant dégradées en l'absence de leur protéine partenaire. L'absence de hPMS2 ou de hMSH6 n'est à l'inverse pas systématiquement associée à une perte de hMLH1 ou hMSH2, mais ces cas sont rares^{30, 31}. La technique IHC peut néanmoins être mise en défaut par les mutations faux-sens, qui n'induisent pas nécessairement une perte d'expression de la protéine. La technique IHC reste cependant aussi performante que le génotypage des microsatellites dans la détection des CCR dMMR³².

3.1.3.2 Polymerase chain reaction

La déficience du système MMR résulte en une instabilité des microsatellites. Les microsatellites sont des séquences d'ADN de 1 à 6 nucléotides, hautement répétées et distribuées sur l'ensemble du génome et fréquemment copiées de manière incorrecte par la machinerie cellulaire. Le système MMR permet la détection de ces erreurs de copie et leur correction. Le génotypage des microsatellites par PCR (polymerase chain reaction) est une méthode standard de détection du phénotype MSI.

Les premières recommandations sur l'analyse du statut MSI proposaient l'utilisation d'un panel référence, dit de Bethesda, de 5 microsatellites comprenant 2 séquences mononucléotidiques (BAT-25 et BAT-26) et 3 répétitions dinucléotidiques (D2S123, D5S346 et D17S250)³³. Cette méthode compare les tailles de ces microsatellites entre le tissu tumoral et le tissu normal, le phénotype MSI étant défini par l'instabilité d'au moins 2 des 5 microsatellites. Le panel de Bethesda a cependant certaines limites,

Figure 2. Etude immunohistochimique des protéines du système MMR



Les cellules tumorales expriment hMSH2 (C) et hMSH6 (D), mais n'expriment pas hMLH1 (A) et hPMS2 (B).

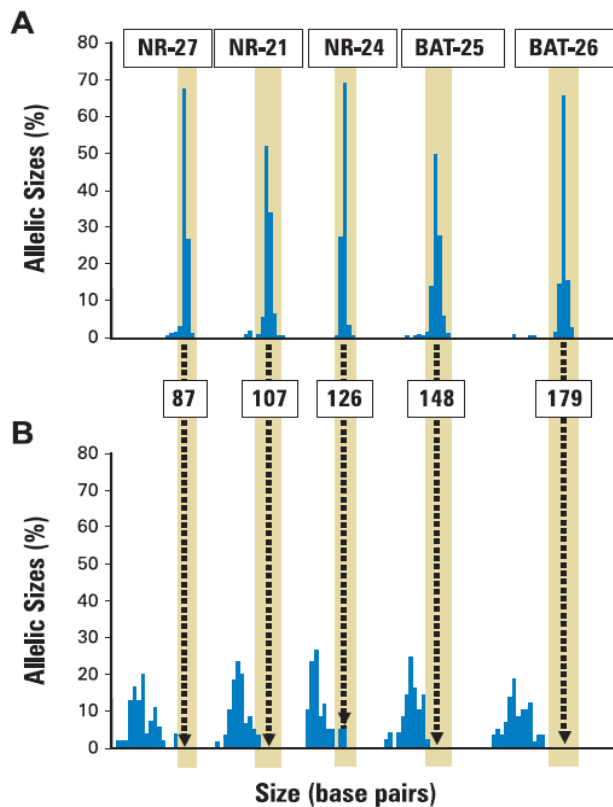
Les cellules non tumorales sont marquées par les anticorps anti-hMLH1 et -hPMS2 (témoin interne positif).

Source : Dr Magali Svrcek

notamment liées à la difficulté d'interprétation de l'amplification des microsatellites dinucléotidiques. Ainsi la révision des recommandations Bethesda propose actuellement l'utilisation de marqueurs mononucléotidiques uniquement²⁵.

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 2 microsatellites³⁴. La PCR Pentaplex (Pentaplex Promega®) 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 tumoral³⁵.

Il a été récemment montré que l'analyse unique du microsatellite T17 du gène codant pour la protéine chaperonne HSP110 (HT17) permet de détecter plus simplement et de manière fiable les tumeurs MSI³⁶. En effet HT17 est plus sensible, présente la même spécificité que la PCR Pentaplex, reclasse correctement les cas dont la conclusion de la PCR Pentaplex est incertaine, et présente l'avantage de ne pas utiliser qu'un seul microsatellite. HT17 pourrait donc devenir une méthode de référence pour la détection de l'instabilité microsatellitaire.

Figure 3. Taille allélique des 5 marqueurs de la PCR Pentaplex


A. population générale mondiale

B. tumeurs MSI

d'après Buhard et collègues, *J. Clin. Oncol.* (2004)

3.2 STATUT MMR ET CANCER COLORECTAL LOCALISE

3.2.1 Effet pronostique

L'analyse des essais comparant la chirurgie seule à la chirurgie associée à une chimiothérapie adjuvante par fluoropyrimidine a permis de démontrer l'influence pronostique favorable du statut dMMR dans les CCR localisés (stade I à III). S'appuyant sur les résultats de 5 essais de phase III concernant des CCR de stade II ou III, Ribic et collègues ont montré une amélioration significative de la SG à 5 ans des patients atteints d'un CCR dMMR traité par chirurgie seule³⁷. L'étude complémentaire de Sargent et collègues validait ces résultats en termes de SSR et de SG³⁸.

L'analyse des essais de chimiothérapie adjuvante a permis de préciser l'impact du statut dMMR dans le contexte de patients traités par chimiothérapie au décours de la chirurgie d'exérèse. En 2011, l'étude de Sinicrope analysait 2141 patients inclus dans différents essais randomisés de chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidines. En analyse multivariée, les 344 patients avec une tumeur dMMR avaient une SSR et une SG significativement prolongées par rapport au groupe pMMR³⁹. Ces résultats étaient retrouvés chez les patients traités et non traités avec des tumeurs dMMR de stade II et III. L'étude

QUASAR a confirmé l'impact pronostique positif du statut dMMR pour les CCR de stade II, avec un taux de rechute ou de décès à 10 ans de 10 % dans le groupe dMMR contre 27% dans le groupe pMMR ($P < 0.00001$)⁴⁰.

L'analyse de l'essai PETACC-3 montre que l'avantage en survie conféré par le statut dMMR est majeur pour les tumeurs de stade II, sur la SSR (hazard ratio (HR) = 0.26, intervalle de confiance à 95 % (IC95) 0.10-0.65) et la SG (HR = 0.16, IC95 0.04-0.64), mais est moindre pour les CCR de stade III, restant significatif en SSR (HR = 0.67, IC95 0.46-0.99), mais pas en SG (HR = 0.70, IC95 0.44-1.09)^{15, 41}.

3.2.2 Statut MMR et chimiothérapie adjuvante

Les patients présentant une tumeur dMMR de stade II semblent ne pas tirer bénéfice de la chimiothérapie adjuvante à base de 5-fluorouracile³⁷⁻³⁹. Par ailleurs, différentes études ont montré que l'ajout d'oxaliplatine à la chimiothérapie adjuvante (FOLFOX) semblait conférer un bénéfice en terme de SSR aux patients avec des CCR dMMR de stade II à haut risque (tumeur T4, perforation, moins de 12 ganglions analysés) ou de stade III^{17, 42, 43}.

Ainsi, en l'état actuel des connaissances, il n'y a pas d'indication à une chimiothérapie par fluoropyrimidines pour les CCR dMMR de stade II en raison de leur pronostic excellent et de l'absence d'impact de la chimiothérapie adjuvante dans cette situation. Le statut dMMR n'a à ce jour pas démontré son intérêt pour poser l'indication et déterminer le type de traitement adjuvant pour les CCR de stade III, pour lesquels le standard reste l'association d'une fluoropyrimidine à l'oxaliplatine.

3.2.3 Biomarqueurs d'intérêt

3.2.3.1 Tumeurs sporadiques versus tumeurs liées syndrome de Lynch

Les CCR dMMR 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 mutation 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 SSR avec le 5-fluorouracile (HR = 1.50, $P = 0.182$)³⁹.

Il est donc possible que l'effet potentiellement délétère des fluoropyrimidines pour les tumeurs dMMR de stade II soit réel pour les patients avec un CCR sporadique, mais pas pour les patients avec un syndrome de Lynch.

3.2.3.2 Heat shock protein 110

Dorard et collègues ont montré que, dans les CCR dMMR, le gène codant pour la protéine chaperonne HSP110 est systématiquement mutée au niveau d'une répétition nucléotidique T17 dans l'intron 8. Cette mutation se présente sous forme de délétions microsatellite T17 de 1 à 7 pb dont la taille corrèle avec la synthèse d'un ARN messager délété au niveau de l'exon 9, nommé HSP110 DE9. La protéine HSP110

DE9 joue le rôle de dominant négatif inhibant l'activité de la chaperonne HSP110 sauvage *via* une interaction directe⁴⁴.

La mutation du gène *Hsp110* dans les tumeurs dMMR semble associée à un meilleur pronostic chez les patients ; en outre, elle confère aux cellules tumorales une sensibilité accrue au 5-fluorouracile. Dans une série de 329 tumeurs dMMR de stade II ou III, la présence de larges délétions de *Hsp110* T17 était associée à une efficacité de la chimiothérapie adjuvante (HR = 0.16, P = 0.03). Environ 25% des CCR dMMR localisés expriment cette protéine chaperonne mutée⁴⁵. D'autres études seront nécessaires afin de mieux appréhender ce biomarqueur potentiel et l'intégrer dans la pratique clinique.

3.2.3.3 *Infiltrat inflammatoire*

L'infiltrat inflammatoire des tumeurs dMMR permet de distinguer des profils pronostiques différents au sein même du groupe des CCR dMMR⁴⁶. Ainsi il a été montré que les signes de réponse immunitaire intra-tumorale étaient associés à une amélioration de la SSR et de la SG⁴⁷. La présence de lymphocytes T régulateurs intra-tumoraux est ainsi de bon pronostic dans les CCR dMMR^{48,49}. Une analyse post hoc de l'essai de phase 3 PETACC-8 a montré que l'importance de l'infiltrat lymphocytaire est associée avec une amélioration du taux de récurrence à 3 ans (14.4% *versus* 21.1%, P = 0.02) et de la SG (HR = 1.7, IC95 1.1-2.7, P = 0.02) chez les patients présentant un CCR de stade 3. Les tumeurs dMMR étaient plus fréquemment retrouvées dans le groupe avec un fort infiltrat lymphocytaire. Les analyses en sous-groupes ne montraient pas de différence significative au sein des CCR dMMR⁵⁰.

Par ailleurs, il a récemment été démontré qu'un score immunitaire (« immunoscore »), basé sur la quantification des lymphocytes T cytotoxiques et mémoire au niveau intra-tumoraux et des berges d'invasion, permettait d'identifier les patients à haut risque de récurrence au sein même du groupe dMMR^{51, 52}. L'étude standardisée de 1336 CCR localisés a montré en analyse multivariée une association entre un immunoscore élevé et une amélioration du temps jusqu'à récurrence (HR = 0.46, IC95 0.24-0.87, P = 0.0142)⁵³. Cet outil, pertinent et robuste, semble particulièrement intéressant dans la perspective des stratégies immunothérapeutiques du CCR.

3.3 STATUT MMR ET CANCER COLORECTAL METASTATIQUE

3.3.1 Effet pronostique

L'impact du statut dMMR sur le pronostic des patients atteints d'un CCR à un stade métastatique n'est pas encore totalement élucidé. La faible prévalence des CCRm dMMR comparativement aux stades II et III (5% *versus* 15-20%) souligne la faible capacité de ce type tumoral à développer des métastases. Peu de données sont disponibles concernant le pronostic des patients avec un CCRm dMMR. Jusqu'à récemment, les études ayant évalué l'impact pronostic du statut MMR dans cette situation avaient inclus de très faibles échantillons, rendant les résultats statistiquement non significatifs et difficilement interprétables [tableau 2].

Tableau 2. Valeur pronostique du statut MMR dans le cancer colorectal métastatique

Auteur, année	N (dMMR/pMMR)	SG (mois)		P
		dMMR	pMMR	
Brueckl, 2003 ⁵⁴	43 (7/36)	33	19	0.021*
Des Guetz, 2007 ⁵⁵	40 (9/31)	16	22.5	0.16
Koopman, 2009 ⁵⁶	515 (18/497)	10.2	17.9	0.41
Tran, 2011 ⁵⁷	350 (40/310)	11.1	22.1	0.001*
Venderbosch, 2014 ⁸	3063 (153/2910)	13.6	16.8	0.001*

* : statistiquement significatif

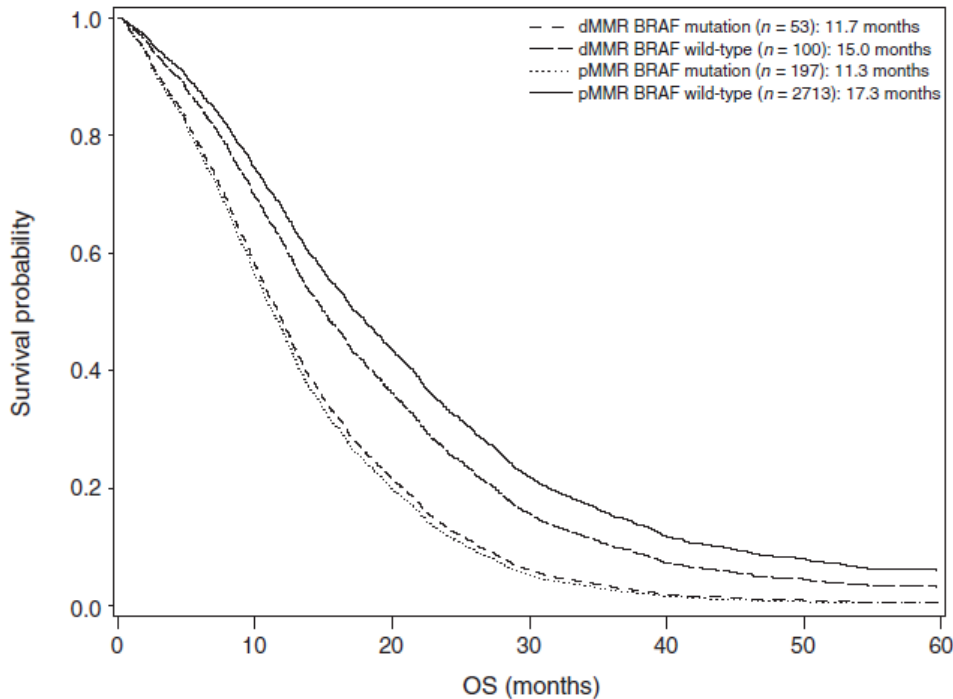
L'analyse poolée de 4 études de phase III en situation de 1^e ligne métastatique (études CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS) a permis de mieux appréhender le profil pronostique des CCRm dMMR⁸. Parmi les 3063 patients présentant un CCR de stade IV, ceux avec une tumeur dMMR (n = 153 ; 5%) avaient une SSP et une SG significativement réduite (HR = 1.33, IC95 1.12-1.54 ; HR = 1.35, IC95 1.13-1.61, respectivement). La prise en compte de l'association forte entre dMMR et *BRAFV600E* permet de préciser ces données et semble indiquer que le pronostic défavorable observé pour les patients présentant un CCRm dMMR est lié à l'impact péjoratif de la mutation *BRAFV600E*, retrouvée dans 34% des cas dMMR [tableau 3 et figure 4].

Tableau 3. Médianes de survie globale selon les statuts MMR et BRAF dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS

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

* : statistiquement significatif ; *BRAF^{MT}* : *BRAFV600E* muté ; *BRAF^{WT}* : *BRAF* sauvage d'après Venderbosch et collègues, *Clin. Can. Res.* (2014)

Figure 4. Courbes de survie globale selon les statuts MMR et BRAF dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS



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

3.3.2 Immunothérapie

Les stratégies thérapeutiques d'inhibition des points de contrôle immunitaires (« immune checkpoints ») semblent être sur le point de révolutionner la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers dMMR. La preuve du concept a été apportée par une étude de phase 2 présentée en juin 2015 au congrès annuel de l'association américaine d'oncologie médicale (ASCO) et publiée simultanément dans le *New England Journal of Medicine*¹⁹. Il s'agissait de résultats préliminaires portant sur des patients préalablement traités pour un CCRm dMMR ou pMMR par pembrolizumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1. Cette étude montrait que seuls les CCR dMMR étaient sensibles à l'inhibition de PD-1. L'actualisation des résultats présentée au congrès annuel 2016 de l'ASCO a confirmé l'efficacité majeure de cet anticorps anti-PD-1 dans cette indication. Le taux de réponse dans la cohorte dMMR (N = 28) est de 50% contre 0% dans la cohorte pMMR (N = 25). Les médianes de SSP et de SG ne sont toujours pas atteintes dans la cohorte dMMR, contre respectivement 2,4 mois (HR = 0.135, IC95 0.043-0.191, P < 0.0001) et 6 mois dans la cohorte pMMR (HR = 0.247, IC95 0.117-0.589, P = 0.001)²⁰.

D'autres inhibiteurs de points de contrôle immunitaires sont également en cours d'évaluation pour les CCRm dMMR. Ainsi le nivolumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1 est testé seul ou en association à l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Des résultats

préliminaires ont été rapportés au congrès annuel 2016 de l'ASCO²¹. De la même manière que pour le pembrolizumab, les résultats sont décevants pour les patients de la cohorte pMMR avec une seule réponse tumorale et une SSP médiane de 2.26 mois (N = 20). La cohorte dMMR a inclus 100 patients ; 70 patients ont reçu le nivolumab seul à 3 mg/kg ; 30 patients ont été traités par nivolumab 3 mg/kg associé à ipilimumab 1 mg/kg pour 4 cycles (J1 = J21) puis nivolumab 3mg/kg seul tous les 15 jours jusqu'à progression. Le taux de réponse objectif est respectivement de 25,5% et 33,3%, avec des réponses prolongées. La médiane de SSP, de 5,3 mois dans la cohorte traitée par nivolumab seul, n'est pas atteinte dans le bras combinant nivolumab et ipilimumab.

Ces premiers résultats, avec des patients contrôlés durablement par l'immunothérapie, incitent à poursuivre le développement de ces thérapeutiques dans le cadre des tumeurs dMMR, colorectales ou autres.

La recherche de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de ces nouvelles immunothérapies représente l'un des défis à relever pour les patients présentant un CCR dMMR. Ainsi, l'expression de PD-L1 (ligand de PD-1) par les cellules tumorales ou le microenvironnement n'est pas corrélée à l'efficacité du pembrolizumab¹⁹. Il est à noter que les analyses rapportées n'ont pas différencié les tumeurs selon leur statut mutationnel *BRAF* ni selon leur caractère sporadique ou héréditaire. L'une des voies de recherche actuelle consiste en l'analyse de la charge mutationnelle des tumeurs. En effet, les tumeurs dMMR exhibent 20 fois plus de mutations somatiques que les tumeurs pMMR, et par conséquent un nombre plus élevé de néo-antigènes tumoraux^{19, 58, 59}. Ces données suggèrent que la réponse immunitaire spécifique est liée à la génétique tumorale, ce qui paraît pertinent compte-tenu de l'association forte entre tumeurs dMMR et infiltrat inflammatoire intra-tumoral. De plus il a été montré qu'une charge néo-antigénique élevée est associée à une densité élevée de lymphocytes intra-tumoraux et à des taux de survie favorables^{60, 61}. Les tumeurs dMMR seraient donc plus sensibles à l'immunothérapie du fait de leur incapacité à réparer les erreurs d'appariements de base de leurs molécules d'ADN.

Tableau 4. Immunothérapie et cancer colorectal métastatique dMMR

	N	CR (%)	PR (%)	SD (%)	PD (%)	SSP (mois)	SG (mois)
Pembrolizumab ²⁰	28	11	46	32	4	NA	NA
Nivolumab ²¹	47	0	26	30	36	5.3	17.1
Nivolumab + ipilimumab ²¹	27	0	33	52	11	NA	NA

CR : réponse tumorale complète ; PR : réponse tumorale partielle ; SD : stabilité tumorale ; PD : progression tumorale

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 CONSIDERATIONS ETHIQUES

Cette étude a été approuvée par le comité de protection des personnes Ile de France IV de l'hôpital Saint-Louis (N° IRB 00003835) le 27 novembre 2014 et a fait l'objet d'une déclaration à la commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL).

4.2 SELECTION DES PATIENTS

Deux cohortes de patients présentant un CCRm dMMR ont été constituées.

La première cohorte, rétrospective et multicentrique, concerne les patients suivis pour un CCRm dMMR et n'ayant pas été traités par immunothérapie. Ces patients ont été identifiés rétrospectivement *via* les registres des services d'anatomo-pathologie et/ou des services d'oncologie médicale de 6 centres hospitaliers français : hôpital Lariboisière (Paris), hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris), hôpital Saint-Louis (Paris), hôpital Saint-Antoine (Paris), Institut du Cancer de Montpellier, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille.

La seconde cohorte, prospective et monocentrique, est constituée des patients traités par immunothérapie à l'hôpital Saint-Antoine dans le cadre d'essais thérapeutiques. Il s'agit des patients inclus dans l'essai de phase 2 MSD-3475-164/KEYNOTE-164 (NCT02460198) évaluant le pembrolizumab, et dans l'essai de phase 2 BMS CA209-142/CHECKMATE-142 (NCT02060188) évaluant le nivolumab avec ou sans ipilimumab. Les données de survie des patients ont été censurées à la date de leur inclusion, les résultats des essais MSD-3475-164 et BMS CA209-142 n'étant pas encore publiés.

Les critères d'exclusion de l'étude étaient : (i) absence d'échantillon tumoral disponible ; (ii) tumeur pMMR (PCR Pentaplex®) et MSS (IHC).

4.3 RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES

Tous les dossiers médicaux des patients inclus ont été analysés. Les données démographiques, les critères cliniques orientant vers une prédisposition génétique (critères d'Amsterdam modifiés : âge au diagnostic, antécédents personnels et familiaux de cancers du spectre du syndrome de Lynch), les caractéristiques tumorales, les types de traitements reçus, les réponses aux traitements et les données de survie ont été collectés.

4.4 ETUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE

Les échantillons de tissu tumoral de la tumeur primitive et/ou de métastases ont été identifiés dans chaque centre participant en utilisant le logiciel DIAMIC (Infologic-Santé). Les échantillons, fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE : formalin-fixed, paraffin-embedded), ont été recueillis et regroupés

au sein d'une collection biologique centralisée dans le service d'anatomie-pathologique de l'hôpital Saint-Antoine.

Les données de l'analyse anatomo-pathologique effectuée par le laboratoire d'origine ont été recueillies : niveau d'invasion pariétale, nombre de ganglions métastatiques et nombre de ganglions analysés, présence d'embolies vasculaires veineux et lymphatiques, présence d'engainements péri-nerveux, évaluation des marges de résection, degré de différenciation (bien, moyennement ou peu différencié), type histologique (intestinal, mucineux, médullaire, à cellules indépendantes). Le degré de différenciation et le type histologique ont été réévalués sur une lame en coloration standard (hématoxyline et éosine ou hématoxyline, phloxine et safran) Les adénocarcinomes mucineux étaient définis en accord avec la classification OMS 2010, à savoir un contingent mucineux représentant plus de 50% de la tumeur. Les stades pTNM ont été évalués selon la classification TNM 2010, 7^e édition (AJCC).

Les tumeurs primitives ont été catégorisées en « côté droit » et « côté gauche », selon qu'elles étaient développées entre le caecum et l'angle colique gauche ou entre le côlon descendant et la jonction anorectale. Lorsque plusieurs tumeurs colorectales avaient été mises en évidence du côté droit et du côté gauche, la localisation de la tumeur primitive du CCRm était considérée comme indéterminée.

Le statut MMR des tumeurs a été étudié par IHC dans le laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Saint Antoine (Paris). L'expression des protéines MMR par les cellules tumorales a été évaluée en utilisant des anticorps anti-hMLH1, anti-hMSH2, anti-hMSH6 et anti-hPMS2. Le tissu non tumoral était utilisé comme témoin interne.

4.5 ANALYSES MOLECULAIRES

4.5.1 Phénotype microsatellitaire

Une analyse confirmatoire du phénotype MSI a été réalisée par PCR Pentaplex au sein du laboratoire de l'équipe « Instabilité des microsatellites et Cancers » (équipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer) du Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM, UPMC Paris 06, Sorbonne Universités.

L'ADN a été extrait à partir de deux coupes de 10µm d'épaisseur de tissu fixé en formol et inclus en paraffine, réalisées à partir des blocs après macrodissection des zones d'intérêt. Cette extraction a été réalisée avec un kit d'extraction (DNeasy Blood and Tissue DNA isolation kit, Qiagen, Hilden, Germany). Les ADN ont été dosés sur spectrophotomètre en UV.

Tous les marqueurs pentaplex (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27) ont été analysés avec l'analyseur génétique ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Les tumeurs étaient considérées comme MSI en cas d'instabilité d'au moins 2 marqueurs.

4.5.2 Méthylation du promoteur du gène *hMLH1*

En cas de perte d'expression tumorale de *hMLH1* en IHC, une analyse de l'état de méthylation du promoteur du gène *hMLH1* était effectuée par la plateforme de biologie moléculaire de l'hôpital Saint-Antoine (Paris), permettant de distinguer les cas sporadiques (hyperméthylation) des cas liés au syndrome de Lynch (absence d'hyperméthylation). L'ADN tumoral a été traité avec du bisulfite qui convertit les cytosines non méthylées en uracile tandis que les cytosines méthylées ne sont pas modifiées par le traitement, en utilisant le kit EZ DNA Methylation-Gold™ (ZYMO Research Corp.). Le profil de méthylation a été déterminé après amplification par PCR avec deux couples d'amorces différentielles suivie d'un séquençage (Genetic Analyzer 3500xL, Applied Biosystem). L'analyse de fragment a été réalisée avec le logiciel Genemapper (Applied Biosystem), qui distingue par la taille, les fragments méthylés et non méthylés, avec des lignées cellulaires contrôles méthylées (RKO) et non méthylées (ITS3)

4.5.3 Statuts mutationnels des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*

La détection des mutations pour *KRAS* exons 2, 3 et 4, *NRAS* exons 2 et 3 et *BRAF* exon 15 a été réalisée par PCR en temps réel (Light Cycler 480, Roche diagnostic) en amplifiant chacun des exons étudiés des trois gènes d'intérêt *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*. Les cas mutés ainsi détectés ont été analysés par pyroséquençage (Pyromark Q24, Qiagen) en utilisant les kits dédiés theascreen® *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* Pyro Kit CE (Qiagen). En cas de discordance, un séquençage direct a été réalisé (ABI PRISM 3500L Dx genetic analyzer, Applied Biosystem).

4.6 ANALYSES STATISTIQUES

La base de données a été figée au 1^{er} juillet 2016.

Les patients inclus dans l'étude ont été séparés en 2 groupes :

- cas héréditaires liés au syndrome de Lynch, avéré (présence d'une mutation constitutionnelle d'un gène MMR) ou hautement probable (perte d'expression de hMSH2/hMSH6, de hMSH6 ou hPMS2 de manière isolée, ou perte de hMLH1/hPMS2 sans mutation *BRAFV600E* ni hyperméthylation du promoteur de hMLH1) ; en cas de perte de hMLH1/hPMS2 sans mutation *BRAFV600E* mais avec un statut de méthylation indéterminé, les patients répondant aux critères d'Amsterdam ou étant âgés de moins de 40 ans étaient considérés comme porteurs du syndrome de Lynch de manière hautement probable ;
- cas sporadiques (perte d'expression de hMLH1 avec mutation *BRAFV600E* et/ou avec hyperméthylation du promoteur de hMLH1).

Les caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires entre les groupes « Lynch » et « sporadique » ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher. Pour les analyses de survie globale, les patients inclus dans les essais KEYNOTE-164 et CHECKMATE-142 ont été censurées à la date d'inclusion

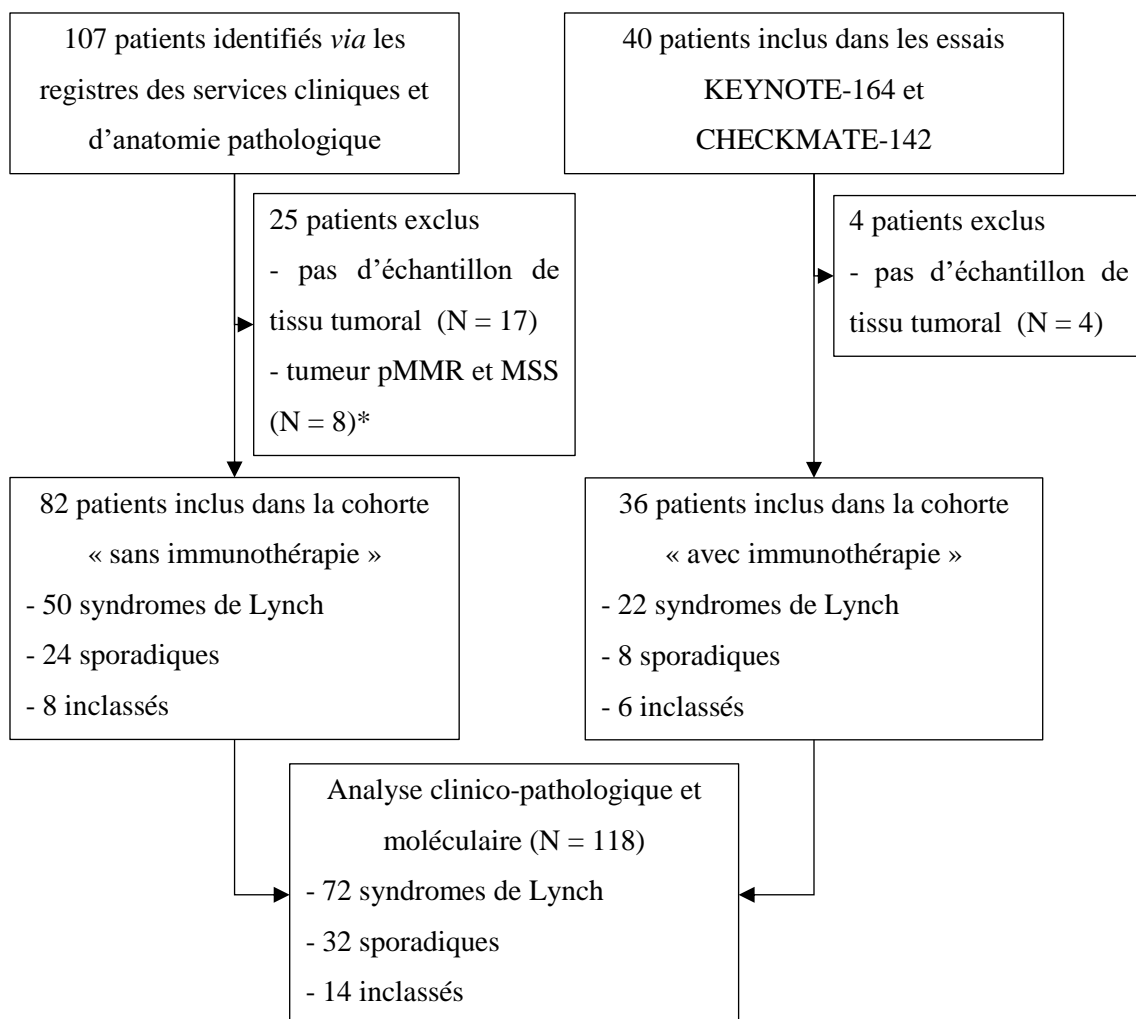
dans ces essais. La survie avant récurrence loco-régionale ou métastatique correspond au temps entre la date d'exérèse de la tumeur primitive et la date de récurrence et la survie après récurrence au temps entre la date de récurrence et la date de décès ou de dernières nouvelles. La survie globale en situation métastatique a été calculée depuis la date de diagnostic de la maladie métastatique jusqu'à la date de décès, toute cause confondue, en censurant les patients toujours vivants à la date des dernières nouvelles ou à la date d'inclusion dans les essais d'immunothérapie. La survie sans maladie a été calculée pour les patients ayant eu une résection de leur maladie métastatique (chirurgie ou radiofréquence) depuis la date de résection jusqu'à la date de récurrence. La survie sans progression en 1^e ligne correspond au temps entre la date de début de traitement par chimiothérapie prescrite en 1^e ligne métastatique et la date de la 1^e observation d'une progression tumorale ou d'un décès, toute cause confondue. Les courbes de survie ont été établies par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test de Log-rank (Mantel-Cox). Le calcul du hazard ratio a été effectué selon la méthode de Mantel-Haenszel en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 7.00 pour Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

5 RESULTATS

5.1 POPULATION ETUDIEE

Cent quarante-sept patients présentant un CCRm dMMR diagnostiqué entre mars 1998 et mars 2016 ont été identifiés *via* les registres des services d'anatomie pathologique et des services cliniques des hôpitaux participant à l'étude (N = 107) et *via* les inclusions du service d'oncologie médicale de l'hôpital Saint-Antoine dans les essais d'immunothérapie KEYNOTE-164 et CHECKMATE-142 (N = 40). Parmi ces 147 patients, 29 ont été exclus en raison de l'absence de matériel tumoral disponible (N = 21) et en raison d'un statut pMMR (IHC) et MSS (PCR) selon les analyses confirmatoires effectuées à l'hôpital Saint-Antoine (N = 8). Aucun patient n'avait émis d'opposition à l'utilisation du matériel tumoral disponible. Les 118 patients restants ont été inclus dans l'étude pour analyse des caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires [figure 5].

Figure 5. Diagramme de flux des inclusions



* : 7 cas initialement considérés comme MSI et 1 cas comme dMMR d'après les résultats du laboratoire d'origine ; les analyses confirmatoires ont conclu à un statut pMMR et MSS pour ces 8 patients.

5.2 CAS SPORADIQUES ET CAS LIES AU SYNDROME DE LYNCH

Le statut MSI ou dMMR des tumeurs a été confirmé pour l'ensemble de la population incluse. Les résultats des analyses par PCR et IHC étaient discordants dans 9 cas (8%) : 4 cas sans aucune perte d'expression en IHC mais MSI en PCR, 5 cas MSS en PCR mais dMMR en IHC (3 cas avec perte de hMLH1/hPMS2, 2 cas avec perte isolée de hMSH6) [tableau 5].

Tableau 5. Croisement des résultats de PCR Pentaplex® et d'immunohistochimie

	Statut MMR (IHC)		Total
	dMMR	pMMR	
Statut microsatellitaire (PCR)			
instabilité des microsatellites (MSI)	97	4*	101
stabilité des microsatellites (MSS)	5*	0**	5
en cours de détermination	12	0	12
Total	114	4	118

* : cas discordants ; ** : après exclusion des 8 cas pMMR et MSS

Une perte d'expression de hMLH1/hPMS2 et hMSH2/hMSH6 a été mise en évidence pour 58% et 27% de la population totale, respectivement. Le statut de méthylation du promoteur du gène *hMLH1* était connu pour 37 des 68 cas avec perte d'expression de hMLH1/hPMS2 ; les autres cas étaient encore en cours d'analyse à la date de point [tableau 6].

Soixante-douze patients (61%) présentaient un CCR dMMR relié au syndrome de Lynch [figure 5 et tableau 6] :

- 26 patients porteurs d'une mutation constitutionnelle d'un gène du système MMR (*hMLH1*, N = 10 ; *hMSH2*, N = 14 ; *hMSH6*, N = 2), dont 1 cas *hMSH2* muté sans perte d'expression associée de *hMSH2* en IHC ;
- 31 cas avec perte d'expression tumorale de hMSH2/hMSH6, de hMSH6 isolée ou de hPMS2 isolée ;
- 8 cas avec perte d'expression tumorale de hMLH1/hPMS2, *BRAF* sauvages, sans hyperméthylation du promoteur de *hMLH1* ;
- 7 cas avec une perte d'expression tumorale de hMLH1/hPMS2, *BRAF* sauvage, de statut de méthylation indéterminé, mais remplissant les critères d'Amsterdam (N = 3) ou âgés de moins de 40 ans (N = 4).

Trente-deux cas (27%) ont été considérés comme d'origine sporadique :

- 21 cas avec perte d'expression tumorale de hMLH1/hPMS2, *BRAF*V600E mutés (dont 12 tumeurs avec une hyperméthylation du promoteur de *hMLH1*) ;
- 11 cas avec perte d'expression tumorale de hMLH1/hPMS2, *BRAF* sauvages, présentant une hyperméthylation du promoteur de *hMLH1*.

Quatorze tumeurs (13%) n'ont pas pu être classées entre origine sporadique et origine héréditaire :

- 11 cas avec perte d'expression tumorale de hMLH1/hPMS2, *BRAF* sauvages, avec un statut de méthylation du promoteur de *hMLH1* indéterminé, sans critère clinique discriminant ;
- 3 cas sans perte d'expression tumorale de hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2 en IHC, *BRAF* sauvage, avec un statut de méthylation du promoteur de *hMLH1* indéterminé, sans critère clinique discriminant.

Tableau 6. Identification des tumeurs dMMR sporadiques ou liées au syndrome de Lynch

	Population totale N (%)	Groupe « sporadique » N (%)	Groupe « Lynch » N (%)	Cas inclassés N (%)
Nombre de patients	118 (100)	32 (100)	72 (100)	14 (12)
Perte de hMLH1/hPMS2	68 (58)	32 (100)	25 (35)	11 (79)
<i>hMLH1</i> constitutionnellement muté	10	0	10	0
<i>BRAF</i> ^{MT}	21	21	0	0
<i>BRAF</i> ^{WT} / hyperméthylé	11	11	0	0
<i>BRAF</i> ^{WT} / non hyperméthylé	8	0	8	0
<i>BRAF</i> ^{WT} / méthylation inconnue	18	0	7*	11
Perte de hMSH2/hMSH6	32 (27)	0 (0)	32 (44)	0 (0)
Perte de hMSH6 isolée	9 (8)	0 (0)	9 (13)	0 (0)
Perte de hPMS2 isolée	5 (4)	0 (0)	5 (7)	0 (0)
Pas de perte d'expression (pMMR mais MSI en PCR)	4 (3)	0 (0)	1 (1)**	3 (21)***

* : cas remplissant les critères d'Amsterdam (N = 3) ou âge inférieur à 40 ans (N = 4)

** : 1 cas sans perte d'expression en IHC mais avec mutation constitutionnelle identifiée de *hMSH2*

*** : 3 cas sans perte d'expression en IHC, *BRAF*^{WT} avec un statut de méthylation indéterminé

5.3 CARACTERISTIQUES CLINIQUES

Les caractéristiques démographiques des patients au diagnostic de CCRm sont résumées dans le tableau 7. Les caractéristiques tumorales sont présentées dans le tableau 8. Dans la population totale de CCRm dMMR (N = 118), l'âge médian au diagnostic était de 56 ans. Il s'agissait préférentiellement de maladies s'étant développées initialement au niveau du côlon proximal (66%), de stade 3 (70%) et métachrones (57%). Les principaux organes atteints à distance étaient le péritoine (42%), le foie (36%) et les ganglions (32%).

Comparés au groupe « Lynch », les patients atteints d'un CCRm d'origine sporadique étaient plus fréquemment des femmes (ratio hommes/femmes : 0.28 *versus* 3.24, P < 0.001), avec un âge plus élevé au diagnostic (71 *versus* 47 ans, P < 0.001) et des tumeurs primitives préférentiellement proximales (88% *versus* 58% ; P = 0.004). Les cas sporadiques étaient plus fréquemment diagnostiqués à un stade d'emblée métastatique que les tumeurs entrant dans le cadre d'un syndrome de Lynch (56% *versus* 39%, P = 0.13). Le nombre d'organes atteints au moment du diagnostic de la maladie métastatique ne différait pas entre les 2 groupes (atteinte de 2 organes ou plus : 25% *versus* 28% ; P = 0.60). Les CCRm sporadiques semblaient plus fréquemment associés à une atteinte métastatique initiale péritonéale et ganglionnaire à distance (respectivement 50% *versus* 40% et 41% *versus* 26% ; seuils de significativité non atteints), et présentaient, de manière non significative, moins de métastases hépatiques (25% *versus* 43%, P = 0.12).

Tableau 7. Caractéristiques démographiques et cliniques au diagnostic de cancer

	Population totale N (%)	Groupe « sporadique » N (%)	Groupe « Lynch » N (%)	P	Cas inclassés N (%)
Nombre de patients	118 (100)	32 (100)	72 (100)		14 (100)
Sexe ratio (homme/femme)	1.51 (71/47)	0.28 (7/25)	3.24 (55/17)	< 0.001*	1.8 (9/5)
Age au diagnostic					
médiane, min-max	56, 22-95	71, 45-95	47, 22-74	< 0.001*	66, 53-92
Maladie métastatique					
synchrone	51 (43)	18 (56)	28 (39)		5 (36)
métachrone	67 (57)	14 (44)	44 (61)	0.13	9 (64)

* : statistiquement significatif

Tableau 8. Caractéristiques de l'atteinte tumorale primitive et secondaire

	Population totale N (%)	Groupe « sporadique » N (%)	Groupe « Lynch » N (%)	P	Cas inclassés N (%)
Nombre de patients	118 (100)	32 (100)	72 (100)		14 (100)
Tumeur primitive plurifocale	12 (10)	1 (3)	10 (14)	0.17	1 (7)
Localisation du primitif					
droite	78 (66)	28 (88)	42 (58)		8 (57)
gauche	34 (29)	3 (9)	26 (36)	0.004*	5 (36)
indéterminée	6 (5)	1 (3)	4 (6)		1 (7)
Chirurgie du primitif	115 (97)	31 (100)	71 (100)	0.52	13 (93)
Stade pTN du primitif					
T3-T4b N0	30 (25)	6 (19)	20 (28)		4 (29)
T1-T4b N1-N2	83 (70)	25 (78)	49 (68)	0.46	9 (64)
inconnu	5 (4)	1 (3)	3 (4)		1 (7)
Sites métastatiques initiaux					
atteinte \geq 2 organes	31 (26)	8 (25)	20 (28)	0.82	3 (21)
foie	43 (36)	8 (25)	31 (43)	0.12	2 (14)
péritoine	50 (42)	16 (50)	29 (40)	0.40	3 (21)
ganglion	38 (32)	13 (41)	19 (26)	0.17	3 (21)
autres	19 (16)	2 (6)	15 (21)	0.09	3 (21)

* : statistiquement significatif

5.4 CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES

Les caractéristiques moléculaires concernant les statuts mutationnels *RAS* et *BRAF* sont regroupées dans le tableau 9. Une mutation de *RAS* ou *BRAF* a été retrouvée chez 27% et 20% respectivement des patients de la population générale. Trente-trois patients (28%) étaient porteurs d'un CCRm « all wild-type », sans mutation détectée pour *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*. Trente patients (20%) avaient un statut mutationnel inconnu (N = 23) ou incomplet (N = 7). Parmi ces derniers, 4 cas avaient été testés pour *BRAF* uniquement, 1 cas pour *KRAS* (exons 2, 3, 5) uniquement et 2 cas pour *KRAS* et *BRAF*, sans mutation détectée.

Parmi les 32 cas *RAS* mutés, la mutation détectée siégeait au niveau l'exon 2 (N = 22), de l'exon 3 (N = 4) et de l'exon 4 (N = 6). Une mutation de *NRAS* a été détectée dans un seul cas (exon 2), associée à une mutation de *KRAS* (exon 2). Un autre cas avec double mutation a été diagnostiqué chez un patient ayant présenté à 39 ans un cancer du rectum d'emblée métastatique avec perte d'expression tumorale de hMSH6 ; il s'agissait d'une mutation de *KRAS* (exon 2) et de *BRAF* (exon 15).

Toutes les mutations détectées de *BRAF* étaient des mutations V600E de l'exon 15. Trois tumeurs liées au syndrome de Lynch présentaient une mutation de *BRAF* : 1 cas avec perte d'expression tumorale de hMSH6, associé à une mutation de *KRAS* (voir ci-dessus) et 2 cas avec perte d'expression isolée de hPMS2.

Tableau 9. Statuts mutationnels *RAS* et *BRAF*

	Population totale N (%)	Groupe « sporadique » N (%)	Groupe « Lynch » N (%)	P	Cas inclassés N (%)
Nombre de patients	118 (100)	32 (100)	72 (100)		14 (100)
<i>KRAS</i> ou <i>NRAS</i> muté	32 (27)	3 (9)	25 (35)	0.008*	4 (29)
<i>BRAF</i> muté	24 (20)	21 (66)	3 (4)	< 0.001*	0 (0)
<i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i> sauvages	33 (28)	7 (22)	23 (32)	0.35	3 (21)
statut incomplet ou inconnu	30 (25)	1 (3)	22 (31)		7 (50)

* : statistiquement significatif

5.5 CARACTERISTIQUES ANATOMO-PATHOLOGIQUES

Les caractéristiques anatomo-pathologiques en termes de différenciation tumorale et de sous-types histologiques sont résumées dans le tableau 10. L'analyse anatomo-pathologique a mis en évidence une prolifération tumorale peu différenciée dans 45 cas (38%). Les tumeurs sporadiques étaient plus fréquemment peu différenciée que les tumeurs liées au syndrome de Lynch (50% *versus* 33%, $P = 0.02$). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative en termes de sous-types histologiques, avec notamment 34% et 32% d'adénocarcinomes mucineux.

Tableau 10. Caractéristiques anatomo-pathologiques

	Population totale N (%)	Groupe « sporadique » N (%)	Groupe « Lynch » N (%)	P	Cas inclassés N (%)
Nombre de patients	118 (100)	32 (100)	72 (100)		14 (100)
Degré de différenciation					
moyennement à bien différencié	73 (62)	16 (50)	48 (67)		9 (64)
peu différencié	45 (38)	16 (50)	24 (33)	0.02*	5 (36)
Type histologique					
intestinal	71 (60)	20 (63)	44 (61)	> 0.99	5 (36)
mucineux	40 (34)	11 (34)	23 (32)	0.82	6 (43)
médullaire	4 (3)	1 (3)	2 (3)		1 (7)
à cellules indépendantes	3 (3)	0 (0)	3 (4)		0 (0)

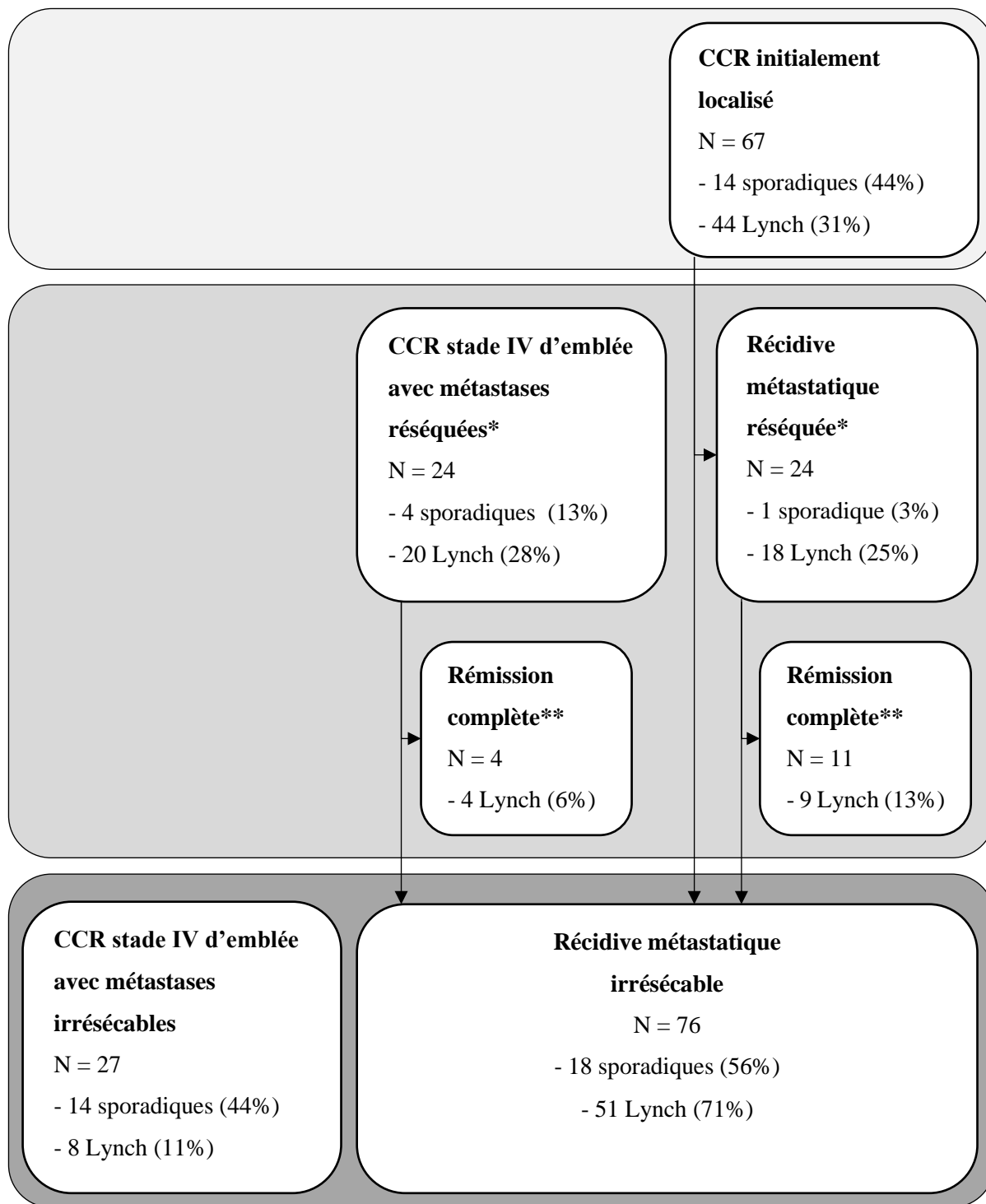
* : *statistiquement significatif*

5.6 ÉVOLUTION DE LA MALADIE AU TRAVERS DES STADES

La figure 6 représente le flux des patients de la cohorte selon le caractère initialement localisé ou non de leur maladie cancéreuse et selon l'accessibilité initiale de leur atteinte métastatique à une prise en charge loco-régionale à visée curative. Au total, 48 patients (41%) ont été traités de leur maladie métastatique avec une intention curative par chirurgie (N = 47) et/ou par radiofréquence (N = 4). L'atteinte métastatique initiale était moins fréquemment accessible à une prise en charge loco-régionale curative dans le groupe « sporadique » que dans le groupe « Lynch » (16% *versus* 53%, $P < 0.001$).

Quinze patients (13 cas liés au syndrome de Lynch, 2 cas inclassés), soit 13% de la population totale, étaient considérés en rémission complète après chirurgie(s) des métastases à la date des dernières nouvelles (suivi médian = 34 mois).

Figure 6. Diagramme de flux selon le caractère synchrone ou métachrone et l'accessibilité à un traitement local curatif de la maladie métastatique



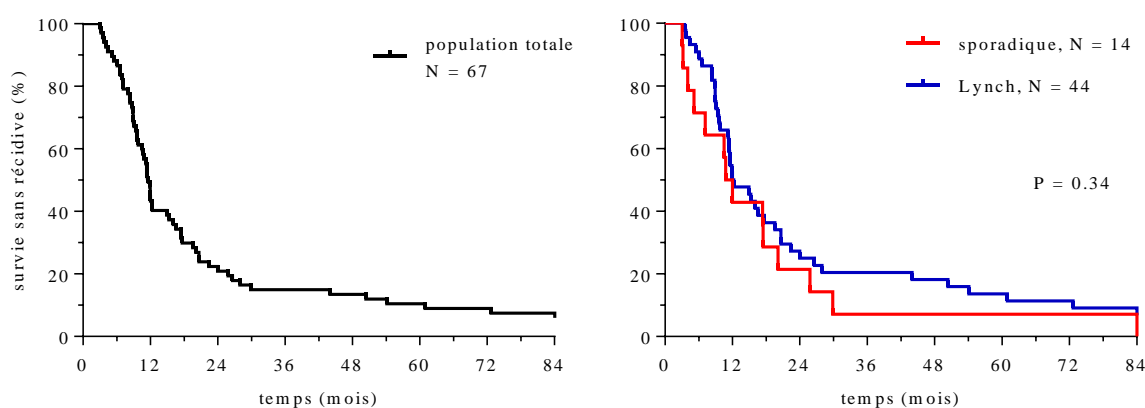
* : maladie métastatique résectée sans ou après chimiothérapie ; ** : rémission complète à la date des dernières nouvelles après résection(s) des métastases. Les pourcentages sont exprimés relativement au nombre de patients du groupe "sporadique" (N = 32 ; 100%) ou du groupe "Lynch" (N = 72 ; 100%).

5.7 ANALYSES DE SURVIE

5.7.1 Maladies initialement localisées : survie avant récurrence

Tous les patients ayant présenté un CCRm métachrone (N = 67) ont été pris en charge initialement par chirurgie carcinologique de la tumeur primitive colique. Huit des 22 CCR de stade II et 39 des 45 tumeurs de stade III ont reçu une chimiothérapie adjuvante contenant du 5-fluorouracile (N = 3 et N = 13, respectivement) ou de type FOLFOX (N = 5 et N = 26, respectivement). La médiane de survie avant récurrence métastatique des patients avec un CCR dMMR initialement localisé est de 11.6 mois [figure 7]. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe « sporadique » et le groupe « Lynch » (11.4 mois *versus* 12.1 mois ; HR = 1.33, IC95 0.69-2.56, P = 0.34).

Figure 7. Maladies initialement localisées : survie avant récurrence



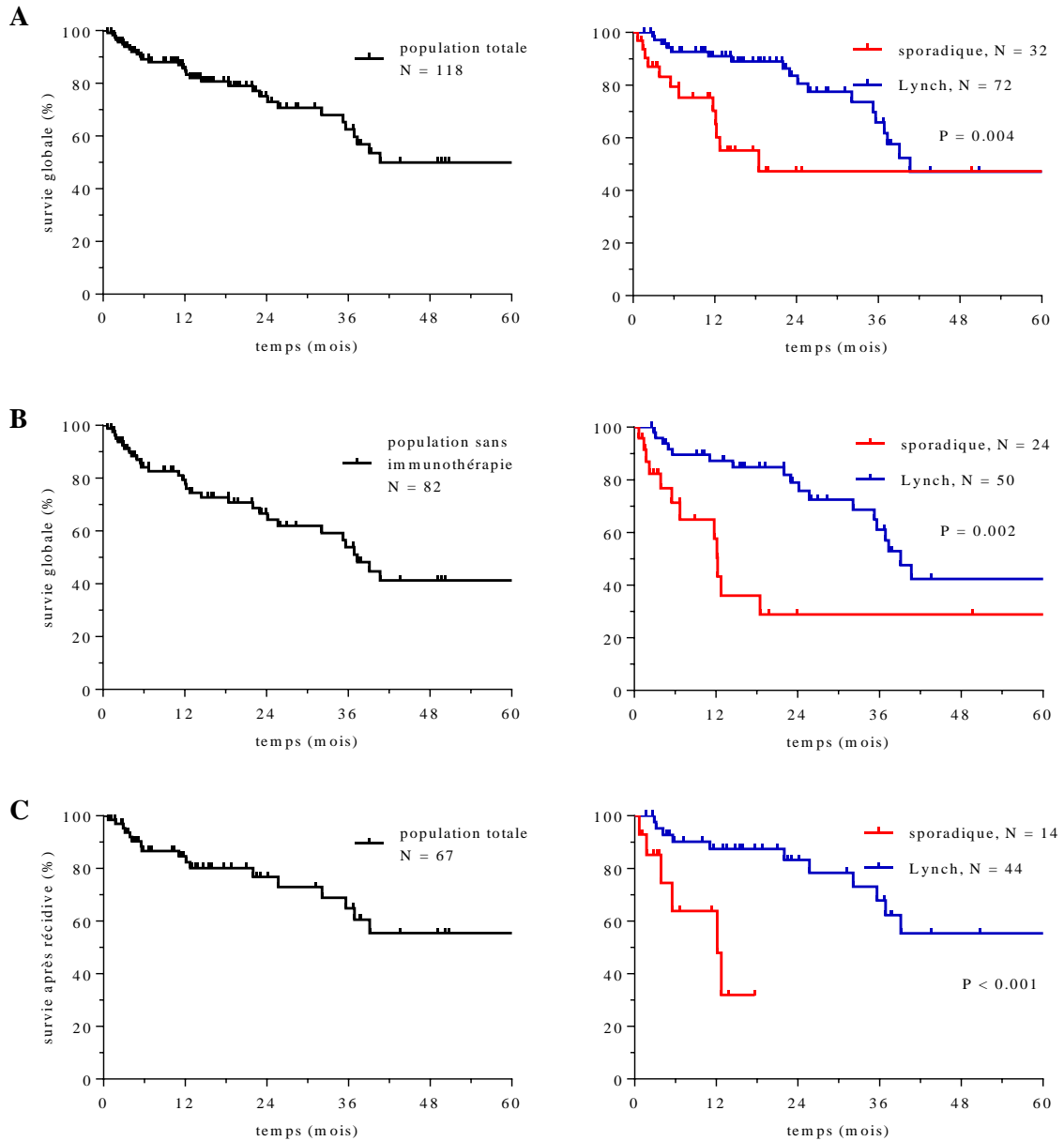
5.7.2 Survie globale en situation métastatique

Les courbes de SG à partir du diagnostic de maladie métastatique selon le caractère sporadique ou héréditaire sont présentées dans la figure 8. Trente et un décès ont été recensés, dont 12 dans le groupe « sporadique » (N = 32) et 18 dans le groupe « Lynch » (N = 72). La médiane de SG, de 40.7 mois dans la population globale de CCRm dMMR, est significativement inférieure dans le groupe « sporadique », comparé aux patients atteints d'un CCRm lié au syndrome de Lynch (18.5 *versus* 40.7 mois ; HR = 3.93, IC95 1.57-9.88, P = 0.004) [figure 8A].

Au sein de la population non traitée par immunothérapie, la médiane de SG est de 37.4 mois. Les patients atteints d'un CCRm dMMR sporadique ont un pronostic défavorable en comparaison aux cas liés au syndrome de Lynch (12.2 mois *versus* 39.1 mois ; HR = 4.59, IC95 1.78-11.8, P = 0.002) [figure 8B]. Il est à noter que 2 patients avec un CCRm dMMR d'origine sporadique étaient toujours vivants après un suivi de 50 et 65 mois à compter du diagnostic de maladie métastatique. Au sein du groupe « sporadique », aucune différence n'était retrouvée selon le statut mutationnel de *BRAF* (HR = 1.67, IC95 0.49-5.72, P = 0.41).

La médiane de survie globale après récidence (SAR) des patients ayant présenté un CCR dMMR initialement localisé n'était pas atteinte à la date de point [figure 8C]. Les patients avec un CCRm dMMR d'origine sporadique ont une médiane de SAR significativement inférieure à celle du groupe « Lynch » (12.2 mois *versus* non atteinte ; HR = 16.15, IC95 3.26-79.95, $P < 0.001$).

Figure 8. Survie globale à partir du diagnostic de maladie métastatique

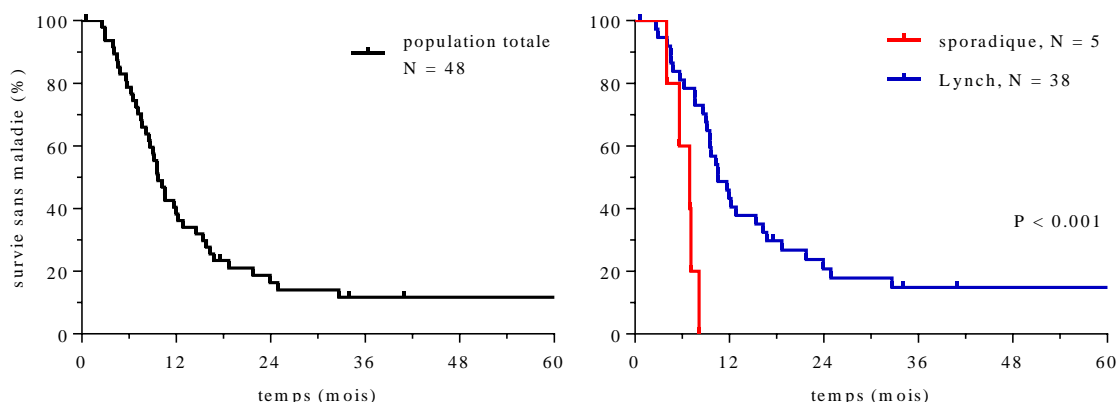


A. survie globale avec censure des patients traités par immunothérapie à la date de leur inclusion dans les essais thérapeutiques ; B. survie globale dans la population non traitée par immunothérapie ; C. survie globale après récidence des patients avec un CCRm dMMR initialement localisé)

5.7.3 Survie sans maladie : métastases prises en charge dans une intention curative

La survie sans maladie (SSM) a été évaluée pour les patients ayant eu une résection de leur atteinte métastatique (N = 48), par chirurgie (N = 47) et/ou radiofréquence (N = 4) [figure 6]. Il s'agissait majoritairement de patients atteints d'un syndrome de Lynch (N = 38). Six patients entrant dans le cadre du syndrome de Lynch n'avaient pas récidivé après la résection initiale, à la date des dernières nouvelles. Tous les cas sporadiques (N = 5) ont récidivé. La médiane de SSM est de 9.7 mois dans la population totale. Les patients entrant dans le cadre du syndrome de Lynch ont une SSM médiane supérieure à celle des cas sporadiques (10.6 *versus* 6.9 mois ; HR = 0.05, IC95 0.008-0.29, P < 0.001) [figure 9].

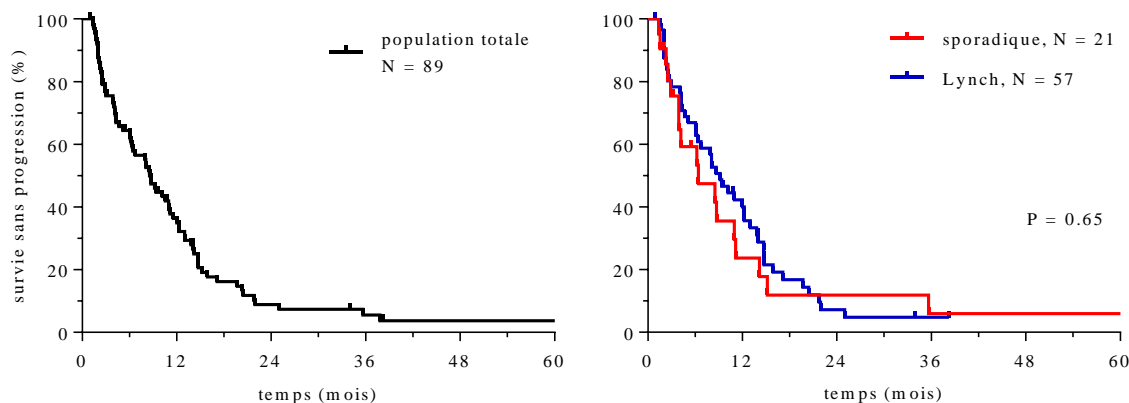
Figure 9. Survie sans maladie des cas métastatiques traités dans une intention curative



5.7.4 Survie sans progression en 1^e ligne métastatique

Tous les patients ayant reçu une chimiothérapie de 1^e ligne métastatique ont été inclus dans l'analyse de SSP (N = 89). La médiane de SSP est de 8.5 mois dans la population globale. Soixante-treize événements (progression de la maladie ou décès de toute cause) ont été recensés, pour notamment 17 cas du groupe « sporadique » (N = 21) et 46 cas du groupe « Lynch » (N = 57). Les patients entrant dans le cadre du syndrome de Lynch ont une SSP médiane supérieure à celle des cas sporadiques (9.2 *versus* 6.4 mois ; HR = 0.87, IC95 0.49-1.56, P = 0.65) [figure 10].

Figure 10. Survie sans progression en 1^e ligne métastatique



6 DISCUSSION

6.1 MISE EN PERSPECTIVE ET CRITIQUE

Notre étude constitue la première cohorte historique multicentrique de CCRm dMMR caractérisés sur le plan clinique et moléculaire permettant de différencier les cas sporadiques des syndromes de Lynch. Nous montrons que les CCRm dMMR d'origine sporadique ont eu une histoire naturelle différente de celle des tumeurs liées au syndrome de prédisposition génétique dit de Lynch, avec un pronostic plus défavorable.

Venderbosch et collègues avaient étudié une large cohorte de patients en situation métastatique inclus dans des essais randomisés de phase 3⁸. Cette analyse mettait en évidence le caractère péjoratif de la mutation *BRAFV600E* (impact pronostic particulièrement défavorable) et du statut dMMR indépendamment du statut *BRAF*. Cependant, du fait de l'absence d'analyse immunohistochimique du statut MMR, les auteurs ne pouvaient pas distinguer les tumeurs sporadiques des cas liés au syndrome de Lynch, mis à part les cas *BRAFV600E* mutés. Par ailleurs, Tran et collègues avaient étudié le type d'atteinte métastatique et le pronostic des CCRm selon leurs statuts *BRAF* et MMR⁵⁷. Comportant 40 patients avec un CCRm dMMR dont 12 cas *BRAF* mutés, cette étude montrait que la mutation *BRAFV600E* était associée à un pronostic défavorable au sein des tumeurs dMMR. S'ils montraient que la mutation *BRAFV600E* était significativement associée au développement de métastases péritonéales et ganglionnaires à distance, les auteurs n'intégraient pas le statut MMR dans leur analyse du profil métastatique des CCR. Ainsi aucune donnée n'était disponible concernant le type d'atteinte métastatique selon le statut *BRAF* au sein-même de la population dMMR.

Notre étude présente certaines limites, essentiellement dues à son caractère rétrospectif. Nous avons identifié les patients *via* des registres incrémentés prospectivement et automatiquement dans chacun des centres participants. L'exclusion des patients pour lesquels aucun échantillon tumoral n'était disponible a limité le risque d'intégrer à notre cohorte des cas pMMR, en permettant un contrôle systématique centralisé des statuts microsatellitaire et MMR de chaque tumeur. Nous avons identifié par cette analyse centralisée 8 tumeurs MSS et pMMR qui avaient été initialement identifiées comme MSI ou dMMR dans le centre participant, et qui ont par conséquent été exclues de notre cohorte. Par ailleurs, la présence de cas inclassés (N = 14) et de cas identifiés au syndrome de Lynch par des critères cliniques (critères d'Amsterdam, âge inférieur à 40 ans ; N = 7) est un second point critique de notre étude. Les résultats des analyses en cours de l'état de méthylation du promoteur de *hMLH1* permettront de classer l'ensemble de la population de la cohorte entre cas sporadiques et cas héréditaires en s'affranchissant des critères cliniques (critères d'Amsterdam, âge inférieur à 40 ans) et ainsi d'affiner les résultats avant publication.

6.2 METHODES ET DISCORDANCES

6.2.1 PCR et immunohistochimie

La présence dans notre cohorte de cas discordants entre les techniques diagnostiques amène à discuter des modalités d'évaluation des statuts MMR et microsatellitaire des tumeurs. Grâce à l'analyse centralisée effectuée à l'hôpital Saint-Antoine, nous avons identifié et exclus de la cohorte 8 cas pMMR et MSS alors qu'ils avaient été considérés comme MSI (N = 7) ou dMMR (N = 1) par le laboratoire du centre participant. Cette variabilité dans la réalisation et/ou l'interprétation de la PCR Pentaplex est en cours d'étude afin de comprendre ces différences dont l'impact est important, tant sur le plan de l'évaluation du risque héréditaire et que sur le plan thérapeutique.

L'analyse centralisée des statuts MMR et microsatellitaire a mis en évidence 9 cas discordants entre les 2 techniques. Cinq tumeurs dMMR en IHC ne présentaient pas d'instabilité microsatellitaire en PCR dans notre cohorte. Cette discordance peut être expliquée par une contamination de l'échantillon d'ADN tumoral par de l'ADN de cellules non tumorales, qui constitue la principale limite de la PCR en pratique courante³⁰. La nécessité d'analyser de l'ADN tumoral en qualité et en quantité suffisantes, non contaminé par de l'ADN non tumoral, rend cette technique potentiellement complexe, pour des prélèvements pauvres en cellules tumorales, notamment pour les tumeurs mucineuses et les tumeurs rectales irradiées en pré-opératoire. Ces limites expliquent notamment les 12 cas de notre cohorte pour lesquels le statut microsatellitaire n'a pas pu être déterminé. Par ailleurs, l'identification de 4 cas MSI sans perte d'expression des 4 protéines en IHC peut être expliquée par l'existence de mutations faux-sens, qui ne s'accompagnent pas nécessairement d'une perte de l'expression protéique et pour lesquelles la méthode immunohistochimique est donc mise en défaut. D'interprétation parfois difficile, l'IHC des protéines MMR, en particulier hMSH6 et hPMS2, devrait selon certains auteurs être réalisée et analysée en centres experts^{62, 63}.

6.2.2 Syndrome de Lynch et mutation *BRAFV600E*

Il est important de noter que nous avons retrouvé 3 CCRm dMMR liés au syndrome de Lynch et porteurs de la mutation V600E de *BRAF*. L'un des cas, avec perte isolée de hMSH6, était également porteur d'une mutation de *KRAS* ; les 2 autres cas étaient associés à une perte isolée de hPMS2. Cela souligne le fait que les CCR dus au syndrome de Lynch, hors mutation constitutionnelle de *hMLH1*, peuvent être mutés *BRAFV600E*^{64, 65}. Ainsi il a été proposé, dans le cadre des tumeurs dMMR avec perte d'expression de *hMLH1*, d'utiliser le statut mutationnel de *BRAF* dans les algorithmes décisionnels de détection des patients possiblement porteurs d'un syndrome de Lynch^{12, 13, 66-70}. La majorité de ces études concernaient cependant des échantillons relativement faibles, et il a été décrit de rares cas dMMR *BRAFV600E* mutés avec mutation constitutionnelle de *hMLH1*^{10, 64, 69}. La présence d'une mutation V600E de *BRAF* ne semble donc pas suffisante pour éliminer la possibilité d'un syndrome de Lynch chez les patients porteurs d'un CCR dMMR avec perte de hMSH2/hMSH6, ou perte isolée de hMSH6 ou de hPMS2 seul.

6.3 CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

6.3.1 Prévalence des cas sporadiques et des cas liés au syndrome de Lynch

La caractérisation clinique et moléculaire de notre cohorte a permis d'identifier 27% de patients présentant un CCRm dMMR d'origine sporadique, et 20% de tumeurs *BRAFV600E* mutées, ce qui est légèrement inférieur aux 25% à 35% de tumeurs dMMR avec mutation *BRAFV600E* précédemment rapportés^{8,57}. Nous attendons les résultats des 13% de cas inclassés de notre étude, pour lesquels le statut de méthylation du promoteur du gène *hMLH1* est en cours d'évaluation. Pour autant, la proportion retrouvée de cas mutés *BRAFV600E* au sein des CCRm dMMR sporadiques (66%), est en accord avec les 40 à 72% rapportés dans la littérature^{12, 13, 71}. Par ailleurs, la sous-représentation des cas dMMR sporadiques dans notre cohorte est très probablement en rapport avec un biais de sélection lié au fait que plusieurs centres de cette étude participent à la prise en charge et à la surveillance des patients porteurs d'un syndrome de Lynch, ainsi que de leur famille. L'hôpital Saint-Antoine, notamment, participe au suivi multidisciplinaire des personnes prédisposées héréditairement au cancer colorectal au sein du Réseau Ile-de-France PRED-IdF, et traite des patients dans le cadre d'essais d'immunothérapie réservés spécifiquement aux CCRm dMMR et/ou MSI. Ainsi, seulement 10% de la population de notre étude avait plus de 75 ans au diagnostic. Il semble donc que le sous-groupe classiquement décrit des CCR sporadiques *BRAF* mutés de la personne âgée soit faiblement représenté dans notre cohorte⁷².

6.3.2 Caractéristiques cliniques et anatomo-pathologiques

Nous montrons que les CCRm dMMR sporadiques sont plus fréquemment retrouvés chez des personnes âgées, de sexe féminin et au niveau du côlon droit que les tumeurs liées au syndrome de Lynch. Ces données sont en accord avec la littérature et, même si les CCR liés au syndrome de Lynch sont classiquement décrits comme se développant au niveau du côlon proximal, une part minoritaire mais non négligeable d'entre eux est retrouvée au niveau du côlon gauche (39%)¹. Sur le plan morphologique, les tumeurs sporadiques étaient plus fréquemment peu différenciées. Nous avons identifiés 34% de carcinomes mucineux, sans différence entre tumeurs sporadiques et liées au syndrome de Lynch, et plusieurs cas de carcinomes médullaires et à cellules indépendantes. Ces résultats en termes de sous-types histologiques étaient attendus, même s'il a été rapporté une plus grande fréquence de carcinome mucineux dans les tumeurs dMMR sporadiques⁶.

6.3.3 Profil pronostique des CCRm dMMR

6.3.3.1 Résécabilité de l'atteinte métastatique

Seulement 16% des CCRm dMMR sporadiques ont eu une résection chirurgicale ou par radiofréquence de leur maladie métastatique, contre 56% des cas liés au syndrome de Lynch. Cette différence peut en partie être expliquée par le type d'organes atteints à distance, avec une tendance des CCRm dMMR sporadiques à développer des métastases ganglionnaires et péritonéales, profil qui avait déjà été rapporté par Tran et collègues dans le cadre des CCR *BRAF* mutés⁵⁷. Par ailleurs, les CCRm dMMR sporadiques

semblent présenter un profil plus agressif, avec 56% de cas d'emblée métastatiques contre 39% pour les tumeurs liées au syndrome de Lynch ($P = 0.13$, non significatif).

6.3.3.2 Analyses de survie

Aucune étude publiée n'a analysé la survie des patients atteints d'un CCRm dMMR selon le caractère sporadique ou héréditaire de leur maladie. Seuls Sinicrope et collègues avaient analysé de manière exploratoire l'impact de la chimiothérapie adjuvante à base de fluoropyrimidine dans les CCR localisés dMMR sporadiques ou liés au syndrome de Lynch, montrant un effet positif du traitement pour les tumeurs héréditaires, au contraire des cas sporadiques pour lesquels aucun effet n'était retrouvé³⁹. En situation métastatique, les seules données de survie disponibles concernent l'impact péjoratif de la mutation *BRAFV600E* au sein des CCRm dMMR^{8, 57}. Notre étude a l'avantage de pouvoir analyser la survie des patients atteints d'un CCRm dMMR sporadique ou héréditaire, classés grâce à l'analyse moléculaire des échantillons tumoraux recueillis. Cependant ces analyses de survie restent soumises à caution, du fait du caractère rétrospectif de notre travail, avec de probables biais de sélection discutés précédemment.

Concernant l'analyse des survies des CCRm dMMR initialement localisés, notre étude est particulière dans le sens où, par définition, tous les patients ont récidivé sous une forme métastatique. Si aucune différence n'a été retrouvée en terme de SSR entre les cas sporadiques et ceux liés au syndrome de Lynch, la SAR est nettement inférieure chez les patients avec un CCR dMMR sporadique ($HR = 16.15$, $IC95\ 3.26-79.95$, $P < 0.001$). Ces résultats rejoignent ceux de Gavin et collègues, qui montraient que si la mutation *BRAFV600E* était associée à une diminution de la SG, cet effet délétère se retrouvait non pas en SSP, mais bien en SAR¹⁴. Des études ont confirmé l'absence d'impact péjoratif de *BRAFV600E* dans les CCR localisés dMMR, au contraire des tumeurs pMMR^{16, 41}. Ainsi nous montrons pour la première fois que les patients atteints d'un CCR dMMR sporadique initialement localisé ont une SAR significativement inférieure à celle des patients porteurs d'un syndrome de Lynch.

Les données de survie que nous rapportons, avec notamment une médiane de SG de 40.7 mois dans la population globale, sont supérieures à celles retrouvées dans l'étude de Tran et collègues et dans l'analyse poolée des essais CAIRO, CAIRO2, COIN et FOCUS^{8, 57}. Cela est probablement expliqué par le fait que, dans ces essais thérapeutiques de 1^e ligne métastatique, les patients inclus présentaient une maladie métastatique irrésécable, tandis que, dans notre étude, la SG était calculée à partir du diagnostic de la maladie métastatique qu'elle soit ou non résécable. Notre étude met en évidence une SG nettement inférieure pour les patients avec un CCRm dMMR sporadique, avec une médiane de SG de 18.5 contre 40.7 mois ($P = 0.004$). Ces résultats, obtenus en excluant les patients traités par immunothérapie à la date de leur inclusion dans ces protocoles, ont été retrouvés de manière similaire en analysant uniquement les patients n'ayant pas été traités par immunothérapie. Cette différence en termes de SG semble principalement expliquée par la très faible proportion de maladies métastatiques accessibles à

une prise en charge médico-chirurgicale à visée curative dans le groupe « sporadique » (16% *versus* 53% dans le groupe « Lynch »). De plus, pour les patients opérés de leurs métastases, la médiane de SSM est significativement inférieure dans les cas sporadiques (6.9 *versus* 10.6 mois, $P < 0.001$). De même, la SSP en 1^e ligne de chimiothérapie est inférieure pour les patients avec un CCRm dMMR sporadique comparés aux patients porteurs d'un syndrome de Lynch (9.2 *versus* 6.4 mois, $P = 0.65$).

6.4 AVENIR

Notre travail a permis de constituer une collection biologique de CCRm dMMR enrichie d'une base de données clinico-pathologiques et qui va faire l'objet d'une thèse de science. Incluant actuellement 118 CCRm dMMR, cette collection continue à être incrémentée de nouveaux cas, et notamment des patients actuellement en cours d'inclusion dans les essais d'immunothérapie.

Dans le contexte de l'émergence de l'immunothérapie, un intérêt particulier sera porté à l'infiltrat inflammatoire des tumeurs et à l'expression des points de contrôle immunitaires (PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3... : immunohistochimie et technologie Nanostring®). Les tumeurs seront ainsi caractérisées sur le plan moléculaire *via* des explorations « gène-candidat » et des analyses non supervisées. Ces paramètres seront mis en relation avec les données de survie des patients, afin d'en évaluer le caractère pronostique. Nous serons à même de comparer les profils moléculaires des tumeurs primitifs et de leurs métastases, avec plus de 60 couples de blocs tumoraux. L'étude des cas traités par immunothérapie, dans le cadre de collaborations avec les promoteurs des essais thérapeutiques, s'intéressera à la recherche de biomarqueurs prédictifs d'efficacité, qui font jusqu'à présent défaut à ces thérapies innovantes et prometteuses.

7 CONCLUSION

Cette étude rétrospective et multicentrique a permis la mise en place d'une cohorte de patients avec CCRm dMMR dont la caractérisation moléculaire (IHC des protéines MMR, mutation *BRAFV600E*, méthylation du promoteur de *hMLH1*) a permis d'individualiser les tumeurs sporadiques et les cas héréditaires liés au syndrome de Lynch. Nous montrons que ces 2 entités présentent des caractéristiques cliniques, moléculaires et anatomo-pathologiques distinctes. Les patients avec un CCRm lié au syndrome de Lynch ont un meilleur pronostic que les cas dMMR sporadiques. Alors qu'aucune différence de SSR n'a été mise en évidence, la SAR des tumeurs initialement localisées est plus longue pour les patients avec un syndrome de Lynch que pour les cas sporadiques. Les CCRm dMMR héréditaires sont associés à une meilleure SG (40.7 *versus* 18.5 mois, $P = 0.004$). La médiane de SSP en cas de chimiothérapie de 1^e ligne métastatique est respectivement de 9.2 et 6.4 mois ($P = 0.65$). Plus fréquemment opérés de leur atteinte métastatique, les patients avec un syndrome de Lynch ont une SSM plus longue que les cas sporadiques en cas de résection des métastases (10.6 *versus* 6.9 mois, $P < 0.001$).

La mise en évidence de cas discordants entre les statuts microsatellitaire et MMR ($N = 9$) et entre les analyses des laboratoires d'origine et de l'analyse centralisée de l'étude ($N = 8$) souligne l'importance de la réalisation conjointe des 2 techniques diagnostiques, PCR et immunohistochimie des 4 protéines MMR (*hMLH1*, *hPMS2*, *hPSH2*, *hMSH6*). Par ailleurs, cette étude confirme la nécessité de définir précisément le profil moléculaire des CCRm. Associés à un pronostic particulièrement péjoratif, les patients présentant un CCRm dMMR sporadique, incluant les tumeurs mutées *BRAFV600E*, doivent être l'objet d'une attention particulière et de stratégies spécifiques, si possible dans le cadre d'essais thérapeutiques. Si leur profil pronostique est moins défavorable, les patients atteints d'un CCRm lié au syndrome de Lynch doivent être pris en charge de manière multidisciplinaire, médico-chirurgicale. Indépendamment du caractère sporadique ou héréditaire de leur cancer, ces patients doivent être orientés vers des essais d'immunothérapie, qui constitue une voie thérapeutique prometteuse pour la prise en charge des tumeurs dMMR.

Notre cohorte est constituée de patients traités soit en dehors d'essais thérapeutiques, soit dans le cadre d'essais d'immunothérapie. Notre travail apporte donc des informations essentielles pour la mise en perspective des résultats des essais d'immunothérapie. En ayant systématiquement recherché les échantillons tumoraux des tumeurs primitives et/ou des métastases, nous avons créé une collection biologique qui continue d'être implémentée et qui permettra d'approfondir le démantèlement moléculaire des CCRm dMMR. Avec plus d'une quarantaine de cas inclus dans des essais d'immunothérapie, nous serons à même d'identifier d'éventuels facteurs prédictifs d'efficacité de ces nouvelles thérapeutiques. En conclusion, par son caractère translationnel, notre travail met en exergue la nécessité de développer des collaborations entre cliniciens, pathologistes et scientifiques, pour mieux définir la prise en charge thérapeutique des patients.

8 BIBLIOGRAPHIE

1. Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50:113–130, 2007
2. Lynch HT, de la Chapelle A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348:919–932, 2003
3. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer research* 57:808–811, 1997
4. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al: Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer research* 58:3455–3460, 1998
5. Cunningham JM, Kim C-Y, Christensen ER, et al: The Frequency of Hereditary Defective Mismatch Repair in a Prospective Series of Unselected Colorectal Carcinomas. *The American Journal of Human Genetics* 69:780–790, 2001
6. Young J, Simms LA, Biden KG, et al: Features of Colorectal Cancers with High-Level Microsatellite Instability Occurring in Familial and Sporadic Settings: Parallel Pathways of Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology* 159:2107–2116, 2001
7. Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, et al: Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British Journal of Cancer* 92:1746–1753, 2005
8. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al: Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. *Clinical Cancer Research* 20:5322–5330, 2014
9. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al: Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934–934, 2002
10. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, et al: BRAF Mutations in Colon Cancer Are Not Likely Attributable to Defective DNA Mismatch Repair. *Cancer Res* 63:5209–5212, 2003

BIBLIOGRAPHIE

11. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al: BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 24:3995–3998, 2005
12. Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al: Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Familial Cancer* 6:301–310, 2007
13. Capper D, Voigt A, Bozukova G, et al: BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer: BRAF V600E Immunohistochemistry in MSI-H Colorectal Cancer. *International Journal of Cancer* 133:1624–1630, 2013
14. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al: Mutation Profiling and Microsatellite Instability in Stage II and III Colon Cancer: An Assessment of Their Prognostic and Oxaliplatin Predictive Value. *Clin Cancer Res* 18:6531–6541, 2012
15. Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, et al: Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Annals of Oncology* 26:1236–132, 2015
16. Taieb J, Zaanan A, Le Malicot K, et al: Prognostic Effect of BRAF and KRAS Mutations in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With Leucovorin, Fluorouracil, and Oxaliplatin With or Without Cetuximab: A Post Hoc Analysis of the PETACC-8 Trial. *JAMA Oncology* 2:643, 2016
17. André T, Gramont A de, Vernerey D, et al: Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *JCO* 33:4176–4187, 2015
18. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al: The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21:1350–1356, 2015
19. Le DT, Uram JN, Wang H, et al: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* 372:2509–2520, 2015
20. Le DT, Uram JN, Wang H, et al: Programmed death-1 blockade in mismatch repair deficient colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34:suppl; abstr 103, 2016

BIBLIOGRAPHIE

21. Overman MJ, Kopetz S, McDermott RS, et al: Nivolumab ± ipilimumab in treatment (tx) of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) with and without high microsatellite instability (MSI-H): CheckMate-142 interim results. *Journal of Clinical Oncology* 34:suppl abstr 3501, 2016
22. Li G-M: Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research* 18:85–98, 2008
23. Hewish M, Lord CJ, Martin SA, et al: Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7:197–208, 2010
24. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, et al: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453–1456, 1999
25. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al: Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *Journal of the National Cancer Institute* 96:261–268, 2004
26. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al: Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *JCO* 26:5783–5788, 2008
27. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al: Identification of Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *JAMA* 308:1555, 2012
28. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, et al: Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 62:812–823, 2013
29. Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, et al: Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *Journal of Clinical Oncology* 32:5s, 2014
30. Colas C, Coulet F, Svrcek M, et al: Lynch or not Lynch? Is that always a question? *Adv Cancer Res* 113:121–166, 2012
31. Shia J: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 10:293–300, 2008
32. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al: Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *New England Journal of Medicine* 352:1851–1860, 2005

BIBLIOGRAPHIE

33. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al: A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *JNCI J Natl Cancer Inst* 89:1758–1762, 1997
34. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, et al: Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Disease markers* 20:251–257, 2004
35. 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. *JCO* 24:241–251, 2006
36. 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* jmedgenet-2015-103518, 2016
37. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *New England Journal of Medicine* 349:247–257, 2003
38. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al: Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28:3219–3226, 2010
39. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al: DNA Mismatch Repair Status and Colon Cancer Recurrence and Survival in Clinical Trials of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 103:863–875, 2011
40. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al: Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF Mutations in Predicting Recurrence and Benefits From Chemotherapy in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 29:1261–1270, 2011
41. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al: Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. *Journal of Clinical Oncology* 28:466–474, 2010
42. Zaanen A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, et al: Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Annals of Oncology* 21:772–780, 2010

BIBLIOGRAPHIE

43. Tougeron D, Mouillet G, Trouilloud I, et al: Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer With Microsatellite Instability: A Large Multicenter AGEO Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* 108:djv438, 2016
44. Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al: Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nature Medicine* 17:1283–1289, 2011
45. 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* 146:401–411.e1, 2014
46. Sinicrope FA, Smyrk T, Foster NR, et al: 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:suppl; abstr 3518, 2016
47. Pagès F, Berger A, Camus M, et al: Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 353:2654–2666, 2005
48. Tougeron D, Maby P, Elie N, et al: Regulatory T Lymphocytes Are Associated with Less Aggressive Histologic Features in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancers. *PLoS ONE* 8:e61001, 2013
49. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al: Intratumoral CD8 + T/FOXP3 + cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol, Immunotherapy* 59:653–661, 2010
50. Emile J-F, Le Malicot K, Taberero J, et al: Validation of the prognostic impact of lymphocyte infiltration (LI) in patients (pts) with stage III colon cancer (CC) treated with adjuvant FOLFOX+/- cetuximab: A PETACC8 translational study. *Journal of Clinical Oncology* 34:suppl 4S; abstr 553, 2016
51. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al: Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232:199–209, 2014
52. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al: Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44:698–711, 2016

BIBLIOGRAPHIE

53. Galon J, Mlecnik B, Marliot F, et al: Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *Journal of Clinical Oncology* 34:suppl; abstr 3500, 2016
54. Brueckl WM, Moesch C, Brabletz T, et al: Relationship between microsatellite instability, response and survival in palliative patients with colorectal cancer undergoing first-line chemotherapy. *Anticancer Res* 23:1773–1777, 2003
55. Des Guetz G, Mariani P, Cucherousset J, et al: Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer research* 27:2715–2719, 2007
56. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, et al: Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 100:266–273, 2009
57. Tran B, Kopetz S, Tie J, et al: Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117:4623–4632, 2011
58. Stadler ZK, Battaglin F, Middha S, et al: Reliable Detection of Mismatch Repair Deficiency in Colorectal Cancers Using Mutational Load in Next-Generation Sequencing Panels. *JCO* 34:2141–2147, 2016
59. Donnard E, Asprino PF, Correa BR, et al: Mutational analysis of genes coding for cell surface proteins in colorectal cancer cell lines reveal novel altered pathways, druggable mutations and mutated epitopes for targeted therapy. *Oncotarget* 5:9199, 2014
60. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, et al: Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Reports* 15:857–865, 2016
61. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, et al: Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Research* 75:3446–3455, 2015
62. Klarskov L, Ladelund S, Holck S, et al: Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining. *Human Pathology* 41:1387–1396, 2010
63. Overbeek LIH, Ligtenberg MJL, Willems RW, et al: Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* 32:1246–1251, 2008

BIBLIOGRAPHIE

64. Robinson KL, Liu T, Vandrovcova J, et al: Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. *JNCI J Natl Cancer Inst* 99:291–299, 2007
65. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al: The Clinical Phenotype of Lynch Syndrome Due to Germ-Line PMS2 Mutations. *Gastroenterology* 135:419–428.e1, 2008
66. Nakagawa H, Nagasaka T, Cullings HM, et al: Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 3' promoter methylation of the MLH1 or BRAF mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability. *Oncol Rep* 21:1577–1583, 2009
67. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, et al: BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Archiv* 463:613–621, 2013
68. Bessa X, Ballesté B, Andreu M, et al: A Prospective, Multicenter, Population-Based Study of BRAF Mutational Analysis for Lynch Syndrome Screening. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6:206–214, 2008
69. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al: Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* 49:151–157, 2012
70. Roth RM, Hampel H, Arnold CA, et al: A Modified Lynch Syndrome Screening Algorithm in Colon Cancer: BRAF Immunohistochemistry Is Efficacious and Cost Beneficial. *American Journal of Clinical Pathology* 143:336–343, 2015
71. Farchoukh L, Kuan S-F, Dudley B, et al: MLH1-deficient Colorectal Carcinoma With Wild-type BRAF and MLH1 Promoter Hypermethylation Harbor KRAS Mutations and Arise From Conventional Adenomas: *The American Journal of Surgical Pathology* 1, 2016
72. Tie J, Gibbs P, Lipton L, et al: Optimizing targeted therapeutic development: Analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAFV600E mutation. *International Journal of Cancer* 128:2075–2084, 2011

Caractérisation clinique et moléculaire des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN

Résumé :

CONTEXTE : Sporadiques (SP) ou liés au syndrome de Lynch (LS), l'évolution sous traitement des patients (pts) atteints d'un cancer colorectal métastatique (CCRm) MSI (microsatellites instables) avec déficience du système MMR (dMMR) est mal connue.

MATERIEL ET METHODES : Les pts avec un CCRm dMMR et/ou MSI ont été identifiés rétrospectivement. Le statut dMMR et MSI a été confirmé de manière centralisée. Les critères d'exclusion étaient : absence de matériel tumoral disponible, tumeur pMMR (proficient MMR) et MSS (MS stables). Les statuts *RAS*, *BRAF* et l'état de méthylation du promoteur de *hMLH1* ont été analysés.

RESULTATS : Cent dix-huit pts dont 72 LS et 32 SP ont été inclus. Les statuts microsatellitaire et MMR étaient discordants pour 9 cas. La mutation *BRAFV600E* était présente dans 24 cas (20%), dont 3 cas LS. Comparés au LS, les cas SP étaient associés avec : sexe féminin, âge élevé, côlon proximal. L'atteinte métastatique était moins fréquemment résecable (16% vs 53%, $P < .001$). La médiane de survie globale des SP à partir du stade métastatique était inférieure à celle des LS (18.5 vs 40.7 mois, $P = .004$). La survie sans progression médiane en 1^e ligne métastatique (N=89) était de 6.4 et 9.2 mois ($P = .65$). La survie sans maladie des cas métastatiques résecués (N=48) de 6.9 et 10.6 mois ($P < .001$) ; 15 pts (13 LS et 2 cas inclassés) étaient en rémission complète à la date des dernières nouvelles. Pour les cas initialement localisés, la survie sans récurrence était identique dans les 2 groupes, mais la survie après récurrence était inférieure pour les SP ($P < .001$).

CONCLUSION : Au sein des pts avec CCRm dMMR traités, les cas SP ont un pronostic plus défavorable que les LS.

Mots clés : cancer colorectal, instabilité des microsatellites, MSI, mésappariements de l'ADN, MMR, syndrome de Lynch, HNPCC, BRAF, immunothérapie

Clinical and molecular characterization of patients with DNA mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer

Abstract:

BACKGROUND: Patients (pts) with metastatic colorectal cancers (mCRC) harbouring microsatellite instability (MSI) due to sporadic (SP) or inherited (Lynch syndrome: LS) MMR deficiency (dMMR) are poorly characterized.

MATERIAL AND METHODS: Pts with dMMR or MSI mCRC were retrospectively identified. dMMR and MSI statuses were centrally confirmed. Exclusion criteria were: no available tumor specimen, pMMR (proficient MMR) and MSS (MS stable) tumor. *RAS* and *BRAF* mutational status and *hMLH1* promoter methylation were evaluated.

RESULTS: One hundred and eighteen pts, of which 72 LS and 32 SP, were included. Discrepancies between MMR and microsatellite statuses were observed for 9 tumors. *BRAFV600E* mutation were harboured by 24 tumors, of which 3 LS (20%). Compared with LS, SP were associated with female, older age, proximal colon. Metastatic disease were less frequently resectable (16% versus 53%, $P < .001$). Median overall survival from mCRC diagnosis was 18.5 months (m) for SP and 40.7 m for LS ($P = .004$). Median progression-free survival for first-line chemotherapy (N=89) was respectively 6.4 and 9.2 m ($P = .65$). Disease-free survival was 6.9 and 10.6 m ($P < .001$) for patients with resected metastatic disease (N=48); at the data-cutoff date 15 pts (13 LS and 2 unlabelled pts) were still in complete remission. For initially localized dMMR mCRC, survival after relapse was significantly inferior for SP ($P < .001$) but disease-free survival was similar between both groups.

CONCLUSION: Among treated pts with dMMR mCRC, SP tumors exhibit worse prognosis than LS.

Keywords: colorectal cancer, microsatellite instability, MSI, DNA mismatch repair, MMR, Lynch syndrome, HNPCC, BRAF, immunotherapy

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris cedex 06